



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE AFLATOXINA, FUMONISINA E
ZEARALENONA EM MILHO PRODUZIDO ENTRE 2016 E 2018
NOS ESTADOS DE PARANÁ, MATO GROSSO E MATO GROSSO
DO SUL**

Marcelo Mistura

Toledo – PR



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE AFLATOXINA, FUMONISINA E
ZEARALENONA EM MILHO PRODUZIDO ENTRE 2016 E 2018
NOS ESTADOS DE PARANÁ, MATO GROSSO E MATO GROSSO
DO SUL**

Marcelo Mistura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador(a): Cleber Antonio Lindino

Toledo – PR

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Mistura, Marcelo Mistura

Avaliação da Incidência de Aflatoxina, Fumonisina e Zearalenona em milho produzido entre 2016 e 2018 nos estados de Paraná, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul / Marcelo Mistura Mistura; orientador(a), Cléber Antônio Lindino Lindino, 2019.

70 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

1. Química. 2. Micotoxinas. 3. Milho. 4. Controle de Qualidade. I. Lindino, Cléber Antônio Lindino. II. Título.

Folha de Aprovação

Marcelo Mistura

Incidência de Aflatoxina, Fumonisina e Zearalenona em milho produzido nos estados de Paraná, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:



Prof. Dr. Cleber Antonio Lindino - Presidente-Orientador (Unioeste)



Prof. Dr. Clayton Antunes Martin (UTFPR)



Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Baricatti (Unioeste)

Aprovada em: 02 de dezembro de 2019.

Local de defesa: Auditório do Gerpel – Unioeste/Campus de Toledo.

Sumário

Resumo	1
Abstract	3
1.0 Introdução.....	5
2.0 Micotoxinas.....	9
2.1 Aflatoxina	9
2.2 Fumonisinias	10
2.3 Zearalenona	11
3.0 Técnicas de Determinação de Micotoxinas	12
3.1 - Cromatografia Camada Delgada (CCD).....	13
3.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	13
3.3 – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/EM)	14
3.4 – Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	14
4.0 Objetivo Geral.....	17
4.1 Objetivos Específicos	17
5.0 Procedimento experimental	18
6.0 Materiais e Métodos	18
6.1 Amostras	18
6.2 Extração	18
6.3 Metodologias para as Determinações	19
6.3.1 Aflatoxinas	19
6.3.2 Fumonisinias	19
6.3.3 Zearalenona	20
6.3.4 Análise Estatística	20
7.0 Resultados.....	21
7.1 Precipitação e Temperatura	21
7.2 Zearalenona	23
7.3 Fumonisinias	34
7.4 Aflatoxinas	44
8.0 Conclusões.....	54
9.0 Referências Bibliográficas	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO – Amostras Contaminadas

AFL – Aflatoxinas

ALQ – Abaixo do Limite de Quantificação

AVM – Acima do Valor Máximo Permitido

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FUM – Fumonisinias

GO - Goiás

GC/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectrometria de Massas

IMEA - Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MA – Maranhão

MG – Minas Gerais

MS – Mato Grosso do Sul

MT – Mato Grosso

PA - Pará

PR – Paraná

RS – Rio Grande do Sul

RPM – Rotações por minuto

SP – São Paulo

ZEA – Zearalenona

Lista de Tabelas

Tabela 1: Limites máximos permitidos de micotoxinas em milho destinado a alimentação humana.....	6
Tabela 2: Limites máximos permitidos de micotoxinas em milho destinado a alimentação animal.....	6
Tabela 3: Comparação dos métodos analíticos utilizados para a determinação de micotoxinas	16
Tabela 4: Resultados médios de ZEA entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: Autor.	23
Tabela 5: Dados de precipitação e temperatura média. Fonte: [56]	27
Tabela 6: Resultados de FUM entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: Autor	34
Tabela 7: Resultados de AFLs entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: Autor.	44
Tabela 8: Dados de desvios padrões de temperatura e precipitação. Fonte: Autor.	47

