

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ/CAMPUS DE CASCAVEL

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**INFESTAÇÃO DE *SITOPHILUS ZEAMAI* NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E
MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE TRIGO ARMAZENADOS**

TANIA CLAUDIA PINTRO

CASCAVEL

2015

TANIA CLAUDIA PINTRO

**INFESTAÇÃO DE *SITOPHILUS ZEAMAI*S NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E
MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE TRIGO ARMAZENADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração: Sistemas Biológicos Agroindustriais - Nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Divair Christ

CASCADEL

2015

1 Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P729i

Pintro, Tania Claudia

Infestação de *Sitophilus zeamais* na qualidade físico-química e microbiológica de grãos de trigo armazenados./ Tania Claudia Pintro. Cascavel, 2015.

60 p.

Orientador: Prof. Dr. Divair Christ

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola

1. Desoxinivalenol. 2. Inseto-praga. 3. Micotoxinas. 4. Fungos. I.Christ, Divair.II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

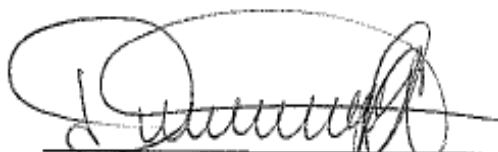
CDD 21.ed. 631.568

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

TANIA CLAUDIA PINTRO

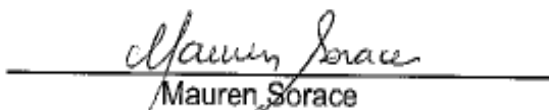
Infestação de "Sitophilus zeamais" na qualidade físico-química e microbiológica de grãos de trigo armazenados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Agrícola, área de concentração Sistemas biológicos e agroindustriais, linha de pesquisa Tecnologias de produção vegetal e pós-colheita, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



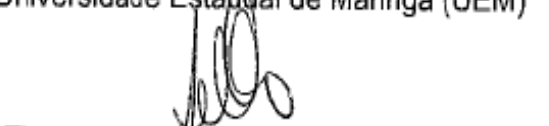
Orientador(a) - Divair Christ

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Mauren Sorace

Universidade Estadual de Maringá (UEM)



Sílvia Renata Machado Coelho

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 12 de fevereiro de 2015

BIOGRAFIA

Graduação: Tecnologia em Construção Civil, ano de conclusão 2006 - Universidade Tecnológica Federal do Paraná; Engenharia Agrícola, ano de conclusão 2012 - Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Atuação Acadêmica:

2011 - 2012 Vínculo: Bolsista/PIBIC/Unioeste/PRPPG, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20. Regime: Dedicção exclusiva. Projetos de pesquisa: Infestação de feijão por *Zabrotes subfasciatus* durante o armazenamento sob influência de fotoperíodo com diferentes iluminantes.

2012 - 2012 Vínculo: Bolsista/PIBIC/Unioeste/PRPPG, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20. Regime: Dedicção exclusiva. Projetos de pesquisa: Perdas qualitativas e quantitativas dos grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.), infestados pelos insetos *Sitophilus zeamais* e *Rhizopertha dominica*.

2013: Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em nível de Mestrado, no Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UNIOESTE, na área de Engenharia de Sistemas Biológicos Agroindustriais, na linha de pesquisa de Pós-colheita.

Dedico a todas as pessoas que têm um
sonho.
Abram suas asas; vocês podem alcançá-lo!
Samanta Holtz, O pássaro, 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela família em que me permitiu nascer, pois são a força que me move e luz que me ilumina. Sem Ele nenhum agradecimento faria sentido.

Agradeço ao meu pai (*in memoriam*), meu eterno protetor; e à minha mãe, meu espelho. Meus pais vocês são eternos em mim, através do exemplo, dos valores morais e espirituais.

Agradeço aos meus irmãos e sobrinhos, pelo apoio e pela compreensão do tempo de convívio muitas vezes sacrificado para realização deste trabalho. Vocês são presentes de Deus, em minha vida.

Agradeço ao meu irmão e cunhada que me deram a maior alegria durante todo o período de mestrado, meu sobrinho Bernardo que está a caminho, o qual já trouxe esperança e renovação para minha vida.

Agradeço aos meus amigos e ao meu namorado pela compreensão da minha ausência, em vários momentos e pelas palavras de encorajamento e motivação. A vocês, dedico meu carinho, amor, respeito e gratidão por tudo que representam para mim.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Divair Christ, pela dedicação, orientação e paciência dispensadas a mim.

Ao Prof. Dr. Luís Francisco Angeli Alves, que disponibilizou o Laboratório de Biotecnologia Agrícola para que eu conseguisse concluir a pesquisa.

Às amigas Andréia Bonini e Ana Tereza Bittencourt Guimarães, não só pela amizade, carinho e auxílio técnico, mas, principalmente, pelo sorriso e bom humor constantes.

À Professora. Dr^a. Sílvia Renata Machado Coelho.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida e à CAPES por financiar parte dos materiais necessários a esta pesquisa.

Enfim, agradeço a todos, pois essa conquista não é só minha; ela também é de cada um de vocês.

INFESTAÇÃO DE *SITOPHILUS ZEAMAI*S NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE TRIGO ARMAZENADOS

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da infestação de insetos *Sitophilus zeamais* sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de trigo, durante o armazenamento nos tempos de 0, 45, 90 e 135 dias e em três temperaturas: 20, 25 e 30 °C. Para a condução do experimento, foram coletadas amostras de grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) do cultivar BRS Tangará, produzido na região Oeste do Paraná e provenientes da safra de 2013. Para o armazenamento, os grãos apresentaram teores de água abaixo de 13%, sendo armazenados cerca de 400 g em recipientes de vidros, fechados com tecido tipo *voil* a fim de facilitar as trocas gasosas, totalizando 72 recipientes armazenados em câmara incubadora B.O.D. nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, no tempo de 135 dias. Do total de recipientes, 36 foram infestados com 20 insetos adultos de *Sitophilus zeamais* e os outros 36 foram mantidos sem infestação. A cada 45 dias, foram retiradas amostras, para posterior análise físico-química, (teor de água, cinzas, proteína total e variação populacional de insetos), microbiológicas (contagem de fungos filamentosos e identificação dos fungos produtores de desoxinivalenol) e de quantificação de desoxinivalenol, para as três temperaturas no tempo inicial e de 135 dias com e sem infestação. As amostras foram avaliadas pelo emprego da análise de variância (ANOVA) e para o teste de comparação de médias foi aplicado o teste de Tukey, com nível de 5% de significância. Observou-se que conforme aumentava o tempo de armazenamento aumentava também a população de insetos, principalmente para as temperaturas de 20 e 25 °C, reduzindo o valor do peso hectolitro em ambas as temperaturas. Em geral, o teor de água diminuiu quando ocorreu aumento de temperatura e tempo de armazenamento. Os teores de proteínas, nos tratamentos com e sem infestação, aumentaram com o tempo de armazenamento. Em geral, o teor de cinzas aumentou com o tempo de armazenamento nos grãos com e sem infestação, nas três temperaturas avaliadas. A contagem total de UFC de fungos filamentosos foi maior para grãos de trigo infestados. Os resultados obtidos mostram que todas as amostras de grãos armazenados, analisadas no tempo inicial e de 135 dias, com e sem infestação para as temperaturas de 20, 25 e 30 °C, estão dentro do limite máximo tolerável de 3000 µg de desoxinivalenol por kg de trigo.

Palavras-chave: desoxinivalenol, inseto-praga, micotoxinas, fungos.

SITOPHILUS ZEAMAI'S INFESTATION IN THE PHYSICAL-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF STORED GRAINS OF WHEAT

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of insect infestation *Sitophilus zeamais* on the physicochemical and microbiological quality in wheat grains, during storage in times of 0, 45, 90 and 135 days, in three temperatures: 20, 25 and 30 °C. For the conduct of the experiment, wheat grain samples were collected (*Triticum aestivum* L.) of the cultivar BRS Tanager, produced in Western Paraná, from the harvest of 2013. For storage, the grains had water contents below 13%, being stored about 400 g in sealed glass containers with fabric type *voil* in order to facilitate gas exchange, totaling 72 containers stored in incubator BOD the temperature of 20, 25 and 30 ° C for 135 days. Of the total of containers, 36 were infested with 20 adults of *Sitophilus zeamais* and the other 36 were kept without infestation. Every 45 days, were samples for subsequent chemical-physical analysis (moisture, ash, and total protein population variation of insects), microbiological (filamentous fungi count and identification of fungi producing of deoxynivalenol) and quantifying of deoxynivalenol for the three temperatures at baseline and 135 days with and without infestation. The samples were evaluated by the use of analysis of variance (ANOVA) and for test of comparison of means the Tukey test was applied, with 5% level of significance. It was observed that, with increased storage time, increased population of insects, mainly at temperatures of 20 and 25° C, reducing the value of the weight of the hectolitre at both temperatures. In general, the water content was reduced with increasing temperature and time of the storage. The contents of protein, in the treatments with and without infestation, increased with storage time. In general, the ash content increased with time of storage in grain, with and without infestation in the three temperatures evaluated. The total count of CFU of filamentous fungi was greater for grains of wheat infested. The results obtained indicate that all samples of grain stored, analyzed in the initial time and 135 days, with and without infestation, for use at temperatures of 20, 25 and 30 °C, are within the maximum tolerable limit of 3000 µg of deoxynivalenol per kg of wheat.

Keywords: Deoxynivalenol, insect pests, mycotoxins, fungi.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Características e cultivo do trigo.....	4
3.2 Qualidade e armazenamento dos grãos	5
3.3 Principais pragas dos grãos de trigo armazenado	6
3.3.1 <i>Sitophilus zeamais</i>	7
3.4 Fungos	8
3.5 Micotoxinas	9
3.6 Tricotecenos – desoxinivalenol.....	12
3.7 Legislação brasileira para micotoxinas em trigo	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Amostragem	16
4.2 Armazenamento	16
4.3 Delineamento experimental	17
4.4 Análises físico-químicas	17
4.4.1 Peso hectolitro (PH)	17
4.4.2 Determinação do teor de água	17
4.4.3 Determinação de teor de proteína	17
4.4.4 Determinação do teor de cinzas	18
4.4.5 Avaliação populacional de insetos.....	18
4.5 Análise microbiológica.....	18
4.5.1 Contagem de fungos filamentosos	18
4.5.2 Identificação dos fungos filamentosos	19
4.5.3 Análise de quantificação de desoxinivalenol (DON).....	19
4.6 Análises estatísticas.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Peso hectolitro.....	21

5.2	Teor de água	22
5.3	Teor de proteína.....	24
5.4	Teor de cinzas.....	25
5.5	Avaliação populacional de insetos.....	26
5.6	Avaliação de fungos filamentosos em amostra de trigo	29
5.7	Quantificação de desoxinivalenol	33
6	CONCLUSÕES	35
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICES.....	44
	APÊNDICE A TABELAS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA.....	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos. 11
- Figura 2** Estrutura química do desoxinivalenol. 13
- Figura 3** Identificação de fungos filamentosos em grãos de trigo com e sem infestação de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias de armazenamento em três temperaturas: 20, 25 e 30 °C. A- *Aspergillus* spp. B- Conídios de *Aspergillus* spp. C- *Penicillium* spp. D- Conídios de *Penicillium* spp. E- *Rhizopus* spp. F- Conídios de *Rhizopus* spp. G- *Fusarium* spp. H- *Mucor* spp. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Limite máximo tolerável de desoxinivalenol para alimentação infantil, trigo em grãos e seus derivados.....	15
Tabela 2	Peso hectolitro (kg 100 L ⁻¹) em grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C	21
Tabela 3	Teor de água para grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C	23
Tabela 4	Teor de proteínas em grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C.....	24
Tabela 5	Teor de cinzas em grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C	25
Tabela 6	Avaliação populacional de insetos em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C	27
Tabela 7	Valores de contagem de unidade formadora de colônia (UFC.g ⁻¹ x 10 ³) de fungos filamentosos em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> em quatro tempos: 0, 45, 90 e 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C.....	31
Tabela 8	Contagem de unidade formadora de colônia (UFC.g ⁻¹ x 10 ³) para os tempos 0 e 135 dias de armazenamento com infestação e sem infestação, contaminado por <i>Fusarium</i> spp, nas temperaturas: 20 25 e 30 °C e quantificação de Desoxinivalenol (DON), expresso em partícula por bilhão (µg kg ⁻¹ ppb)	33

2 INTRODUÇÃO

O trigo está presente na vida dos seres humanos há, aproximadamente, 10 mil anos. Relatos históricos evidenciam que chegou ao Brasil em 1554. Atualmente, cerca de 90% da produção de trigo encontra-se na região sul do Brasil, sendo o Paraná o principal Estado produtor.

É o segundo cereal mais produzido no mundo, ocupando posição de destaque no Brasil e tendo importância significativa na economia agrícola global. A produção agrícola brasileira é de, aproximadamente, 5 a 6 milhões de toneladas ano⁻¹ e o consumo anual tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas de trigo. O Ministério da Agricultura estimou um aumento do consumo em 1,31% ao ano (BRASIL, 2014).

O trigo é uma planta de ciclo anual, cultivada durante o inverno e a primavera, porém, como seu consumo é gradual e se distribui ao longo do ano, há necessidade de armazenamento dos grãos. Assim, torna-se necessário o monitoramento das condições estruturais dos armazéns, como a temperatura, o arejamento na massa de grãos e o teor de água, além do desenvolvimento de fungos, a presença de insetos, ácaros, roedores e pássaros, que podem causar perdas qualitativas e quantitativas.

O trigo é importante como componente alimentar e faz parte da alimentação humana diária, o que requer um controle de qualidade eficiente quanto à presença de fungos e micotoxinas, uma vez que esses podem estar presentes tanto na farinha de trigo quanto em seus derivados, mesmo quando submetidos a tratamentos térmicos, posto que as micotoxinas sejam relativamente termorresistentes (NEVES, 2013).

Durante o período de armazenagem dos grãos, devem-se ter cuidados com as pragas, seja no trigo que será usado como semente ou naquele destinado ao consumo humano. Os principais prejuízos verificados são a redução do peso, a ocorrência de micotoxinas, a depreciação da qualidade alimentícia e do poder germinativo, além da depreciação do valor comercial, devido à presença de insetos mortos, ovos e excrementos.

Cereais como o trigo, são facilmente colonizados por fungos produtores de micotoxinas, contaminando os grãos no campo, antes mesmo da colheita ou durante o armazenamento, permanecendo nos alimentos e rações destinadas ao consumo humano e animal (SIEGEL; BABUSCIO, 2011; ALBORCH *et al.*, 2012).

A qualidade dos grãos de trigo é alterada direta ou indiretamente quando estes são infectados por fungos e pela produção de micotoxinas que causam problemas a saúde. Essas toxinas são metabólicos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos,

predominantemente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sob condições ambientais oportunas (QUESLATI *et al.*, 2011).

O desoxinivalenol é uma substância conhecida como DON e vomitoxina, presente na família dos Tricotecenos, e pode ser produzida por diferentes gêneros de fungos. O gênero mais comum são os fungos *Fusarium*, mas também são destacados os gêneros *Mirothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimosporium* e *Stachybotry*.

O trigo, por ser importante fonte de renda para os produtores e base alimentar para os seres humanos, possui destaque no desenvolvimento de pesquisas, a fim de preservar a qualidade dos seus grãos após a colheita, originando menores perdas tanto em qualidade como em quantidade.

Considerando o elevado consumo de trigo pela população em geral, tanto pela diversidade de produtos industriais existentes quanto por seu baixo custo e alto valor nutricional, torna-se necessária a averiguação da incidência de contaminação por desoxinivalenol nos grãos de trigo armazenados, além de avaliar a segurança alimentar destes produtos e verificar se a qualidade nutricional está sendo afetada pelo tempo de armazenamento, tanto em grãos infestados como em não infestados pelo inseto *Sitophilus zeamais*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar grãos de trigo *Triticum aestivum* L., armazenados por 135 dias, na presença e ausência do gorgulho *Sitophilus zeamais* nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C.

3.2 Específicos

- Verificar a população de insetos *Sitophilus zeamais*, durante o armazenamento, e as perdas provocadas por estes nos grãos.

- Realizar análises físico-químicas para verificar a qualidade nutricional dos grãos de trigo relacionados com a infestação de insetos *Sitophilus zeamais*, temperatura e tempo de armazenamento.

- Realizar análise microbiológica nos grãos de trigo, quantificando as colônias de fungos totais presentes.

- Quantificar a ocorrência de desoxinivalenol, durante o armazenamento de grãos de trigo e comparar com os dados propostos pela Resolução RDC nº 7 de fevereiro de 2011, da ANVISA.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Características e cultivo do trigo

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) chegou ao Brasil no século XVI, período colonial. Com a colonização, os portugueses tentaram o cultivo desse cereal na região central do país, que hoje corresponde ao Estado de São Paulo. Depois o trigo migrou para o sul, encontrando ambiente, clima e solo mais adequados às suas exigências (EMBRAPA, 2014).

Mundialmente, é a segunda cultura mais produzida e, no Brasil, a produção anual oscila entre 5 e 6 milhões de toneladas, no entanto, o consumo anual no país tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas, sendo as regiões Sul (RS, SC e PR), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MS, GO e DF) responsáveis por 90% da produção do trigo brasileiro (EMBRAPA, 2014).

O Brasil ainda não é autossuficiente no abastecimento interno de trigo e, por isso, necessita de trigo importado para atender suas necessidades internas (COSTA *et al.*, 2008). As estimativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento preveem uma taxa de aumento de consumo do trigo de 1,31% ao ano. Ainda assim, acredita-se na possibilidade de redução das importações, uma vez que o Brasil vem investindo na autossuficiência da produção interna do cereal, através de novas tecnologias de cultivos (BRASIL, 2014).

É um cereal amplamente consumido pelos seres humanos nos países de produção primária (os quais contabilizam mais de 100) e, em outros países onde não é adaptado para a produção. Entretanto, ainda não há estatísticas disponíveis, a respeito do volume de trigo consumido pelos humanos em relação ao que serve para alimentação animal (SHEWRI, 2009).

O trigo é um dos mais nobres alimentos, pois, apresenta em sua composição carboidratos, proteínas, fibras e boa digestibilidade. Utilizado na fabricação dos mais variados alimentos, com destaque para o pão, é um alimento de fácil consumo e relativamente barato em todo o mundo (SAFRAS & MERCADO, 2014; SCHEUER *et al.*, 2011).

A qualidade do trigo é um conceito relativo, pois os atributos considerados para essa análise não são os mesmos nos diferentes "elos da cadeia". No caso do produtor rural, o trigo de qualidade superior é aquele que possui boas características agrônômicas, como resistência a doenças e pragas, alto potencial produtivo e alto peso hectolitro. Para os moinhos, a qualidade será medida pela uniformidade do tamanho e forma da matéria-prima,

alto peso específico, alto rendimento em farinhas e baixos teores de cinza. Já o panificador busca adquirir uma farinha com alta capacidade de absorção de água, boa tolerância ao amassamento e alta porcentagem de proteína. Desta forma, para que se possa garantir a qualidade geral exigida em todos os "elos da cadeia", devem ser considerados diversos atributos, balanceando-se a qualidade produtiva com as características desejadas pelos consumidores (ROSSI; NEVES, 2004).

4.2 Qualidade e armazenamento dos grãos

A definição de armazenagem surge com a observação da alternância entre períodos de fartura e de escassez e está diretamente relacionada com a necessidade de abastecimento dos povos (RODRIGUES, 2006).

A fase de armazenamento é fundamental, pois qualquer perda neste período reduz diretamente o produto final, pronto para a comercialização. Os principais fatores que se destacam nessa fase são: a umidade e a impureza dos grãos, a falta de estruturas armazenadoras e a presença de insetos-praga (LAHÓZ, 2008).

Devido às entressafras e aos períodos de seca, os grãos precisam ficar armazenados de um ano para outro com a finalidade de suprir as demandas, preservando as características e a qualidade dos grãos ao longo do tempo. No entanto, se as condições de armazenamento não forem adequadas estes grãos ficam suscetíveis à deterioração (TRAVAGLIA, 2011).

Segundo Lorini *et al.* (2009), a contaminação dos grãos de trigo pode ocorrer na lavoura, na colheita e/ou no processamento, mas também durante o armazenamento dos grãos.

Os principais fatores que podem comprometer a qualidade dos grãos, durante o armazenamento, são as condições estruturais do armazém ou silo; o arejamento, a temperatura e o volume da massa de grãos; a umidade; o desenvolvimento de fungos, a presença de insetos, ácaros, roedores e pássaros e o período de estocagem (CRUZ *et al.*, 2011; TRAVAGLIA, 2011).

O método convencional mais utilizado atualmente para controlar os insetos-pragas de grãos armazenados tem sido o uso de inseticidas químicos que, além de causar problemas maiores de resistência dos insetos aos inseticidas, tendo mais de 540 espécies de insetos resistentes, eles podem acarretar problemas de saúde para os seres humanos e períodos de carência específicos que nem sempre são respeitados (LORINI, 1998; VASSANACHAROEN *et al.*, 2008).

4.3 Principais pragas dos grãos de trigo armazenado

Os insetos-praga são insetos que sobrevivem e se multiplicam em grãos e outros produtos armazenados e causam perdas econômicas, por isso requerem a utilização de métodos de controle adequados para minimizar tais perdas. O caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*), a traça-dos-cereais (*Sitotroga cerealella*) e o besourinho-broqueador-dos-grãos (*Rhyzopertha dominica*) são exemplos de insetos-praga de grãos armazenados (CRUZ *et al.*, 2011).

A problemática das pragas tem origem por diversos fatores, dentre os quais se destacam a inadequada estrutura armazenadora, composta em sua maioria, por armazéns graneleiros de grande capacidade estática, com sistema deficiente ou inexistente de controle de temperatura e ausência quase total de sistemas de aeração. Assim, depois de limpos e secos, os grãos são colocados nesses armazéns, onde permanecem depositados até a retirada para consumo, sem que ocorra um monitoramento da massa de grãos para verificação da temperatura, da umidade, da presença de insetos, de dejetos e fragmentos/impurezas, situações que podem determinar perdas quantitativas e qualitativas (LORINI, 2008; HERMANN *et al.*, 2009).

De acordo com Lorini (2012), as perdas de grãos ocasionadas por pragas em armazéns, pela presença de fragmentos de insetos em subprodutos alimentares, pela deterioração da massa de grãos, pela contaminação fúngica e a presença de micotoxinas, que causam efeitos danosos sobre a saúde humana e animal, dificuldades para exportação de produtos e subprodutos brasileiros, devido ao potencial de risco, são alguns dos problemas que a armazenagem inadequada de grãos tem produzido no Brasil.

Os insetos, ao perfurarem os grãos e exporem o tegumento, facilitam a entrada de microrganismos como fungos que iniciam o processo de deterioração do grão, produzindo micotoxinas (sendo comum a aflatoxina) de extrema toxidez aos homens e animais. As massas de graneleiras comprometidas por estes componentes tóxicos são inviabilizadas para o processamento industrial (PUZZI, 1973).

Segundo Aquino e Potenza (2013), o armazenamento de rações contendo pragas primárias e secundárias, associadas aos fungos toxigênicos, representam um risco potencial para a produção de micotoxinas nos substratos e afetam a sanidade dos animais domésticos.

As perdas em produtos armazenados podem atingir até 30% em alguns casos, das quais 10% causadas diretamente pelo ataque de pragas durante o armazenamento (SCHÖLLER *et al.*, 1997). Geralmente, insetos de grãos armazenados apresentam elevada

densidade populacional e diversidade, além de grande variedade de respostas à qualidade e à quantidade de recursos disponíveis (COPATTI; GASPARETTO, 2012).

Ausência de pragas no armazenamento é de suma importância, para a preservação da qualidade do produto armazenado. Nesse sentido, a Portaria nº 74, de 4 de agosto de 1994, do Ministério da Saúde, estabelece, em seu artigo 1º, o limite máximo de tolerância de 75 (setenta e cinco) fragmentos de insetos, ao nível do microscópio, em 50 (cinquenta) gramas de farinha de trigo, na média de 3 (três) amostras, não sendo tolerada qualquer indicação de infestação viva. O artigo 2º da referida portaria estabelece o limite máximo de tolerância de 225 (duzentos e vinte e cinco) fragmentos de insetos, ao nível do microscópio, em 225 (duzentos e vinte e cinco) gramas do produto, para os derivados, tais como: massas alimentícias, biscoitos, produtos de panificação e de confeitaria, na média de 3 (três) amostras (ANVISA, 2011).

4.3.1 *Sitophilus zeamais*

O *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecido como gorgulho-do-milho é uma das pragas mais destrutivas de grãos armazenados em todo o mundo. Estes insetos são os maiores causadores de perdas físicas, além de serem responsáveis pela perda na qualidade de grãos e subprodutos (LORINI, 2003).

Essa espécie apresenta infestação cruzada, que é a capacidade de infestar os grãos tanto no campo quanto no armazenamento, possuindo elevado potencial de multiplicação e possui muitos hospedeiros como trigo, arroz, milho, cevada e triticale. Tanto larvas como adultos são prejudiciais e atacam sementes inteiras. A postura é feita dentro da semente e as larvas, após se desenvolverem, empupam e se transformam em adultos. Os danos decorrem da redução de peso e da qualidade física e fisiológica da semente (SILVEIRA *et al.*, 2006; LORINI, 2008).