Lista de Figuras

Figura 1. Fatores que contribuem para o desenvolvimento de fungos. Fonte: [15].	8
Figura 2. Fórmula estrutural da AFL B1. Fonte: [15].	9
Figura 3. Fórmula estrutural da FUM B1. R1, R2 e R3 = OH. Fonte: [14].	11
Figura 4. Fórmula estrutural da ZEA. Fonte: [14].	12
Figura 5. Princípio da técnica ELISA para determinação de micotoxinas. Fonte: [52].	15
Figura 6. Dados de Precipitação média entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: [56].	22
Figura 7. Dados de Temperatura média entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: [56].	22
Figura 8: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 1º período, estado PR. Fonte: Autor.	24
Figura 9: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado PR. Fonte: Autor.	24
Figura 10: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 3º período, estado PR. Fonte: Autor.	24
Figura 11: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 1º período, estado MS. Fonte: Autor.	24
Figura 12: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado MS. Fonte: Autor.	24
Figura 13: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 3º período, estado MS. Fonte: Autor.	24
Figura 14: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado MT. Fonte: Autor.	24
Figura 15: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado MT. Fonte: Autor.	24
Figura 16: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 3º período, estado MT. Fonte: Autor.	24
Figura 17: Resultados médios de ZEA ao longo do período de amostragem. Fonte: Autor.	25
Figura 18. Resultados de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de ZEA no estado de MT, período 2015/2016. Fonte: Autor.	28
Figura 19. Resultados de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de ZEA no estado de MT, período 2016/2017. Fonte: Autor.	28
Figura 20. Resultados de ZEA ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no estado do PR no período 2015/2016. Fonte: Autor.	29
Figura 21. Resultados de ZEA ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no estado do PR no período 2016/2017. Fonte: Autor.	29
Figura 22. Resultados de ZEA ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no estado do PR no período, 2017/2018. Fonte: Autor.	30
Figura 23: Comparação dos resultados médios anuais de ZEA no estado do PR ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	31

Figura 24: Comparação dos resultados médios anuais de ZEA no estado do MS ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	31
Figura 25. Comparação dos resultados médios anuais de ZEA no estado do MT ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	32
Figura 26: Resultados médios de ZEA ao longo do período de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	33
Figura 27. Comparação dos resultados médios anuais de FUM no estado do PR ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	35
Figura 28. Comparação dos resultados médios anuais de FUM no estado do MS ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	36
Figura 29. Comparação dos resultados médios anuais de FUM no estado do MT ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	36
Figura 30. Resultados médios de FUMs ao longo do período de amostragem. Fonte: Autor	37
Figura 31. Resultados de FUMs ao longo do período de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	40
Figura 32: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 1º período, estado PR. Fonte: Autor.....	40
Figura 33: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado PR. Fonte: Autor.....	40
Figura 34: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 3º período, estado PR. Fonte: Autor.....	40
Figura 35: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 1º período, estado MS. Fonte: Autor.....	40
Figura 36: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado MS. Fonte: Autor.....	40
Figura 37: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 3º período, estado MS. Fonte: Autor.....	40
Figura 38: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado MT. Fonte: Autor.....	40
Figura 39: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado MT. Fonte: Autor.....	40
Figura 40: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 3º período, estado MT. Fonte: Autor.....	40
Figura 41. Comparação dos resultados médios anuais de AFL no estado do PR ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	45
Figura 42. Comparação dos resultados médios anuais de AFL no estado do MS ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	45
Figura 43. Comparação dos resultados médios anuais de AFL no estado do MT ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.	45
Figura 44. Resultados médios anuais de AFLs ao longo do período de amostragem. Fonte: Autor.....	46
Figura 45. Precipitação acumulada em Fev/2016. Fonte: INMET	48