O inseto é um bom voador podendo infestar os grãos antes da colheita e infestar armazéns vizinhos. Vive de 4 a 5 meses em condições ótimas, sendo o ciclo vital de 4 semanas, porém este ciclo depende da temperatura, umidade relativa do ar e características físico-químicas do grão, como umidade, dureza e disposição de nutrientes. Em temperaturas mais elevadas (30 °C), com umidade do ar de 70% e grãos dentados e macios, com 13,5% de umidade do grão, o ciclo biológico pode ser até 10 dias mais curto, em relação ao ciclo regular deste mesmo inseto, mas em condições não tão favoráveis ao seu desenvolvimento (SANTOS, 1993; REES, 1996; VENDRAMIM, 2002).

A temperatura ótima de desenvolvimento do *Sitophilus zeamais* é em torno de 27 °C, embora possa se desenvolver entre 15 e 34 °C. Possui preferência para ovipositar em milho

e trigo, alimenta-se principalmente do endosperma onde se encontra grande quantidade dos carboidratos e proteínas de interesse para panificação (gliadina e glutenina) (PINTO *et al.*, 2002). Segundo Santos (2008), pode também se desenvolver em produtos processados como macarrão ou mandioca desidratada.

Além desses produtos, Botton, Lorini e Afonso (2005) verificaram a ocorrência de *S. zeamais* na cultura da videira no Rio Grande do Sul, atacando as bagas em fase de maturação. Observaram, também, que todos os parreirais nos quais foram constatados danos por esse inseto, estavam próximos a silos ou a paióis de milho, que não possuíam o controle de insetos.

Em países como os Estados Unidos, onde o gorgulho é considerado um dos insetos-praga mais importantes do milho, há relatos da utilização de cultivares resistentes deste a década de 1990. A utilização desses cultivares chegou a reduzir a infestação, em alguns casos, em mais de 40% (VENDRAMIM, 2002).

4.4 Fungos

Os micro-organismos de interesse em alimentos são distribuídos em três grandes grupos: bactérias, leveduras e fungos. Certos vírus e parasitas são também geradores de problemas de saúde pública, podendo ser veiculados por alimentos (ANDRADE, 2006). Segundo Trabulsi (2008), os fungos são organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos em um micélio contínuo ou septado e sua nutrição é obtida por absorção. São organismos saprofíticos parasitas facultativos ou biotróficos e possuem crescimento como célula única (leveduras) ou como colônias filamentosas multicelulares (fungos filamentosos).

Os fungos são amplamente distribuídos na natureza, mas necessitam de substrato para o seu crescimento. Por isso, são contaminantes corriqueiros de alimentos, grãos e rações, os quais contêm nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídeos, constituintes apropriados para o seu pleno desenvolvimento, ocasionando degradação e produção de micotoxinas (MEIRELES *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2010).

A ocorrência de fungos em produtos armazenados é um grande problema e uma situação que facilita a sua proliferação em unidades armazenadoras ocorre quando grãos trincados e quebrados, removidos na operação de limpeza, não são adequadamente armazenados. Assim, pode ocorrer que esse produto apresente níveis de toxinas acima do permitido e contamine a massa de grãos, quando acrescido durante a expedição (SILVA, 2010).

As condições climáticas de um país determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que podem produzir. No Brasil, existem

condições propícias para o crescimento de todo tipo de fungos produtores de micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

A infestação de grãos por fungos pode ocorrer: no campo, no período entre a colheita e o pré-processamento, e durante a armazenagem. Para cada uma dessas situações o teor de umidade dos grãos define um determinado nível de atividade aquosa para o qual prevalece uma determinada espécie de fungo (SILVA, 2010).

Os fungos filamentosos adaptados para o ambiente terrestre são geralmente reconhecidos como os produtores de micotoxinas, produzidas, principalmente, pela estrutura micelial desses fungos, pertencentes a espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* presentes no solo e que podem crescer em alimentos, durante o armazenamento em condições favoráveis de temperatura, umidade e atividade de água (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

O gênero *Fusarium* é classificado como fungo de campo, pois geralmente ataca as plantas no período de crescimento e maturação, produzindo micotoxinas antes e imediatamente após a colheita, mas algumas espécies podem infectar grãos durante o armazenamento. Já os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são classificados como fungos de armazenamento, pois são comumente encontrados desenvolvendo-se e produzindo suas toxinas em grãos durante o armazenamento, com umidade abaixo de 17%, mas certas espécies desses gêneros são capazes de infectar grãos no campo (PITT, 2000; RICHARD *et al.*, 2003; SILVA, 2008).

Segundo Ferrari Filho (2011), os fungos do gênero *Fusarium* e *Penicillium* predominam tanto no campo como no armazém. O gênero *Aspergillus* tem grande número de espécies presentes em diversos nichos ecológicos. Embora sejam distribuídos mundialmente, esses fungos são mais comuns em clima subtropical e temperado quente. Entre eles encontra-se o *Aspergillus flavus*, produtor de aflatoxinas e que é mesofílico, com temperatura ótima para crescimento entre 35 e 38 °C, mínimo entre 8 e 15 °C e máximo entre 40 e 45 °C (DHINGRA; COELHO NETTO, 1998; RICHARD *et al.*, 2003).

Os fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e a produção de toxinas são classificados em três categorias: fatores físicos, químicos e biológicos: tais como, umidade relativa, conteúdo de umidade, temperatura, luz e danos mecânicos entre outros (SCUSSEL, 1998).

4.5 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos predominantemente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sob

condições ambientais oportunas. Os metabólicos primários são essenciais ao desenvolvimento e crescimento e os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente. Em geral, os metabólicos secundários parecem ser formados quando possuem grandes quantidades de precursores metabólicos primários, tais como aminoácidos acetato, piruvato e outros são acumulados (FREIRE 2007; QUESLATI *et al.*, 2011).

As micotoxinas são ubíquas em produtos agroalimentares, acabando por serem ingeridas involuntariamente, quando produtos de origem vegetal contaminados são consumidos. Por ser um contaminante natural, não é possível eliminar completamente a sua presença nos alimentos, mas o seu nível pode e deve ser reduzido tanto quanto seja tecnologicamente possível, para que não representem risco para a saúde pública (BENNET; KLICH, 2003).

As micotoxinas caracterizaram-se como um dos maiores desastres econômicos ocorridos na Inglaterra, quando cerca de 100.000 perus morreram por causa desconhecida. As aves adoeciam, tornavam-se apáticas, perdiam as forças e morriam em aproximadamente uma semana. Após intensos estudos, verificou-se que as aves morriam por necrose hepática, ocasionada pela ingestão de quantidades significativas de aflatoxina B1, presente na ração oferecida aos animais (CALDAS NETO *et al.*, 2008).

Em 2008, casos de intoxicação por citreoviridina, uma micotoxina, foram diagnosticados no Brasil, no estado do Maranhão, a partir do consumo de arroz contaminado, provocando quadros clínicos de beribéri e levando dezenas de pessoas à morte pela deficiência de vitamina B1 (HOELTZ *et al.*, 2008; LIRA; ANDRADE, 2008).

A produção de micotoxina depende do crescimento fúngico, por conseguinte pode ocorrer em qualquer época de cultivo, colheita ou estocagem dos alimentos, e essas podem permanecer nos grãos mesmo após desaparecimento dos seus fungos produtores, porém, o desenvolvimento fúngico e a produção de toxinas não são sinônimos, visto que nem sempre as melhores condições de crescimento coincidem com as de síntese (TANIWAKI, SILVA, 2001; KAWASHIMA, 2004). Os fungos toxigênicos podem crescer em vários substratos, mas as condições em que as micotoxinas são formadas são específicas de um gênero ou até mesmo de uma espécie fúngica (COPPOCK; JACOBSEN, 2009).

As micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos e encontradas em alguns alimentos, principalmente em grãos. A ingestão dessas substâncias em grande quantidade pode causar sérios problemas para a saúde da população como: cirrose hepática, necrose aguda e até mesmo o câncer. A contaminação de alimentos por micotoxinas está ligada, principalmente, ao manejo incorreto das plantações e as condições de umidade e temperatura de armazenagem do alimento. Uma secagem rápida e adequada do produto é a melhor forma de prevenção (BRITO 2010).

Cerca de 400 tipos de micotoxinas foram descobertas e são classificadas em grupos, com base nas similaridades estruturais e nos seus principais efeitos tóxicos. As mais frequentes nos alimentos e ração são: aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A, citrina, tricotocenos, patulina, ácido penicílico e alcalóides do ergot (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Os riscos para a saúde humana são normalmente associados ao consumo direto de alimentos contaminados com micotoxinas. Várias destas toxinas podem ser produzidas antes da colheita (aflatoxinas, desoxinivalenol), enquanto outras são produzidas, principalmente, durante as fases de pós-colheita (fumonisina, ocratoxina). Os sintomas gerais das micotoxicoses em humanos são vômitos, diarreia e outros problemas gastrointestinais associados. Dependem da quantidade e duração da exposição, idade e estado nutricional dos indivíduos. A exposição crônica a micotoxinas pode induzir ao câncer, toxicidade hepática, renal, imunossupressão (BENNET; KLICH, 2003).

As micotoxinas costumam ser termoestável, a abordagem preventiva em relação a elas é de suma importância. Evitar a contaminação pelos fungos é, frequentemente, impossível, visto que os principais bolores toxigênicos são bastante disseminados pelo ambiente. Portanto, restam estratégias ligadas à utilização de linhagens de plantas resistentes a colonização fúngica, colheita apropriada, estocagem adequada, controle de insetos e roedores, controle de temperatura, umidade, tempo de estocagem dentro dos limites de vitalidade dos grãos e, eventualmente, irradiação dos grãos (BRASIL, 2009).

Na Figura 1 visualiza-se o ciclo dos fatores que influenciam na ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos, podendo-se verificar que a temperatura e a umidade são fatores importantes para o desenvolvimento das micotoxinas e que estas podem desenvolver-se ainda na lavoura e, quando não detectadas nas diversas etapas do ciclo, prosseguem na cadeia alimentar até serem ingeridas pelos humanos.

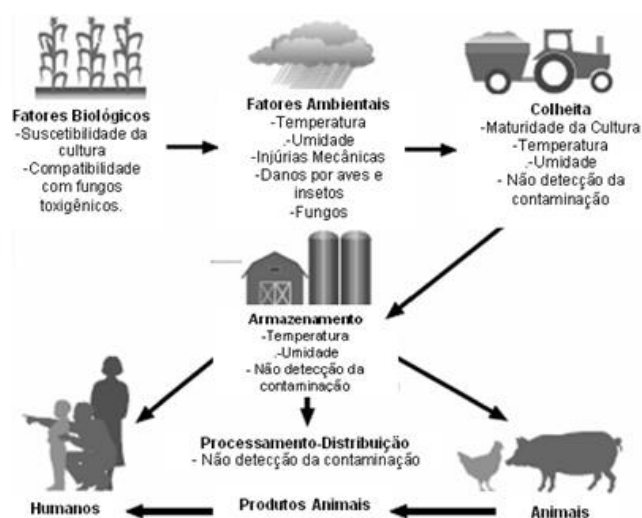


Figura 1 Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos.

Fonte: Paterson e Lima (2009).

O controle de qualidade, para garantir alimentos seguros no momento do consumo humano ou animal, é questão prioritária em todas as cadeias produtivas. Para o trigo, a presença de contaminantes químicos como resíduos de agrotóxicos e micotoxinas é visualmente imperceptível no produto final e um dos atuais desafios na produção de alimentos com qualidade (TIBOLA, 2013).

Considerando a presença frequente destas micotoxinas nos grãos de trigo e, conseqüentemente, em seus derivados, é importante a monitorização de toda a cadeia produtiva, com o intuito de evitar condições que sejam ideais para o desenvolvimento desses fungos e a posterior produção de micotoxinas.

Geralmente, os grãos armazenados com teor de umidade igual ou menor a 0,70 de Aw (teor de água < 14,5% de umidade em peso) não estão sujeitos à deterioração por fungos e produção de micotoxinas. O perigo das micotoxinas é, portanto, associado a um risco significativo na produção de grãos em situação de pós-colheita. A secagem do material recém-colhido até 0,70 Aw e a manutenção nessa condição evita a contaminação dos grãos. O trigo sofre a primeira transformação na moagem para a produção de farinha. Esta farinha produzida também está suscetível às micotoxinas. Portanto, a produção, armazenamento e transporte de farinha requerem, essencialmente, o mesmo tipo de gestão que os cereais (ALFRED; MAGAN, 2004).

Nos países em desenvolvimento, a exposição a micotoxinas ocorre com mais facilidade uma vez que as práticas agrícolas, os métodos de armazenamento e a legislação são inadequados (WILD; GONG, 2010).

A influência da atividade da água e da temperatura no crescimento de fungos e na produção de micotoxinas deve ser considerada uma forma de preservar as características dos grãos (NOUREDDINE; KIM; STRELKOV, 2009).

Dentre as micotoxinas encontradas no trigo está o desoxinivalenol produzido por fungos do gênero *Fusarium*.

4.6 Tricotecenos – desoxinivalenol

O desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina do grupo dos tricotecenos e também é conhecido como vomitoxina, isso pelo fato de a principal resposta fisiológica aos tricotecenos ser a perda de apetite (toxina da recusa de alimento) (KNOW MYCOTOXINS, 2008).

As características estruturais mais importantes, quanto à atividade biológica dos tricotecenos, estão no anel epóxi nos C-12 e C-13, na presença de grupamentos hidroxila ou acetila e na estrutura e posição das cadeias laterais (KNOW MYCOTOXINS, 2008). Os tricotecenos podem ser divididos em 4 tipos (A, B, C ou D), de acordo com as características dos seus grupos funcionais.

O desoxinivalenol (3 α 7 α 15-triidroxi-12, 13-epoxitricotec-9-en-8-ona) é a micotoxina mais frequentemente detectada dentro da categoria dos tricotecenos do tipo B, que possuem uma função carbonil no C-8 que foi totalmente caracterizada como um tetracíclico, epoxi-sesquiterpe com sete centros estéreos. Sua estrutura química está representada na Figura 2 (ERIKSEN; ALEXANDER, 1998; TÜRKER; GÜMÜS, 2009).

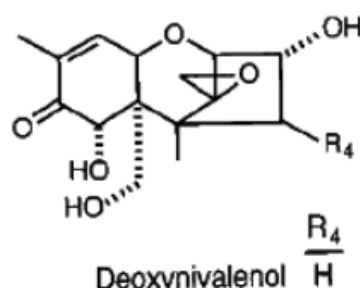


Figura 2 Estrutura química do desoxinivalenol.

Fonte: Desjardins *et al.* (2000).

O desoxinivalenol possui dois grupos OH alcoólicos secundários e um principal, além da presença de dois grupos funcionais quimicamente reativos, ou seja, uma cetona conjugada e um anel epóxi. Pelo menos uma, mas talvez estas duas funcionalidades possam estar associadas à atividade tóxica do desoxinivalenol (NAGY *et al.*, 2005).

Sendo um tricoteceno do tipo B, esta toxina é solúvel tanto em água quanto em solventes polares como o metanol aquoso, acetonitrila aquosa e acetato de etila. O grupo 12,13-epoxi é extremamente estável ao ataque nucleofílico e a toxina é estável à temperatura de 120 °C e não é decomposta em condições levemente ácidas (JARVIS *et al.*, 1990; NAGY *et al.*, 2005; TÜRKER; GÜMÜS, 2009).

Todos os tricotecenos contêm o grupo epóxi nas posições C12 e C13, e estes são os responsáveis por sua atividade toxicológica. A produção destas micotoxinas se dá, especialmente, por espécies de fungos do gênero *Fusarium* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae*. e *Fusarium equiseti*.) (MOAZAMI; JINAP, 2009).

Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, que podem causar aos homens e animais doenças e sintomas tais como: vômitos, hemorragias, recusa de alimento, necrose da epiderme, redução do ganho de peso e da produção de ovos e leite, interferência no sistema imunológico e óbito. Ocorrem em grãos como o milho, trigo, cevada e outros. As micotoxinas mais comuns da família dos tricotecenos são

desoxinivalenol (DON) e T-2, sendo, provavelmente, a micotoxina mais largamente distribuída em alimentos e rações (MILLER, 1995; SILVA, 2010).

Os fungos patógenos do gênero *Fusarium* são comumente encontrados no trigo e estão frequentemente associados à fusariose (CALORI-DOMINGUES *et al.*, 2007). Além dos danos diretos à cultura, causados pela doença, os grãos infectados podem apresentar contaminação por micotoxinas tóxicas tanto para o homem quanto para os animais.

Ramirez, Chulze e Magan (2006) compararam o crescimento e a produção de DON pelas linhagens *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* do Reino Unido e descobriram que a principal diferença entre elas foi o efeito da temperatura sobre a produção de DON. Esse estudo também sugere que o *Fusarium graminearum* não cresce em Aw menor que 0,900.

No estudo de Ramirez, Chulze e Magan (2006) variaram-se a Aw (0,900 a 0,995), a temperatura (5, 15, 25 e 30 °C) e o tempo de incubação (7 a 49 dias) e foram avaliados os efeitos no crescimento e na produção de DON por 2 linhagens de *F. graminearum* (RC 17-2 e RC 22-2) isoladas de trigo argentino. A faixa de Aw e de temperatura simulam o amadurecimento do grão na colheita de uma safra úmida. O crescimento ótimo aconteceu a 25 °C em trigos com os maiores valores de Aw. A máxima produção de DON foi obtida para ambas as linhagens quando a Aw foi de 0,995, a 30 °C e em 42 dias de incubação (135,462 e 98,446 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente).

Segundo Iamanaka, Oliveira e Taniwaki (2010), o animal doméstico mais afetado é o suíno. A toxicose aguda é manifestada como uma desordem intestinal. O DON raramente causa uma toxicidade aguda porque a sua presença na ração faz o animal rejeitar a ração. Este efeito resulta no decréscimo do crescimento do animal, além dos efeitos reprodutivos incluindo o aborto e o nascimento enfraquecido. As aves são mais tolerantes do que os suínos quanto à presença de DON na dieta, embora a qualidade do ovo e o peso possam ser reduzidos. O gado também é mais tolerante do que os suínos, possivelmente devido à degradação da toxina em metabólitos secundários no rúmem. Os efeitos no gado incluem redução no consumo da ração e taxa de concepção. Os grãos naturalmente contaminados com o DON podem afetar a produção de leite, inibir a síntese de DNA, RNA e de proteínas e causar síndromes hemáticas e anoréxicas nos mamíferos, bem como efeitos neurotóxicos e imunotóxicos (VISCONTI *et al.*, 2004).

Verifica-se um aumento na preocupação com a contaminação de alimentos por micotoxinas, incluindo-se o DON, tanto mundialmente quanto no Brasil. Assim, conhecer a extensão dessa contaminação poderá fornecer subsídios para os diversos segmentos envolvidos com a produção, utilização e importação de trigo, bem como fiscalização e pesquisa, sempre visando garantir ao consumidor final a possibilidade de ter produtos de melhor qualidade (CALORI-DOMINGUES *et al.*, 2007).

4.7 Legislação brasileira para micotoxinas em trigo

Com a intensificação do monitoramento da contaminação de grãos e subprodutos por micotoxinas e o maior conhecimento de seus efeitos maléficos, os limites máximos tolerados em normativas de vários países são cada vez mais restritivos. O impacto dessa medida, que pode resultar em prejuízos na cadeia produtiva, visa assegurar que os alimentos produzidos com a matéria prima não apresentem contaminantes acima dos níveis aceitáveis. Assim, torna-se necessária a adoção de práticas de manejo da cultura e controle da doença no campo, bem como na pós-colheita, que contribuam para minimizar o risco de contaminação (TIBOLA *et al.*, 2013).

No Brasil, a ANVISA em sua Resolução nº. 7, de 18 de fevereiro de 2011, estabelece o limite máximo tolerável (LMT) de desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) e ocratoxina A (OCRA), para cereais destinados à alimentação humana (ANVISA, 2011).

Para produtos destinados à alimentação infantil os níveis são menores e com vigência imediata, a partir da publicação da legislação (Tabela 1). Os níveis tolerados nos demais alimentos destinados ao consumo humano são, progressivamente, mais restritivos.

Tabela 1 Limite máximo tolerável de desoxinivalenol para alimentação infantil, trigo em grãos e seus derivados

Ano		2011	2012	2014	2016
Micotoxina	Produto	LMT (ppb)	LMT (ppb)	LMT (ppb)	LMT (ppb)
Desoxinivalenol	Alimentação infantil	200	200	200	200
	Trigo em grãos	-	-	3000	3000
	Trigo integral e farelos	-	2000	1500	1000
	Produtos derivados do trigo	-	1750	1250	750

Notas: LMT = Limite Máximo Tolerável; ppp = partícula por bilhão.

Fonte: ANVISA (2011).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle de Qualidade (LACON), Laboratório de Armazenagem e Protótipos de Instalações de Secagem (LAPIS), Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Laboratório de Saneamento Ambiental (LASAM) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), localizados no *campus* de Cascavel.

Foram utilizadas amostras de grãos de trigo (*Triticum aestivum L*) do cultivar BRS Tangará, produzido na região Oeste do Paraná, provenientes da safra de 2013. As amostras foram obtidas no momento da chegada dos grãos à unidade armazenadora. Logo após a recepção, as amostras foram secadas em secador, até atingirem um teor de água abaixo de 13% b.u.

As amostras foram transportadas para os Laboratórios da UNIOESTE e foram retiradas as impurezas e as matérias estranhas por um processo de peneiramento da massa de grãos.

5.2 Armazenamento

Os grãos foram acondicionados em recipientes de vidros com capacidade para 0,530 mL. Em cada frasco foram colocados 400 g de grãos de trigo, totalizando 72 amostras.

Os recipientes foram fechados com tecido tipo *voil*, a fim de facilitar as trocas gasosas; 36 amostras foram submetidas à infestação de 20 insetos adultos de *Sitophilus zeamais* (Gorgulhos dos cereais) e 36 não foram submetidas a nenhum tipo de infestação (testemunha). As amostras (com e sem insetos) foram armazenadas por um período de 135 dias, sendo ambas retiradas a cada 45 dias em câmara incubadora B.O.D. a temperaturas de 20, 25 e 30 °C, simulando três condições de armazenamento para os grãos, cada tratamento foi constituído de 3 repetições.

Foram realizadas análises físico-químicas e toxicológicas no início do armazenamento e, periodicamente, aos 45, 90 e 135 dias, em 3 amostras de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente .

5.3 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido através de um fatorial 2 x 3 x 4 dos tratamentos compostos pela combinação de duas condições: infestações inicial (I) e não infestados (NI); três temperaturas: 20, 25 e 30 °C; quatro tempos de armazenamento: 0, 45, 90 e 135 dias, instalados num delineamento inteiramente casualizado, com três repetições em cada tratamento.

5.4 Análises físico-químicas

Foram realizadas análises referentes ao teor de água, peso hectolitro, variação populacional de insetos, teor de proteínas e cinzas. As análises foram realizadas em três repetições e o resultado final foi obtido pela média.

5.4.1 Peso hectolitro (PH)

O PH foi determinado em balança Dalle Molle e expresso em kg 100L⁻¹, realizado de acordo com a metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento descrita em *Regras para análise de sementes* (BRASIL, 1992).

5.4.2 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água das amostras foi realizada de acordo com as *Regras para análise de sementes* (BRASIL, 2009). Foram pesados 10 g de amostra de cada tratamento e levados para estufa de secagem em temperatura de 105 ± 3 °C por 24 h. Após este período, as amostras foram retiradas, deixando-as resfriarem no dessecador até temperatura ambiente, e posteriormente pesadas. A determinação do teor de água das amostras se dá pela diferença de massas antes e após secagem em estufa.

5.4.3 Determinação de teor de proteína

O teor de proteínas das amostras foi obtido através do método de Kjeldahl, segundo metodologia de Instituto Adolfo Lutz, que se baseia em três etapas: digestão, destilação e

titulação (IAL, 2008). Foram pesados 0,2 g da amostra, colocada em tubo digestor de proteína micro Kjeldahl com 0,5 g de mistura digestora e 3 mL de ácido sulfúrico. Foi realizada a digestão, com os tubos dispostos no bloco digestor à temperatura de 35 °C, dentro de uma capela, até a solução se tornar azul-esverdeada. Após o resfriamento, as amostras seguiam para a etapa de destilação, onde os tubos foram colocados em um destilador de nitrogênio, da marca Tecnal (modelo TE 0363) para que a amônia fosse liberada da solução pela reação com hidróxido de sódio e recebida numa solução de ácido bórico. Na última etapa, foi realizada a titulação com ácido clorídrico a 0,11 M até a coloração rósea.

Após determinar a percentagem de nitrogênio da amostra, o valor foi multiplicado pelo fator de conversão 5,83.

5.4.4 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas das amostras foi obtido pelo método de incineração em mufla a 550 °C, segundo metodologia de Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Foram pesados 5 g da amostra em cápsula de porcelana, colocados em mufla, em temperatura de 550 °C até a eliminação completa do carvão, as cinzas encontravam-se brancas ou ligeiramente acinzentadas. A determinação do teor de cinzas ocorreu por diferença de massas.

5.4.5 Avaliação populacional de insetos

A avaliação populacional de insetos foi determinada pelo número de insetos sobreviventes, mortos e totais de insetos, a partir do número inicial de infestação que foi de 20 insetos adultos de *Sitophilus zeamais*.

5.5 Análise microbiológica

5.5.1 Contagem de fungos filamentosos

A contagem de fungos filamentosos UFC foi realizado segundo proposto por Silva, Junqueira e Silveira (2007). Foram pesados 10 g da amostra e adicionados 90 mL de água peptonada (0,1%). Em seguida, foram preparadas diluições decimais até 10^{-3} para posterior inoculação de alíquotas de 0,2 mL de cada, sobre a superfície de placas de Petri contendo

Agar Dextrose Batata (BDA) acidificado com ácido tartárico a 10% para atingir pH $3,5 \pm 0,1$, as quais foram incubadas por cinco dias a 25 °C, em câmara BOD, da marca Tecnal (TE 391). Procedeu-se a contagem de unidade formadora de colônias (UFC), contabilizando as colônias totais de fungos filamentosos e multiplicando-se pelo inverso da diluição inoculada. Para os dados obtidos, foi calculada uma média geral para as diluições em cada lote. Para a análise estatística, contabilizaram-se somente as placas que continham entre 15 a 150 UFC.