Figura 46. Precipitação acumulada em Ago/2016. Fonte: INMET	48
Figura 47. Precipitação acumulada em Ago/2017. Fonte: INMET	48
Figura 48. Precipitação acumulada em Fev/2017. Fonte: INMET	48
Figura 49. Precipitação acumulada em Ago/2018. Fonte: INMET	48
Figura 50. Precipitação acumulada em Fev/2018. Fonte: INMET	48
Figura 51. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 1º período, estado PR. Fonte: Autor.....	49
Figura 52. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado PR. Fonte: Autor.....	49
Figura 53. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 3º período, estado PR. Fonte: Autor.....	49
Figura 54. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 1º período, estado MS. Fonte: Autor.....	49
Figura 55. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado MS. Fonte: Autor.....	49
Figura 56. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 3º período, estado MS. Fonte: Autor.....	49
Figura 57. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado MT. Fonte: Autor.....	50
Figura 58. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado MT. Fonte: Autor.....	50
Figura 59. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 3º período, estado MT. Fonte: Autor.....	50
Figura 60. Resultados de AFLs ao longo do período de avaliação do estudo. Fonte: Autor ..	50
Figura 61. Dados da concentração de AFLs no Estado de MT	51

Resumo

O Brasil é atualmente o 3º maior produtor mundial de milho, sendo que a maior parte desta produção, 70%, é destinada para a produção de ração para alimentação animal. Estudos apontam, no entanto, que 25% de todos os cereais produzidos no mundo estão contaminados com algum tipo de micotoxina, sendo o milho o cereal mais suscetível aos efeitos causados pelo ataque dos fungos que, sob condições de estresse como variações de temperatura, umidade, exposição à luminosidade e disponibilidade de nutrientes, podem desenvolver as micotoxinas.

As micotoxinas são compreendidas como substâncias biológicas naturais produzidas a partir da metabolização secundária de alguns tipos de fungos filamentosos. Cada micotoxina possui um determinado efeito patogênico no indivíduo contaminado, mas em geral promovem menor absorção de nutrientes causando danos a rins, fígado e pulmões, e ainda podem interferir no sistema reprodutivo.

As principais micotoxinas encontradas no milho são *Aflatoxina* (AFL), *Fumonisina* (FUM) e *Zearalenona* (ZEA). O objetivo deste trabalho foi de avaliar a contaminação e incidência de micotoxinas presentes no milho dos principais estados produtores no Brasil ao longo das safras 2015/16, 2016/17 e 2017/18 fazendo o mapeamento da contaminação de micotoxinas nestes estados relacionando o impacto que as condições de estresse de temperatura e precipitação exercem nos teores encontrados das micotoxinas.

Foram encontrados resultados abaixo do limite de quantificação (ALQ) ao longo do estudo para 83,33 % de AFL, 15,92 % de FUM e 53,03 % de ZEA, enquanto que 3,50 % de AFL, 48,84 % de FUM e 10,26 % de ZEA das amostras tiveram resultados acima do valor máximo (AVM) permitido pela legislação. Por apresentar características de desenvolvimento a menores temperaturas e sofrer menos com os efeitos externos, as concentrações e incidência de ZEA reduziram ao longo do período amostrado. O estado que teve destaque em relação aos dados foi o Paraná (PR), o qual teve as maiores incidências e maior concentração desta micotoxina. De modo geral, 55,93 % das amostras analisadas no PR tiveram resultados positivos para a presença de ZEA, com índice de 15,85 % das amostras, com resultados maiores de 400 µg kg⁻¹. Os dados da redução de ZEA estão extremamente relacionados à redução dos índices e melhor distribuição de precipitação acumulada.

As concentrações de AFLs e FUMs apresentam características distintas de ZEA, pois estas micotoxinas são produzidas por fungos que tem a característica de desenvolvimento no pós-colheita. Os dados demonstram que não tiveram a redução gradual, mas as concentrações de modo geral tiveram uma pequena redução entre o primeiro e o último período de avaliação, mas com um aumento no segundo período. A concentração média de FUMs reduziu em 60,35 %, sendo que 83,74 % das amostras apresentaram contaminação por FUMs, e 48,84 % do total tiveram resultados acima de 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Isso demonstra que no período ocorreu redução da incidência com redução na concentração.