5.5.2 Identificação dos fungos filamentosos

A identificação dos fungos filamentosos foi realizada pela técnica de microcultivo, segundo Brasil (2004), em continuidade à determinação e contagem de fungos filamentosos.

Em uma placa de Petri esterilizada, com fundo composto por papel filtro qualitativo, foram colocadas duas lâminas também estéreis. Colônias típicas das placas com BDA foram repicadas e um cubo foi disposto sobre a lâmina, cobrindo-se com lamínula esterilizada. Foi feita uma câmara úmida ao fundo da placa de Petri, adicionando 1 a 2 mL de água destilada também estéril, a placa foi tampada e incubada por um período de três a cinco dias a 25 °C. Após o período de incubação, a lamínula foi retirada, com auxílio de uma pinça, e acrescentada uma gota do corante Lactofenol-algodão, para posterior identificação em microscópio óptico com objetiva de 40 X características como: tipo, disposição das hifas septadas ou cenocítica, hialina ou demácia e formação de esporos.

5.5.3 Análise de quantificação de desoxinivalenol (DON)

As análises de desoxinivalenol nos grãos de trigo foram identificadas e quantificadas pelo laboratório A3Q, localizado na cidade de Cascavel – PR. O método empregado foi imunocromatográfico. Os valores foram expressos em mg kg^{-1} (ppm), e transformados em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb).

5.6 Análises estatísticas

Os resultados da qualidade físico-químicas dos grãos de trigo com e sem infestação, em relação ao peso hectolitro (PH) de teor de água, proteínas, cinzas e avaliação populacional de insetos foram avaliados quanto à normalidade e submetidos ao teste de aderência Kolmogorov-Smirnov & *Lillefors test for normaly*, quando os dados não atenderam

ao pressuposto de normalidade (p -valor > 0,05), foram transformados em \sqrt{x} . A partir disso, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), para comparação das médias utilizando o teste de Tukey a 5% de significância. Foram consideradas significativas as diferenças cujo $p < 0,05$.

Os dados microbiológicos de fungos filamentosos (*Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Rhizopus* spp, *Fusarium* spp e *Mucor* spp) encontrados nas amostras de trigo com e sem infestação, com identificação até gênero.

Os resultados foram submetidos à normalidade, pelo teste de *Shapiro Wilk normaly* e foram transformados em $\log(x)$ para posterior análise, utilizando estatística não-paramétrica, para amostras independentes pelo Teste de Mann Whitney.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Peso hectolitro

A interação entre temperatura e infestação, temperatura e tempo e infestação e tempo foram significativos a 5% de significância.

As médias de peso hectolitro dos grãos com e sem infestação inicial, em diferentes tempos de armazenamento e temperaturas apresentaram coeficiente de variação de 2,28%, indicando baixa dispersão dos dados.

Os valores médios do peso hectolitro determinados em grãos de trigo armazenado em quatro tempos (0, 45, 90, 135 dias), nas condições com e sem infestação e em três diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Peso hectolitro (kg 100 L⁻¹) em grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Tempo de Armazenamento (dias)	Infestação inicial	Temperatura		
		20 °C	25 °C	30 °C
0	I	77,80 aA	77,59 aA	77,56 aA
	NI	77,71 aA	77,72 aA	77,66 aA
45	I	72,46 aA	70,38 aA	77,30 bA
	NI	76,01 aB	74,36 aB	77,34 aA
90	I	72,01 aA	70,03 aA	76,92 bA
	NI	75,72 aB	75,08 aB	76,91 aA
135	I	69,87 bA	65,22 aA	77,12 cA
	NI	74,52 aB	74,54 aB	76,72 aA

Notas: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Quando avaliadas as temperaturas, em cada tempo de armazenamento, verificou-se que o peso hectolitro na temperatura de 30 °C difere das demais temperaturas nos grãos infestados, exceto no tempo 0, no entanto, para grãos não infestados não ocorrem diferenças significativas entre as temperaturas. Para a temperatura de 30 °C, as médias foram semelhantes para o grau de infestação, no entanto, apresentaram maior peso hectolitro para todos os tempos avaliados com exceção do tempo 0. A menor média ocorreu no tempo de 135 dias a 25 °C, com infestação, indicando que a infestação dos grãos altera o seu valor.

Observou-se, de modo geral, que o PH apresentou melhor qualidade na temperatura de 30 °C, o que ocorreu devido ao menor número de insetos que se desenvolveram nessa temperatura. As menores médias de peso hectolitro foram verificadas na temperatura de 25 °C, principalmente no tratamento com infestação, comprovando que a presença do inseto danifica a qualidade do grão.

O peso hectolitro é um indicador de qualidade que se correlaciona com taxa de extração de farinha, sendo que valores mais elevados apresentam maior qualidade dos grãos. Ao longo do armazenamento ocorre redução de PH, em virtude do consumo de componentes orgânicos dos grãos (FLEURAT-LESSARD, 2002). O mesmo foi constatado em relação ao período de armazenamento, sendo verificada uma redução do peso hectolitro em todos os tratamentos estudados, nas temperaturas de 20 e 25 °C, para os tempos de 45, 90 e 135 dias, tanto para grãos infestados como não infestados. Para a temperatura de 30 °C, o peso hectolitro foi maior tanto para grãos infestados quanto para grãos sem infestação.

Quando avaliados os tempos de armazenamento com e sem infestação em todas as temperaturas verificou-se que o tempo de 45 dias diferiu dos demais tratamentos.

Os resultados do presente trabalho estão em acordo com os relatados por Deliberali *et al.* (2010), que verificaram valores de peso hectolitro refletidos em perdas qualitativas totais, resultantes dos processos de deterioração dos grãos, em razão do seu metabolismo intrínseco à atividade microbiana e à de pragas associadas.

6.2 Teor de água

A interação entre temperatura e tempo e infestação e tempo foram significativas a 5% de significância.

Os dados médios de teor de água nos grãos, com e sem infestação e em diferentes temperaturas, resultaram em um coeficiente de variação de 1,67%, indicando baixa dispersão dos dados, o que era esperado, pois os grãos estavam em condições ambientes estáveis ao longo do armazenamento.

Ocorreu diferença significativa entre o grau de infestação nas temperaturas de 20 e 25 °C para os tempos de armazenamento de 45 e 90 dias; para 135 dias o teor de água para os grãos com e sem infestação diferem entre si em cada temperatura.

Quando avaliadas as temperaturas em cada tempo de armazenamento, verificou-se que o teor de água na temperatura de 20 °C difere das demais temperaturas nos grãos infestados e não infestados. As médias do teor de água foram menores nos tempos de 90 e

135 dias nas temperaturas de 25 e 30 °C tanto para grãos com e sem infestação. Essa variação ocorre devido ao metabolismo dos insetos, ou seja, sua respiração.

O tempo inicial de armazenamento apresentou maior média para grãos com e sem infestação em todas as temperaturas. Para os tempos de 45 e 90 dias, observaram-se diferenças significativas para as temperaturas de 20 e 25 °C. No entanto, na temperatura de 30 °C ocorreram diferenças estatísticas para os tempos de 90 e 135 dias.

Tabela 3 Teor de água para grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Tempo de Armazenamento (dias)	Infestação inicial	Temperatura		
		20 °C	25 °C	30 °C
0	I	12,86 aA	12,85 aA	12,83 aA
	NI	12,88 aA	12,86 aA	12,86 aA
45	I	12,56 cB	11,52 bB	10,89 aA
	NI	12,10 cA	11,19 bA	10,73 aA
90	I	11,86 cB	10,36 bB	9,53 aB
	NI	11,56 cA	9,79 bA	9,25 aA
135	I	11,26 cA	9,86 bA	9,03 aA
	NI	11,36 cA	9,62 bA	9,29 aB

Notas: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Em geral, o teor de água reduziu quando houve aumento na temperatura e período de armazenamento. Os valores obtidos nas amostras estão de acordo com os valores determinados pela legislação brasileira, que estabelece em 13% o valor de umidade máxima para grãos de trigo (BRASIL, 2001). Para Faroni *et al.* (2002), valores de umidade inferiores a 13% são recomendados para garantir a conservação e a armazenagem dos grãos.

Na avaliação do aumento do teor de água em grãos infestados, verificou-se que os resultados estão de acordo com o obtido por Pinto *et al.* (2002), que analisaram a influência da densidade populacional de *Sitophilus zeamais* sobre a qualidade do trigo destinado à panificação, e verificaram um aumento do teor de água da massa de grãos de trigo, devido ao metabolismo dos insetos, ou seja, devido à sua respiração. Nos frascos infestados em relação a não infestados o aumento resultou em maior perda de qualidade do produto e aumento na deterioração.

Freitas *et al.* (2011) encontraram resultados semelhantes, pois houve um aumento no teor de água em feijão armazenado em silos-bolsa, atribuídos à atividade respiratória dos grãos, insetos e microrganismos a eles associados.

Antunes (2011) concluiu que a umidade dos grãos infestados não diferiu estatisticamente ao longo do tempo de armazenamento, contradizendo os resultados encontrados por Silva *et al.* (2003), que analisaram as perdas causadas por *Sitophilus*

zeamais e *Rhizopertha dominica* em trigo armazenado, e observaram que o teor de água nos grãos aumentou, na medida em que aumentava a população de ambos os insetos presentes no armazenamento.

6.3 Teor de proteína

A interação entre temperatura e tempo e infestação e tempo de armazenamento foi significativa a 5% de significância.

As médias do teor de proteína dos grãos com e sem infestação inicial, em diferentes tempos de armazenamento e temperaturas apresentaram coeficientes de variação de 0,43%, indicando baixa dispersão dos dados.

Tabela 4 Teor de proteínas em grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Tempo de Armazenamento (dias)	Infestação inicial	Temperatura		
		20 °C	25 °C	30 °C
0	I	13,90 aA	13,92 aA	13,89 aA
	NI	13,89 aA	13,91 aA	13,90 aA
45	I	14,01 aA	14,09 aB	13,97 aA
	NI	13,98 aA	13,98 aA	14,00 aA
90	I	14,18 aA	14,38 bB	14,27 abA
	NI	14,11 aA	14,20 aA	14,21 aA
135	I	14,98 aB	15,07 aB	14,97 aB
	NI	14,88 aA	14,85 aA	14,82 aA

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

O tempo inicial de armazenamento para teor de proteínas não apresentou diferença significativa entre as temperaturas e tempos de armazenamento. O tempo de 45 dias, para grãos não infestados, apresentou diferença significativa entre 20 °C e 25 °C.

Em relação aos tempos de armazenamento de 45 e 90 dias, verificou-se que apresentaram diferenças entre grãos com e sem infestação nas temperaturas de 20 e 25 °C. Já para o tempo de 135 dias, observaram-se diferenças significativas entre todas as temperaturas, apresentando a maior média.

Os dados de proteínas indicam que, nos tratamentos com infestação, em geral, ocorrem maiores valores de proteínas que aumentam com o tempo de armazenamento. Esse aumento de teor de proteína com insetos pode ter ocorrido pelo fato de que na determinação da proteína dos grãos ocorreu também a determinação de proteínas dos

insetos e isto, aumentou o valor ao longo do armazenamento, pois conforme aumentava o período de armazenamento proporcionalmente aumentava a população total de insetos.

Em estudos realizados por Pinto *et al.* (2002), foi observado que, quanto maior o número de insetos de *Sitophilus zeamais* e o período de armazenagem, maior foi o teor de proteínas total e que na ausência do inseto não ocorreu variação no conteúdo proteico, devido à presença de proteólise e também pela alimentação dos insetos, que reduz o conteúdo de carboidratos, ocasionando aumento percentual do conteúdo proteico.

Freo (2010) também encontrou resultados semelhantes, nos quais quanto maior a densidade de *Rhyzopertha dominica* nos grãos de trigo, durante o armazenamento, maior foi o acréscimo no teor de proteínas, contradizendo os resultados encontrados por Ferrari Filho (2011), que constatou, aos seis meses de estocagem, uma redução nos teores de proteína bruta e extrato etéreo dos grãos, devido à presença de insetos da espécie *Sitophilus zeamais* que atacaram diretamente o embrião do grão e consumiram esses nutrientes.

6.4 Teor de cinzas

A interação entre temperatura e tempo e infestação e tempo de armazenamento foi significativa a 5% de significância.

As médias de teor de cinzas dos grãos com e sem infestação inicial, em diferentes tempos de armazenamento e temperaturas apresentaram coeficiente de variação de 3,17%, indicando baixa dispersão dos dados.

Tabela 5 Teor de cinzas em grãos de trigo armazenados, com infestação (I) e sem infestação (NI) de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Tempo de Armazenamento (dias)	Infestação inicial	Temperatura °C		
		20	25	30
0	I	1,36 aA	1,37 aA	1,36 aA
	NI	1,36 aA	1,36 aA	1,37 aA
45	I	1,38 aA	1,43 aA	1,42 aA
	NI	1,36 aA	1,44 aA	1,45 aA
90	I	1,51 aA	1,63 bA	1,47 aA
	NI	1,53 abA	1,59 bA	1,45 aA
135	I	1,65 bB	1,73 cB	1,55 aA
	NI	1,56 abA	1,59 bA	1,49 aA

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

O tempo inicial de armazenamento para teor de proteínas não apresentou diferença significativa entre as temperaturas e tempos de armazenamento

Para o teor de cinzas, verificou-se que, quando analisados cada tempo de armazenamento em relação à temperatura, no tempo de armazenamento de 90 dias, os valores de teor de cinza dos grãos com e sem infestação das temperaturas de 20 e 30 °C apresentam maiores médias, que diferem da temperatura de 25 °C. No tempo de 135 dias, as temperaturas diferem entre si nos grãos infestados, no entanto, para os grãos sem infestação, verificou-se que as maiores médias ocorrem na temperatura de 25 °C, diferindo das demais temperaturas.

Em geral, verifica-se que o teor de cinzas aumentou ao longo do tempo de armazenamento, as amostras apresentaram teores de cinza entre 1,38% e 1,76%. Vieira, Bardiale-Furlong e Oliveira (1999) relataram que a associação de elevados teores de umidade e cinzas poderiam resultar em um ambiente propício à síntese de micotoxinas em grãos e produtos derivados.

Estudos realizados por Freo (2010), na aplicação de terra diatomácea e infestação com *Rhizopertha dominica* nas propriedades físico-químicas e tecnológicas de grãos de trigo armazenados no sistema convencional, o teor de cinzas não foi significativo para a infestação com *Rhizopertha dominica* e interação tempo x insetos, porém observou que com o passar do tempo ocorreu redução no teor de cinzas em todos os tratamentos estudados e os menores valores foram verificados com o nível de interação de 48 insetos. As variações no conteúdo mineral estão relacionadas com a distribuição dos componentes dos grãos e da forma de alimentação dos insetos.

6.5 Avaliação populacional de insetos

A interação entre temperatura e tempo de armazenamento foi significativa a 5% de significância.

As médias do teor de proteína dos grãos com e sem infestação inicial, em diferentes tempos de armazenamento e temperaturas apresentaram coeficiente de variação de 15,26%, o que pode ser justificado tendo-se em vista que em cada tempo e repetição os insetos agiam de forma diferente no seu desenvolvimento.

Os valores médios obtidos para avaliação populacional de insetos em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em três tempos: 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C de armazenamento estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Avaliação populacional de insetos em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Tempo Armazenamento	Temperatura		
	20 °C	25 °C	30 °C
Insetos vivos			
0	20,00 aA	20,00 aA	20,00 aA
45	56,33 abA	71,67 bA	38,67 abA
90	92,00 bA	123,67 cA	53,67 abB
135	425,33 cB	735,00 dA	84,33 bC
Insetos mortos			
0	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
45	10,67 bA	16,00 bA	6,33 aB
90	26,33 cB	49,67 cA	18,67 bB
135	60,33 dB	109,67 dA	28,00 cC
Total de insetos			
0	20,00 aA	20,00 aA	20,00 aA
45	67,00 abA	87,67 bA	45,00 aA
90	118,33 bB	173,33 cA	72,33 abB
135	485,67 cB	845,00 dA	100,33 bC

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Ao avaliar os insetos vivos no tempo de armazenamento de 90 dias, verificou-se que ocorreu diferença significativa da temperatura de 30 °C em relação às demais, visto que as temperaturas de 20 e 25 °C apresentam a maior média. No tempo de armazenamento de 135 dias, verificou-se que as temperaturas diferem entre si. Com relação à análise em cada temperatura, observou-se que em 20 °C, o tempo de 135 dias difere dos tempos de 0, 45 e 90 dias. Já na temperatura de 25 °C, ocorreu diferença significativa em todos os tempos estudados e na temperatura de 30 °C, o tempo inicial difere do tempo de 135 dias.

Em geral, verificou-se um incremento do número de insetos na população de *S. zeamais*, com o tempo de armazenamento nas temperaturas de 20, 25 °C e 30 °C. Ao avaliar as temperaturas em cada tempo de armazenamento, observou-se que na temperatura de 20 °C, ocorreram as maiores contagens de insetos vivos, principalmente nos tempos de 90 e 135 dias.

Para a sobrevivência (insetos vivos) de insetos, as temperaturas de 20 e 25 °C apresentaram melhor resultado, em todos os tempos de armazenamento.

Avaliando o número de insetos mortos, observou-se que existe uma relação direta entre número de insetos e tempo de armazenamento, pois, verificou-se que quanto maior o tempo de armazenamento, maior a mortalidade dos insetos. Em relação aos tempos de armazenamento, verificou-se que nas temperaturas de 20 e 25 °C ocorreram diferenças

significativas entre os tempos de 0, 45, 90 e 135 dias. Já na temperatura de 30 °C, o tempo de 135 dias diferiu dos demais tempos. A temperatura de 25 °C apresentou maiores médias de mortalidade, quando comparada às de 20 e 30 °C. Nota-se ainda que, no tempo de armazenamento de 90 dias, a temperatura de 25 °C diferiu das temperaturas de 20 e 30 °C e no tempo de 135 dias as temperaturas estudadas diferem entre si.

Na avaliação populacional total de insetos, pode-se inferir que ocorreu um incremento populacional em relação ao tempo de armazenamento nas temperaturas de 20, 25, e 30 °C, em relação ao tempo inicial de infestação.

Antunes *et al.* (2011) observaram também que conforme aumentava o tempo de armazenamento aumentavam os valores de sobrevivência e mortalidade dos insetos, apresentando diferenças estatísticas para os tempos de armazenamento (30, 60 e 120 dias). Alencar *et al.* (2011) também observaram que o aumento do período de armazenamento aumentou o número de insetos vivos *Sitophilus zeamais* na massa de grãos de milho.

De acordo com Silva *et al.* (2003), são necessários 180 adultos de *Sitophilus zeamais* kg⁻¹ em trigo armazenado para causar 1,5% de grãos danificados, umedecer os grãos em 0,13% e reduzir o peso hectolitro em 0,4 kg 100L⁻¹ e causar uma perda de matéria seca em 0,7%.

Massaro Júnior *et al.* (2011) observaram que conforme aumentava o tempo de armazenamento, aumentavam os valores de sobrevivência, emergência e mortalidade dos insetos, apresentando diferenças significativas para os tempos de armazenamento estudado (30, 60 e 120 dias). Alencar *et al.* (2011) observaram que com o aumento do armazenamento houve um aumento no número de insetos vivos *Sitophilus zeamais* na massa de grão de milho.

Silva *et al.* (2006), ao estudarem um modelo analítico de crescimento populacional de insetos *Sitophilus zeamais* em trigo armazenado, com diferentes infestações e temperaturas, observaram que o crescimento populacional aumenta conforme a quantidade inicial de insetos que infestam cada parcela, tendo como temperatura ideal 28 °C, com drásticas diminuições abaixo e acima desta, diferenciando do experimento em estudo, em que a temperatura mais adequada para o desenvolvimento foi de 25 °C.

A presença de insetos pode acarretar rejeição ou desvalorização do produto no mercado, tanto para os grãos importados quanto para o nacional, estando diretamente relacionada com o número de insetos presentes na massa de grãos e na medida em que aumenta o número de insetos maior é a depreciação da matéria-prima durante o armazenamento, justificando redução da massa de grãos e do peso hectolitro do grão, o que influenciará no rendimento de farinha durante a moagem (SANTOS *et al.*, 2002; ALENCAR *et al.*, 2011).

6.6 Avaliação de fungos filamentosos em amostra de trigo

Nas amostras de trigo com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos de armazenamento: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C, foram identificados 5 gêneros de fungos filamentosos, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp, *Fusarium* spp e *Mucor* spp, conforme Figura 3.

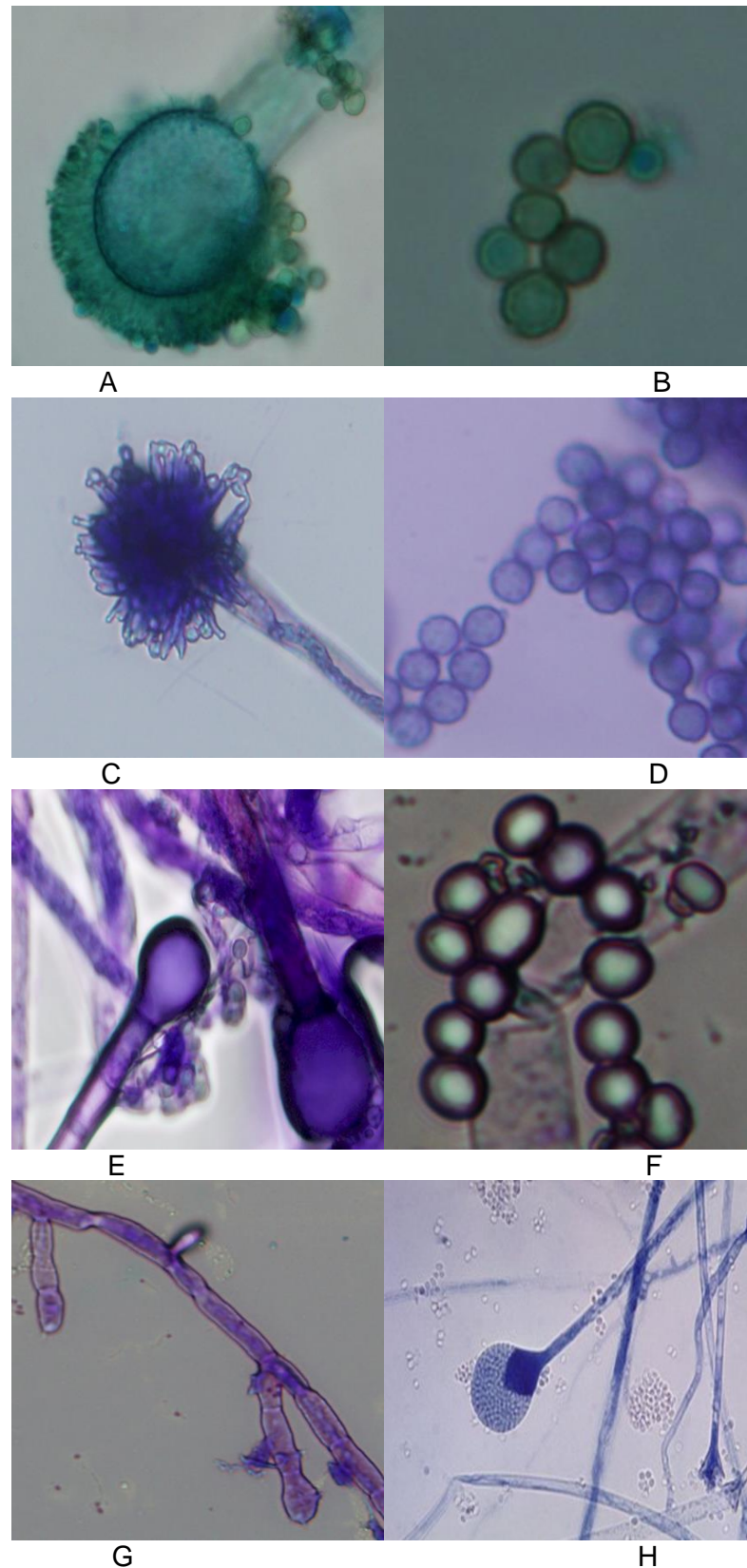


Figura 3 Identificação de fungos filamentosos em grãos de trigo com e sem infestação de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90, 135 dias de armazenamento em três temperaturas: 20, 25 e 30 °C. A- *Aspergillus* spp. B- Conídios de *Aspergillus* spp. C- *Penicillium* spp. D- Conídios de *Penicillium* spp. E- *Rhizopus* spp. F- Conídios de *Rhizopus* spp. G- *Fusarium* spp. H- *Mucor* spp.

Figura 3 H: Fonte : Georg (2008).