A contaminação por AFLs teve redução de 30,63 % nos resultados médios, com redução de 51,12 % de incidência, sendo 3,50 % de amostras com concentração acima de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O estado de Mato Grosso (MT) teve a maior incidência e concentração média de AFLs, com destaque ao segundo período de avaliação, especialmente para os meses entre setembro e dezembro de 2016, onde a maior concentração obtida foi de 824 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFLs.

Os fatores externos de precipitação e temperatura podem ter contribuído para estes resultados, mas como as características de desenvolvimento das AFLs é pós-colheita, o fator estocagem parece exercer o maior papel nas altas concentrações da micotoxina. Como já esperado, fatores externos como temperatura, precipitação e estocagem parecem ser os maiores interferentes na produção de micotoxinas em milho.

Palavras-chave: Monitoramento, Contaminação, Produção, Micotoxinas, Clima.

Abstract

Brazil is currently the 3rd largest producer of corn, most of which are 70%, it is intended to produce feed for animal feed. Studies point, however, that 25% of all cereals produced in the world are contaminated with some type of mycotoxin, with corn being the cereal most susceptible to the effects caused by the attack of fungi that, under stress conditions such as variations in temperature, humidity, exposure to luminosity and availability of nutrients can develop mycotoxins.

Mycotoxins are understood as natural biological substances produced from the secondary metabolization of some types of filamentous fungi. Each mycotoxin has a certain pathogenic effect on the infected individual, but in general promote lower absorption of nutrients causing damage to kidneys, liver and lungs, and can still interfere in the reproductive system.

The main mycotoxins found in corn are Aflatoxin (AFL), Fumonisin (FUM) and Zearalenone (ZEA). The objective of this work was to evaluate the contamination and incidence of mycotoxins present in corn in the main producing states in Brazil throughout the 2015/16, 2016/17 and 2017/18 seasons by mapping mycotoxin contamination in these states relating the impact that temperature stress conditions and precipitation have on the data found of mycotoxins.

Were found results below the quantification limit (ALQ) for 83.33% of AFL, 15.92% of FUM and 53.03% of ZEA, while 3.50% of AFL, 48.84% of FUM and 10.26% of ZEA samples had results above the maximum value (AVM) allowed by legislation. Because it presented developmental characteristics at lower temperatures and suffer less from external effects, the concentrations and incidence of ZEA have reduced over the sampled period. The state that was highlighted in relation to the data was Paraná, where it had the highest incidences and higher concentration of this mycotoxin. In general, 55.93% of the samples analyzed in Paraná had positive results for the presence of ZEA, with an index of 15.85% of the samples with results greater than $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. The data of the reduction of ZEA are extremely related to the reduction of indexes and better distribution of accumulated precipitation.

The concentrations of AFLs and FUMs have distinct characteristics of ZEA. Since these are produced by fungi that have the development characteristic in the post-harvest, the data show that they did not have the gradual reduction, but the concentrations

generally had a small reduction between the first and last evaluation period, but with an increase in the second period. The mean concentration of FUMs reduced 60.35%, and 83.74% of the samples presented FUM contamination, and 48.84% of the total had results above $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$, this demonstrates that in the period there was a reduction in incidence with reduction in concentration.

Contamination by AFLs decreased by 30.63% in the mean results, with a reduction of 51.12% incidence, 3.50% of samples with a concentration above $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. The state of Mato Grosso (MT) had the highest incidence and average concentration of AFLs, especially for the months between September and December 2016, where the highest concentration obtained was $824 \mu\text{g kg}^{-1}$ of AFLs. External precipitation and temperature factors may have contributed to these results, but as the development characteristics of AFLs is postharvest, the storage factor seems to play the largest role in the high concentrations of mycotoxin. As expected, external factors such as temperature, precipitation and storage seem to be the biggest interference in the production of mycotoxins in corn.

Keywords: Monitoring, Contamination, Production, Mycotoxins, Climate

1.0 Introdução

Os fungos podem causar efeitos indesejáveis na agricultura devido à sua elevada capacidade de adaptação [1]. As micotoxinas, substâncias produzidas pelos fungos, são intensivamente estudadas desde 1961, quando metabólitos altamente tóxicos de *Aspergillus flavus*, as AFLs, foram isoladas em rações contendo amendoim que foram importadas pelo Reino Unido [2].