Tabela 7 Valores de contagem de unidade formadora de colônia (UFC.g-1 x 103) de fungos filamentosos em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos: 0, 45, 90 e 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Tempo	Infestação inicial	Temperatura		
		20 °C	25 °C	30 °C
<i>Rhizopus spp</i>				
0	I	0,70	0,23	0,43
	NI	0,55	0,44	0,55
45	I	0,97	0,43	1,30
	NI	0,60	0,40	0,57
90	I	0,73	0,40	0,17
	NI	0,37	ND	0,13
135	I	0,53	0,20	0,03
	NI	0,17	0,07	0,03
<i>Fusarium spp</i>				
0	I	0,10	0,16	0,13
	NI	0,15	0,14	0,18
45	I	0,03	ND	0,04
	NI	0,10	ND	ND
90	I	0,04	0,03	0,23
	NI	ND	0,03	ND
135	I	ND	ND	ND
	NI	ND	ND	ND
<i>Penicillium spp</i>				
0	I	ND	0,55	0,05
	NI	ND	0,33	0,03
45	I	0,33	0,40	1,16
	NI	ND	ND	ND
90	I	0,40	0,10	0,13
	NI	0,37	ND	0,10
135	I	0,83	0,73	3,03
	NI	0,77	0,23	0,36
<i>Aspergillus spp</i>				
0	I	0,06	0,20	0,55
	NI	ND	0,10	0,34
45	I	2,67	0,80	0,27
	NI	0,30	ND	0,17
90	I	0,10	0,07	1,56
	NI	0,17	ND	ND
135	I	0,27	2,43	0,13
	NI	0,07	1,03	ND
<i>Mucor spp</i>				
0	I	0,02	ND	ND
	NI	ND	0,03	ND
45	I	ND	0,20	0,03
	NI	ND	ND	ND
90	I	0,10	ND	0,50
	NI	ND	0,20	ND
135	I	0,40	1,06	0,20
	NI	0,1	0,2	ND

Verificou-se a maior prevalência de UFC (10^{-3}) de *Rhizopus* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e *Mucor* spp na condição de grãos infestados. Para o gênero *Rhizopus* spp a prevalência foi maior nas temperaturas de 20 e 25 °C, para os tempos de 45, 90 e 135 dias. Na temperatura de 30 °C apenas o tempo de 45 dias de armazenamento apresentou maior contagem.

O *Fusarium* spp apresentou maior prevalência no tempo inicial de armazenamento para todas as temperaturas, devido à sua colonização ser no campo. Para *Penicillium* spp observou-se que a prevalência de UFC ocorreu para todos os tempos e temperaturas. No entanto, na temperatura de 30 °C ocorreu maior contagem de UFC. A contagem de UFC de *Aspergillus* spp não foi padrão, apresentando contagem variada em todos os tempos de armazenamento e temperaturas. O *Mucor* spp apresentou maior prevalência no tempo de armazenamento de 135 dias. Os fungos do gênero *Mucor* e *Rhizopus* ocorrem normalmente em solo, frutas, vegetais, grãos armazenados e são contaminantes comuns de locais onde se processam produtos armazenados, o que também explica a presença destes organismos nas amostras (BANWART, 1981; SINHA; SINHA, 1991).

Observando-se os dados, pode-se inferir que a temperatura de 25 °C pode ser utilizada para armazenar grãos, devido a maior prevalência de fungos tanto de armazenamento como de campo.

Em geral, observou-se que os gêneros *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e *Rhizopus* spp foram os mais prevalentes para grãos de trigo armazenados com infestação de *Sitophilus zeamais* o que está de acordo com Reverberi *et al.* (2010), que consideram fungos de armazenamento, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Além de deteriorarem causando danos no germe, descoloração e alterações nutricionais, perda de matéria seca são também produtores de micotoxinas altamente tóxicas para os seres humanos e animais.

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus*, *A. ochraceus* e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (MILLER, 1995; SINHA; SINHA, 1991).

Basílico *et al.* (2010) avaliaram a contaminação fúngica de amostras de trigo cultivadas na Argentina e encontraram 19 gêneros de fungos, alguns dos quais produtores de micotoxinas.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com Samsom (1991), que evidencia que fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp *Rhizopus* sp e *Penicillium* sp são organismos bem conhecidos na deterioração de alimentos, produtos armazenados e produção de micotoxinas. Portanto, estes fungos têm um efeito bastante significativo na qualidade dos alimentos devido à sua presença como contaminante e os riscos da produção de micotoxinas.

6.7 Quantificação de desoxinivalenol

Os resultados médios de contagem de UFC de *Fusarium* spp e quantificação de Desoxinivalenol (DON) obtidos em grãos com e sem infestação nos tempos de armazenamento inicial e de 135 dias, nas temperaturas de 20 25 e 30 °C, estão apresentados na Tabela 8. Estes dados estão dentro do limite máximo tolerável de 3000 µg kg⁻¹ DON em grãos de trigo, conforme estabelece a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011).

Constatou-se neste estudo que 100% das amostras de trigo analisadas estavam contaminadas com DON em todos os tratamentos, com níveis máximos de 740 µg kg⁻¹ no tempo inicial, e níveis mínimos < 200 µg kg⁻¹ para 135 dias de armazenamento. O tempo inicial apresentou níveis elevados de DON e de *Fusarium* spp, quando comparado com o tempo de 135 dias de armazenamento.

Tabela 8 Contagem de unidade formadora de colônia (UFC.g⁻¹ x 10³) para os tempos 0 e 135 dias de armazenamento com infestação e sem infestação, contaminado por *Fusarium* spp, nas temperaturas: 20 25 e 30 °C e quantificação de Desoxinivalenol (DON), expresso em partícula por bilhão (µg kg⁻¹ ppb)

Temperatura	I	DON (ppb)	NI	DON (ppb)
	0 dias			
20 °C	0,70	740	0,55	740
25 °C	0,23	740	0,44	740
30 °C	0,43	740	0,55	740
135 dias				
20 °C	0,02	760	ND	< 200
25 °C	ND	600	0,03	680
30 °C	ND	770	ND	460

Notas: ppb = partícula por bilhão;
 I = grãos de trigo om infestação *Sitophilus zeamais*;
 NI = grãos de trigo sem infestação de *Sitophilus zeamais*;
 ND = não detectado.

Os valores da micotoxina encontrados neste trabalho foram menores do que os relatados por Nievinski (2009), que encontrou em média de $1.025,900 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Furlong *et al.* (1995) avaliaram 38 amostras de grãos de trigo provenientes de São Paulo e de armazéns do Rio Grande do Sul e constataram que 23% estavam contaminadas com toxinas produzidas por espécies de *Fusarium*, com predomínio de DON, que ocorreu em 55% das amostras analisadas, em níveis que variaram de 400 a $590 \mu\text{g kg}^{-1}$. Pinto (2008) relata que das 19 amostras de trigo analisadas, 68% estavam contaminadas com DON na faixa de 300 a $700 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 11% na faixa de 7500 e $6700 \mu\text{g kg}^{-1}$.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- O aumento do período de armazenamento dos grãos de trigo na presença de *S. zeamais*, diminuiu o peso hectolitro.
- A temperatura em que houve maior desenvolvimento de insetos foi a de 25 °C.
- Em geral, o teor de proteína aumentou com o tempo de armazenamento nos tratamentos com e sem infestação de *Sitophilus zeamais* nos grãos de trigo.
- A qualidade físico-química dos grãos é afetada diretamente pelos insetos-praga, provocando um aumento no teor de água dos grãos e redução do peso hectolitro, ocasionado aumento na incidência de fungos filamentosos.
- Grãos de trigo com infestação apresentam maiores contagens totais de UFC de fungos filamentosos.
- Conforme aumentou o tempo de armazenamento e temperatura, aumentou também o teor de cinzas.
- Os grãos infestados perderam qualidade durante o armazenamento.
- As amostras avaliadas de grãos de trigo infestados e não infestados estão dentro do limite máximo tolerável de 3000 µg de DON kg⁻¹ de trigo, conforme estabelece a RDC nº 7/2011 ANVISA.
- A infestação de insetos não contribuiu para o aumento da concentração de DON nas amostras.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste estudo podem oferecer informações para futuras pesquisas, que visem identificar a interação do inseto *Sithophilus zeamais* com os fungos *Rhizopus* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Mucor* spp e micotoxinas produzidas em grãos de trigo armazenados. Em particular, considerando-se a grande quantidade desses fungos encontrada nos grãos durante esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ALBORCH, L.; BRAGULAT, M. P.; CASTELLÁ, G.; ALLBARCA, M. L. & CABAÑES, F. J. Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. *Food Microbiol.* 32:97-103, 2012.
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. A.; FERREIRA, L. G.; COSTA, A. R.; PIMENTEL, M. A. G. Qualidade do milho armazenado e infestado por *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*. *Engenharia na agricultura*, v. 19, n. 1, 2011.
- ALFRED, D.; MAGAN, N. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, v.153, p.165-171, 2004.
- AMORIM, E. P. R.; PREDES R. C. T.; ELOY, A. P. *et al.* Qualidade sanitária de grãos e frutos de amendoim comercializados no estado de Alagoas e identificação através de características culturais de espécies de *Aspergillus*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 4, p. 309-312, 2010.
- ANDRADE, E. C. B. *Análise de alimentos: uma visão química da nutrição*. São Paulo: Varela, p. 238, 2006.
- ANTUNES, L. E. G.; VIEBRANTZ, P. C.; GOTTARDI, R.; DIONELLO, R. G. Características físico-químicas de grãos de milho atacados por *Sitophilus zeamais* durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 15, n. 6, 2011.
- ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Brasília, DF, 2011.
- AQUINO, S.; POTENZA, M. R. Análise da microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 2, pg. 243-247, 2013.
- BANWART, G. J. **Basic food microbiology**. Westport CT: The AVI publishing Company, Inc.,p.51-62. 1981.
- BASÍLICO, M. L. Z. *et al.* Fungal diversity and natural occurrence of fusaproliferin, beauvericin, deoxynivalenol and nivalenol in wheat cultivated in Santa Fe Province, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 26, p. 85-91, 2010.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BOTTON, M.; LORINI, I.; AFONSO, A.P.S. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) Danificando a Cultura da Videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**. v. 34, n.2, p. 355-356, mar./abr., 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura - MAPA. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo> Acesso em: 11 jul. 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**. MAPA/ACS, Brasília, 2009. 399 p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV. 1992. 365p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SARC nº 7, de 15 de agosto de 2001. Regulamento técnico de identidade e de qualidade do trigo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 160-E, p. 33-35, 21 ago. 2001. Seção 1.

BRITO, E. S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (Theobroma cacao L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. 134 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas.

CALDAS NETO, S. F.; ZEOULA, L. M.; PRADO, I. N.; BRANCO, A. F.; KAZAMA, R.; GERON, L. J. V.; MAEDA, E. M.; FERELI, F. Proteína degradável no rúmen na dieta de bovinos: digestibilidades total e parcial dos nutrientes e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 1094-1102, 2008.

CALORI-DOMINGUES, M.A.; ALMEIDA, R.R.; TOMIWAKA, M.M.; GALLO, C.R.; Gloria, E.M.; Dias, C.T.S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.181-185, 2007.

COPATTI, C. E.; GASPARETTO, F. M. Diversidade de insetos em diferentes tipos de bordaem um fragmento de Floresta Ombrófila Mista. **Revista Biociências**, v.18, p.32-40, 2012.

COPPOCK, R. W.; JACOBSEN, B. J. Mycotoxins in animal and human patients. **Toxicology and Industrial Health**, v. 25, n. 9-10, p. 637-655, 2009.

COSTA, M.G. et al. Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p.220-225, 2008.

CRUZ, J. C., MAGALHÃES, P. C., PEREIRA FILHO, I. A., MOREIRA, J. A. A. **Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 338 p.

DELIBERAL, J.; OLIVEIRA, M.; DURIGON, A.; DIAS, A.R.G.; GUTKOSKI, L..C.; ELIAS, M.C. Efeitos de processo de secagem e tempo de armazenamento na qualidade tecnológica do trigo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, n.5. 1285-1292, 2010.

DESJARDINS, A. E.; MANANDHAR, H. K.; PLATTNER, R. D.; MANANDHAR, G.G.; POLING, S. M. and Maragos, C.M. Fusarium species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1020-1025, 2000.

DHINGRA, O.D.; COELHO NETO, R.A. Micotoxinas em grãos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.6, n.1, p.49-101, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Embrapa trigo**. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo>. Acesso em: 25 fev. 2014.

ERIKSEN G. S; ALEXANDER. J. Fusarium toxins in cereals – a risk assessment. Nordic Council of Ministers; TemaNord 1998: 502, pp. 7-27 and 45-58; Copenhagen.

FARONI, L. R. D.; BERBERT, P. A.; MARTINAZZO, A. P.; COELHO, E. M. Qualidade da farinha obtida de grãos de trigo fumigados com dióxido de carbono e fosfina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, p.354-357, 2002.

FERRARI FILHO, E. **Métodos e temperaturas de secagem sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Horticultura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FLEURAT-LESSARD, F. Qualitative reasoning and integrated management of the quality of stored grain: a promising new approach. **Journal of Stored Products Research**, v.38,p.191-218, 2002.

FREIRE, F. C. O. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007. 48 p.

FREITAS, R.; FARONI, L. R.; SOUSA, A.; CECON, P. R.; CARVALHO, M. S. Qualidade de feijão armazenado em condições herméticas. *Angenharia na Agricultura*, Jaboticabal, v.31, n.6, p.1136 – 1149, 2011.