As micotoxinas são compostos orgânicos de baixa massa molecular e que não possuem imunogenicidade. Em climas tropicais e subtropicais, como no Brasil, o desenvolvimento fúngico é favorecido por diversos fatores como a presença de substratos altamente nutritivos e as condições de umidade e de temperatura [3]. Assim, se o surgimento de fungos é dependente do clima, Wu [4] afirma que, devido as alterações no clima, a incidência da contaminação também pode variar.

Um dos metabólitos dos fungos, as micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversas cepas de fungos filamentosos [5], no qual os metabólitos primários são aqueles essenciais ao crescimento dos fungos e os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento, e não possuem significância aparente para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor [6].

O crescimento e a produção de micotoxinas nos cereais como o milho podem ocorrer nas diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, armazenamento e consumo. Hoje são conhecidas mais de 30.000 espécies de micotoxinas, sendo que menos de 300 são estudadas [7]. O milho é um dos cereais mais suscetíveis a contaminação por micotoxinas devido a suas características fisiológicas [8], e uma das principais matérias-primas na produção de ração, e é necessário que se tenha avaliação deste tipo de grão, haja visto que se pode apresentar elevadas concentrações de micotoxinas dependendo da região de produção.

Internacionalmente existem várias legislações que tratam dos limites máximos de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. No Brasil, a Portaria MA/SNAD/FA Nº 07 de 09/11/1988 [9] é a legislação que determina os limites máximos aceitos em milho destinado à produção de ração animal, e as RDC 07 de 18/02/2011 [82] e RDC Nº 59 de 26/12/2013 da ANVISA [81] estabelecem os valores aceitos para a alimentação humana. As Tabelas 1 e 2 trazem alguns dados sobre as legislações

nacionais e internacionais em relação aos limites máximos permitidos em milho destinado a alimentação humana e animal.

Tabela 1. Limites máximos permitidos de micotoxinas em milho destinado a alimentação humana.

País	Micotoxina	Limite Máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Mercosul	AFL	20
Brasil	AFL	20
União Europeia	AFL	5
Brasil	FUM	3000
União Europeia	FUM	400
Brasil	ZEA	300

Tabela 2: Limites máximos permitidos de micotoxinas em milho destinado a alimentação animal.

País	Micotoxina	Limite Máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Brasil	AFL	50
União Europeia	AFL	20
Brasil	FUM	5000
União Europeia	FUM	400
Brasil	ZEA	400
União Europeia	ZEA	300

No Brasil, a legislação aceita valores máximos até $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFL, $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$ de FUM e $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ de ZEA [9]. Entretanto, é possível observar que os valores aceitos internacionalmente são menores. Desde a descoberta das micotoxinas até hoje, não existe um meio eficiente de prevenção da contaminação dos grãos por micotoxinas [10].

O milho tem a sua origem nas Américas, mas é cultivado em todo o mundo. É um alimento muito importante e muito utilizado na nutrição animal e humana [11]. O milho é considerado o componente mais importante como fonte energética na formulação de rações. Se processado corretamente, nas melhores condições de temperatura, há aumento na digestibilidade de seus nutrientes [12, 13]. O aumento da temperatura no tratamento térmico aumenta a digestibilidade dos carboidratos porque a amilase e a amilopectina, organizadas inicialmente em grânulos, são expostas a uma maior ação enzimática quando os grânulos são desfeitos pelo calor [14].

As principais micotoxinas encontradas no milho que podem afetar o desempenho dos animais são as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus* e *A. parasiticus* que atingem principalmente o fígado; as fumonisinas que danificam os pulmões, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*; e a ZEA que tem efeitos estrogênicos afetando o sistema reprodutor, produzida principalmente por espécies de fungos do gênero *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* [15].

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo e podem crescer em uma grande variedade de substratos e sob várias condições de umidade, pH e temperatura. Assim, os grãos estão sujeitos à invasão por fungos e à contaminação com micotoxinas no campo, durante a colheita, processamento, transporte e armazenagem, quando em condições deficientes de manuseio [16, 17, 18].

Sob condições ambientais favoráveis, os fungos podem produzir micotoxinas em produtos agrícolas como o milho durante o crescimento da planta, colheita, armazenagem e industrialização [14] e pode ser acelerado por vários fatores como temperatura, substrato, atividade de água, umidade, pH e tempo [19]. Umidade e temperatura são fatores fundamentais para o desenvolvimento de micotoxinas no milho [20] e, ainda de acordo com Lopes [21], o período de tempo e as condições climáticas que os grãos de milho são expostos a fatores como temperatura e precipitação são fundamentais para a qualidade dos grãos, independente das tecnologias de produção aplicadas na plantação.

As boas práticas agrícolas representam a principal forma de defesa contra a contaminação de cereais por micotoxinas, seguido pela implementação de boas práticas de fabricação durante a manipulação, armazenamento, processamento e distribuição dos cereais para a alimentação humana e animal [5]. Se os animais consomem rações contaminadas por micotoxinas, colocam em risco e comprometem toda a cadeia de produção podendo chegar até o consumidor final, causando sérios riscos à saúde pública.

Quando os animais ingerem micotoxinas, os efeitos podem ser bastante diferentes dependendo da substância, da concentração e do estado de saúde do animal. As micotoxinas implicam em enormes perdas econômicas, sanitárias e comerciais, pois reduzem o rendimento produtivo dos animais e interferem no fator de conversão alimentar, o que muitas vezes acaba sendo confundido com deficiência nutricional [3]. Conforme Figura 1, é possível observar que estes fatores são fundamentais e interferem diretamente na qualidade do milho quanto na produção de micotoxinas [15].

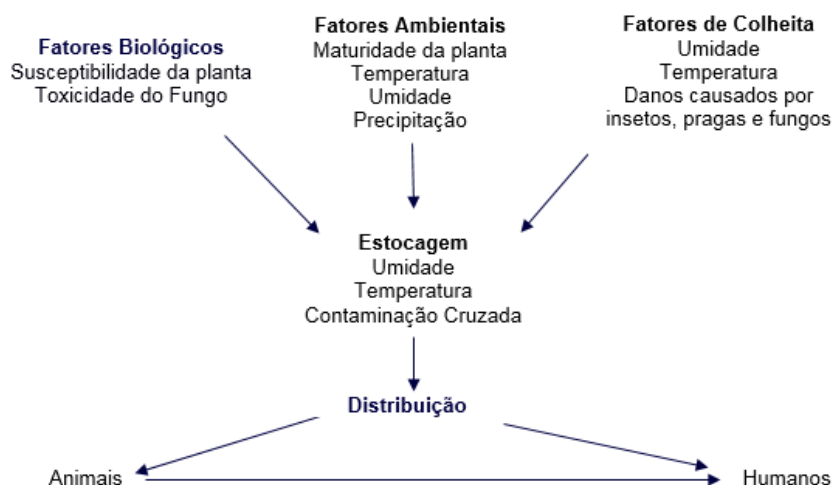


Figura 1. Fatores que contribuem para o desenvolvimento de fungos. Fonte: [15].

No Brasil, a maior parte dos estudos para determinação de micotoxinas em milho é desenvolvida principalmente na região centro sul e, recentemente, na região sul do país. Um estudo [22] demonstrou que amostras de milho comercializadas na região nordeste do país foram analisadas para detectar a ocorrência de micotoxinas e, apesar do clima na região nordeste ser mais seco, 94,6% das amostras analisadas apresentaram concentrações de 20 a 8600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de diferentes micotoxinas.