FREO, J.D. **Aplicação de terra de diatomácea e a infestação com *rhizopertha dominica dominica* nas propriedades físico-químicas e tecnológicas de grãos de trigo armazenados no sistema convencional**. 2010. 107f. Tese (Doutorado) - Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

FURLONG, B. E. et al. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo Brasil, **Mycopathologia**, Den Haag, v. 131, n. 3, p. 185-190, 1995.

GEORG, (2008). Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Mucormycosis>. Acesso em: 11 jul. 2014.

HERRMANN, D. R.; CARVALHO, M. J. de; ZACHOW, K.; SCHOLZ, F.; RABBERS, D.; TSUTSUMI, C. Y.; ZONIN, W. Avaliação da resistência de cultivares de milho ao ataque de *Sitophilus* sp. em grãos armazenados. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.4, p.4290-4293, 2009.

HOELTZ, M. **Estudo da influência de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (*Oryza sativa* L.)** 2005. 77 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2005.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxin on humans and animals. **Toxicology**, Amsterdam, v.167, p.101-134, 2001.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. **Micotoxinas em alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7, p.138-161, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Versão eletrônica. Disponível em <www.ial.sp.gov.br>. Acesso em: 16 out. 2013.

JARVIS, B.b. *et al.* Conformational effects in trichothecenes: structures of 15-hydroxy C4 and C8 ketones. **J. Org. Chem.**, [S. l.], v. 55, p.3660-3662, 1990.

KAWASHIMA, L.M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

KNOW MYCOTOXINS. Tricotecenos (Toxina T-2, Diacetoxiscirpenol (DAS), Deoxinivalenol (DON), Toxina HT-2, etc.). **Nutricionista**. Suínos, 2008.

LAHÓZ, André C. **Eficiência Agronômica do Etofenprox no controle de *Sitophilus Zeamais* Motsch.,1855(coleoptera: Curculionidae) em grãos armazenados de milho e a relação entre seu ataque e a variação de umidade e atividade de água nos grãos.** 2008 48 p. **Dissertação** (Mestrado em Agron.omia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

LIRA, P.I. C.; ANDRADE, S.L. L.S. Epidemia de beribéri no Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.24, n.6, 2008.

LORINI, I. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados.** Passo Fundo: EMBRAPA – CNPT, 1998. 52 p.

LORINI, I. **Insetos que atacam grãos de soja armazenados.** Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF, Embrapa. p. 421-444, 2012.

LORINI, I.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, A. A. **Principais Pragas e Métodos de Controle em Sementes Durante o Armazenamento** – Série Sementes. Circular Técnica 73. Embrapa Soja. 2009.

LORINI, I; **Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados.** Passo Fundo: Embrapa Trigo; 2003.

LORINI.I. **Manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados.** Passo Fundo, Embrapa Trigo, 72p, 2008.

MASSARO JÚNIOR, A. L.; VILARINHO, A. A.; PAIVA, W. R. S. C.; BARRETO, H. C .S. Resistência de híbridos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais*, *motschulsky* (coleoptera: curculionidae) em condições de armazenamento. Rev. Acad., Ciênc. **Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 45-50, jan./mar. 2011.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MEIRELLES, P. G.; BIAZON, L.; ONO, M. A. *et al.* Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 617-628, 2006.

MILLER, J.D. -1995 - Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **J. Stored Prod. Res.**, 31 (1): 1-16. 1995.

MOAZAMI, E. F., JINAP, S. Natural occurrence of deoxynivalenol (DON) in wheat based noodles consumed in Malaysia, **Microchemical Journal** (2009).

NAGY, C. M. *et al.* Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations—a density functional study. **Journal Of Molecular Structure**, [S. l.], v. 726, p.55-59, 2005.

NEVES, J. A. Interferência da farinha de trigo na qualidade micológica e micotoxicológica do pão tipo Francês. 2013. 68 p. **Dissertação** (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

NIEVINSKI, P. G. Trigo: do grão à farinha. 2009. 38 p. **Dissertação** (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

NOUREDDINE, B.; KIM, Y. M.; STRELKOV, S. E. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. **International Journal of Food Microbiology**. v.31, p.251-255, 2009.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A. O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 3ª Ed. 2008.

PATERSON, R. R. M.; & LIMA, N. Mutagens manufactured in fungal culture may affect DNA/RNA of producing fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1070–1080, 2009.

PINTO, V. E. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**. Sao Paulo, v 39, n. 1, 2008.

PINTO, U. M.; FARONI, L. R. D. A.; ALVES, W. M.; SILVA, A. A. L. Influência da densidade populacional de *Sitophilus zeamais* (Motsch.) sobre a qualidade do trigo destinado à panificação. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, p.1407-1412, 2002.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, p. 184-192, 2000.

PUZZI, D. Conservação dos grãos armazenados. São Paulo: **Editora Agronômica Geres**, 1973.

RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. **International Journal Of Food Microbiology**, [S. l.], v. 106, p. 291-296, 2006.

REES, D.P. Coleoptera. In: SUBRAMANYAN, B.; HAGSTRUM, D.W. **Integrated management of insects in stored products**. New York: Marcel Dekker, Inc., p.1-39 1996.

REVERBERI, M.; ZJALIC S.; RICELLI, A.; PUNELLI, F.; CAMERA, E.; FABBRI, C. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the Apyap A gene. 2008.

RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A. ; DESJARDINS, A. E.; MARAGOS, C.; NORRED, W. P.; PESTKA, J. J.; PHILLIPS, T. D.; VANEGMOND, H. P.; VARDON, P. J.; WHITAKER, T. B.; WOOD, G. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, p. 101, 2003.

RODRIGUES, P. R. A. **Gestão Estratégica da Armazenagem**. São Paulo: Aduaneiras, 2006.

ROSSI, R. M.; NEVES, M. F. **Estratégias para o Trigo no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2004.

SAFRAS & MERCADO. **Cultivo e consumo do trigo no mundo**. Disponível em: <http://www.safras.com.br>. Acesso em: 20/01/2014.

SAMSOM, R.A Identification of food-borne *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* species. In: CHAMP, B.R.; HISHLEY, E.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. ed. Fungi and mycotoxins in stored products. In: **International Conference**. Bangkok, Thailand, ACIAR Proceedings n° 36, 270p. 1991.

SANTOS, J. P. Controle de pragas durante o armazenamento de milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 257-302, 2008.

SANTOS, J.P. Recomendação para o Controle de Pragas de Grãos e de Sementes Armazenadas. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do Milho: Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, p. 197-233, 1993.

SCHEUER, P. M.; FRANCISCO, A de.; MIRANDA, M. Z.; LIMBERGER, V. M. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13, n.2, p.211-222, 2011.

SCHÖLLER, M.; PROSELL, S.; AL-KIRSHI, A. G.; REICHMUTH, C. H. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. **Journal of Stored Products Research**, v.33, p.81-97, 1997.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 144.

SIEGEL, D.; BABUSCIO, T. Mycotoxin management in the European cereal trading sector. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1145-1153, 2011.

SILVA, A. A. L.; FARONI, L. R. D. A.; GUEDES, R. N. C.; MARTINS, J. H.; PIMENTEL, M. A. G. Modelagem das perdas causadas por *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominica* em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.7, p.292-296, 2003.

SILVA, A. A. L.; FARONI, L. R. D. A.; GUEDES, R. N. C.; Martins, J. H.; PIMENTEL, M. A. G. Modelos analíticos do crescimento populacional de *Sitophilus zeamais* em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.155-161, 2006.

SILVA, J.S. Secagem e armazenamento de produtos agrícolas. In: SILVA, J.S.; BERBERT, P. A.; RUFATO, S.; AFONSO, A.D. L. **Indicadores da qualidade dos grãos**. Viçosa: Aprenda Fácil, cap 4, p. 63-107, 2008.

SILVA, L.C., **Micotoxinas em grãos e seus derivados**. Boletim técnico. **Engenharia rural**, p.1-9 2010.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVEIRA, R. D.; FARONI, L. R. D. A.; PIMENTAL, M. A. G.; ZOCOLO, G. J. Influência da temperatura do grão de milho, no momento da pulverização, e do período de armazenamento, na mortalidade de *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, pela mistura bifenthrin e pirimifós-metil. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.31, p.120-124, 2006.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **J. Stored Prod. Res.**, **27** (1): 65-68. 1991.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: ITAL, **Núcleo de Microbiologia**, 82p.,2001.

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J.M.C. PONTE, E. M.; MALLMANN. C.A; DILKIN. P.; LIMA. M. I.; PAVAN. W. **Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas**. Boletim técnico. Embrapa trigo, Passo fundo RS, 2013.

TRABULSI, L. R. Microbiologia médica. São Paulo: Atheneu. 5ª ed .p. 780, 2008.

TRAVAGLIA, D. P. **Crescimento de *aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes temperaturas**. 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

TÜRKER, L.; GÜMÜS, S. A theoretical study on vomitoxin and its tautomers. **Journal Of Hazardous Material**, v. 163, p.285-294, 2009.

VASSANACHAROEN, P.; PTTANAPO, W.; LUCKE, W.; VEARASILP, S. Control of *Sitophilus oryzae* (L.) by radio frequency heat treatment as alternative phytosanitary processing in milled rice. **Journal of Plant Disease and Protection** 115, 45, 2008.

VENDRAMIM, J. D. O Controle Biológico e a Resistência de Plantas. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole, cap. 30, 2002. p. 511-528.

VIEIRA, A. P.; BARDIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Rev. Cien. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 221-225, 1999.

VISCONTI, A. *et al.* Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. **Toxicology Letters**, v 153, p.181- 189, 2004

WILD, C. P. GONG, Y. Y. **Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue**. *Carcinog*, 31:71-82, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A TABELAS DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Peso hectolitro

Tabela de análise de variância para PH (Peso Hectolitro) em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos de armazenamento: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Peso Hectolitro (PH)			
Fonte de variação	G.L	F	P-valor
Temperatura	2	35,129	0,0000*
Infestação	1	38,451	0,0000*
Tempo	3	23,700	0,0000*
Temperatura X Infestação	2	11,571	0,0001*
Temperatura X Tempo	6	4,769	0,0007*
Infestação X Tempo	3	5,265	0,0032*
Temperatura X Infestação X Tempo	6	2,147	0,0649
Total Corrigido	71		

Notas GL = Grau de Liberdade, F = Estatística, Prob (F) = Probabilidade da estatística F, * significativo a 5%

Teor de água

Tabela de análise de variância para Teor de água em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos de armazenamento: 0, 45, 90, 135 dias e temperaturas 20, 25 e 30 °C

Teor de água			
Fonte de variação	G.L	F	Prob (F)
Temperatura	2	588,256	0,0000*
Infestação	1	20,213	0,0001*
Tempo	3	1180,162	0,0000*
Temperatura X Infestação	2	3,667	0,0330
Temperatura X Tempo	6	71,996	0,0000*
Infestação X Tempo	3	78,941	0,0001*
Temperatura X Infestação X Tempo	6	1,099	0,3770
Total Corrigido	71		

Notas GL = Grau de Liberdade, F = Estatística, Prob (F) = Probabilidade da estatística F, * significativo a 5%

Teor de proteínas

Tabela de análise de variância para Teor de proteínas em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos de armazenamento: 0, 45, 90, 135 dias e temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Teor de proteína			
	G.L	F	Prob (F)
Temperatura	2	6,225	0,0039*
Infestação	1	27,620	0,0000*
Tempo	3	1039,059	0,0000*
Temperatura X Infestação	2	3,789	0,0297*
Temperatura X Tempo	6	1,934	0,0943
Infestação X Tempo	3	5,965	0,0015*
Temperatura X Infestação X Tempo	6	0,493	0,8107
Total Corrigido	71		

Notas GL = Grau de Liberdade, F = Estatística, Prob (F) = Probabilidade da estatística F, * significativo a 5%.

Teor de cinzas

Tabela de análise de variância para Teor de cinzas em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos de armazenamento: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Teor de Cinzas			
	G.L	F	Prob (F)
Temperatura	2	26,385	0,0000*
Infestação	1	15,563	0,0004*
Tempo	2	91,519	0,0000*
Temperatura X Infestação	2	1,850	0,1718
Temperatura X Tempo	4	8,576	0,0001*
Infestação X Tempo	2	8,333	0,0011*
Temperatura X Infestação X Tempo	4	0,764	0,5523
Total	71		

Notas GL = Grau de Liberdade, F = Estatística, Prob (F) = Probabilidade da estatística F, * significativo a 5%.

Variação populacional de insetos

Tabela de análise de variância para Variação populacional de insetos em grãos de trigo armazenados, com e sem infestação inicial de insetos adultos de *Sitophilus zeamais* em quatro tempos de armazenamento: 0, 45, 90, 135 dias e três temperaturas: 20, 25 e 30 °C

Variação populacional de insetos			
	G.L	F	Prob (F)
Temperatura	2	206,720	0,0000*
Tempo	3	578,917	0,0000*
Temperatura X Tempo	6	139,405	0,0000*
Total	35		

Notas GL = Grau de Liberdade, F = Estatística, Prob (F) = Probabilidade da estatística F, * significativo a 5%.