De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) [23], a safra 2015/2016 apresentou grandes variações de precipitação, temperatura e umidade durante todo o período de produção. No país inteiro, a lavoura foi fortemente afetada pelo comportamento do clima. As temperaturas apresentaram variações significativas e ficaram acima da média na maioria dos estados, registrando ondas de calor muito intensas e baixa umidade relativa do ar. Paralelamente, houve ocorrência de vendavais e chuvas de granizo em diversas regiões produtoras, causadas principalmente pelo fenômeno El Niño. Na região Sul, no início do inverno, ocorreram geadas associadas a fortes chuvas, e no Paraná ocorreram vários focos de ferrugem, provocando grandes prejuízos as lavouras.

Devido ao grande índice de ocorrência e de vários fatores que podem interferir na qualidade do milho, é necessário que seja feito intenso monitoramento dos níveis das micotoxinas presentes nos grãos utilizados para a produção de rações para os animais.

2.0 Micotoxinas

2.1 Aflatoxina

As AFLs são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes, produzidas sobretudo por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sendo o grupo de micotoxinas com o maior impacto na produção de aves [24]. As AFLs constituem um grupo de aproximadamente 20 metabólitos fúngicos, embora somente as AFLs B1, B2, G1 e G2 são consideradas metabólitos tóxicos e são normalmente encontradas em alimentos. É o grupo de micotoxinas com o maior impacto no desenvolvimento de pesquisas na área de micotoxicologia, devido à sua implicação [22]. Quimicamente, são compostos caracterizados pela ligação de dihidrofurano ou tetrahydrofurano a uma estrutura cumarínica altamente substituída, conforme Figura 2.

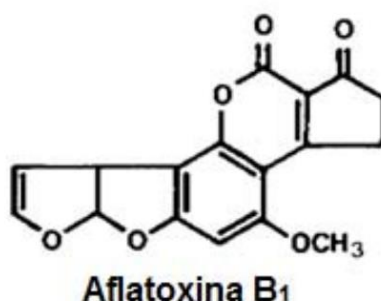


Figura 2. Fórmula estrutural da AFL B1. Fonte: [15].

A AFL B1 é considerada atualmente como a mais tóxica e com maior poder carcinogênico dentre as micotoxinas [25], além de ser também a mais frequentemente encontrada em alimentos. A toxicidade aguda para o fígado, hepatocarcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão, efeito anticoagulante, anemia e diminuição da fertilidade são alguns dos efeitos nocivos da exposição as AFLs. Os efeitos da intoxicação aguda por AFLs caracterizam-se por danos hepáticos, tais como ascite, degeneração hepática, proliferação do ducto biliar e necrose hepática causados em várias espécies animais [26, 27]. Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados à dieta, e a presença de AFLs em alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente em países tropicais [28].

As AFLs tem a capacidade de se ligarem ao DNA das células interferindo na síntese proteica, além de contribuírem para a ocorrência da aplasia tímica - ausência congênita do timo e das paratireóides, com conseqüente deficiência da imunidade celular [29] e as AFLs têm propriedades oncogênicas e imunossupressivas, induzindo infecções em pessoas contaminadas com essas substâncias.

No milho, a contaminação por AFLs tem sido descrita com baixa frequência no Brasil [30]. Entretanto, alguns estudos [31] indicam maior incidência, pois relataram que 35% das amostras de milho analisadas apresentaram contaminação por AFLs no estado do Rio Grande do Sul (RS). Contaminação por AFLs foi encontrada em 60 das 110 amostras de milho recém-colhido analisadas (54,5%) no Estado de São Paulo (SP) [32], com concentrações de AFL B1 variando de 6 a 1600 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Em outros estudos [33, 34] foi encontrada contaminação em 56% das 600 amostras de milho provenientes dos estados do Paraná, Goiás (GO) e Mato Grosso do Sul (MS). Em outro estudo, 98% das 264 amostras de milho em grãos de vários estados brasileiros estavam contaminadas por AFLs [35].

2.2 Fumonisinias

As Fumonisinias (FUM) foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez em 1988 na África do Sul. Foram descritas quatro séries de FUMs, nomeadas por A, B, C e P. As da série B incluem as FUMs mais ativas, sendo a FUM B1 e FUM B2 as mais estudadas, e pouco se conhece acerca da ocorrência das FUMs FUM B3 e FUM B4 [36]. A FUM B1 é considerada a mais importante devido à sua maior toxicidade e por geralmente representar até 70% do total de FUMs produzidas em culturas de laboratório ou em milho naturalmente contaminado.

Estudos mostraram que as FUMs têm efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e imunossupressor [37]. A FUM B1 pode causar leucoencefalomalácia em cavalos e edema pulmonar em suínos [38, 39]. Além disso, estudos demonstram que em seres humanos, altos níveis de FUMs em derivados de milho têm sido associados a casos de câncer esofágico na África do Sul e China [40].

As FUMs são moléculas estruturalmente relacionadas, tendo já sido isoladas e caracterizadas as seguintes espécies; FUM B1, FUM B2, FUM B3, FUM B4, FUM A1,

FUM A2, FUM A3, FUM C1, FUM C3, FUM C4, FUM P1, FUM P2, FUM P3, FUM PH1a, FUM PH1b. Quimicamente, suas estruturas são baseadas na cadeia de pentahidroxi-eicosano contendo grupos metila e também grupos amino (B1 e B2) ou grupos acetil amino (A1 e A2). As FUMs são hidrossolúveis, o que tem dificultado seu estudo. É provável que muitas outras micotoxinas permaneçam ainda desconhecidas, graças a essa característica de hidrossolubilidade [29].

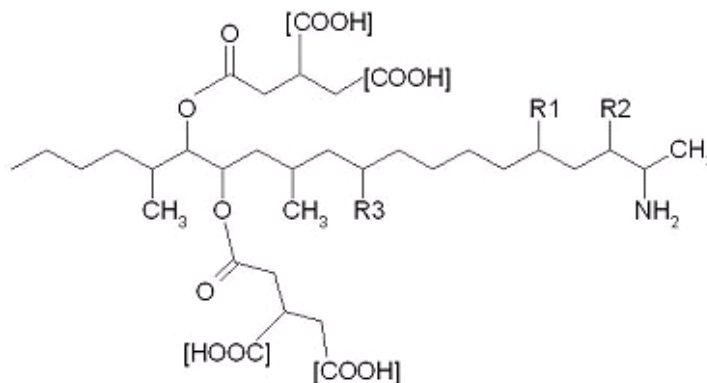


Figura 3. Fórmula estrutural da FUM B1, na qual R1, R2 e R3 = OH. Fonte: [14]

No Brasil, como ocorre em outras partes do mundo, há alta contaminação de milho e produtos derivados com FUM. FUM B1 e B2 foram encontradas em quase todas as amostras de milho provenientes do PR, MS e GO analisadas no período entre 1990 a 1991 [41]. As FUMs B1 e B2 também foram detectadas em aproximadamente 50% dos alimentos à base de milho comercializados na cidade de Campinas, São Paulo [42].

2.3 Zearalenona

A ZEA é uma micotoxina estrogênica que normalmente ocorre junto com o deoxivalenol no trigo e milho [43]. Os efeitos da ZEA são similares aos do hormônio estrogênio, podendo induzir, em altas concentrações, a feminilização, além de interferir na ovulação, concepção, implantação e desenvolvimento fetal [44]. Alguns autores consideram a denominação de toxina para a ZEA inadequada uma vez que, embora biologicamente potente, ela é raramente tóxica. Sua estrutura, na realidade, assemelha-se ao 7β-estradiol, principal hormônio produzido no ovário feminino humano. Segundo alguns estudiosos, a ZEA seria mais bem classificada como estrógeno não esteroideal ou um micoestrógeno [45].

Embora a associação entre a exposição a ZEA e o aparecimento de doenças em humanos ainda seja especulativa, puberdade precoce e ginecomastia em crianças observadas em Porto Rico foram correlacionadas com a alta concentração de ZEA em alimentos à base de milho consumidos por esta população [46].

A ZEA, cuja designação química é 6-(10-hidroxi-6-oxo-*trans*-1-undecenil)-beta-resorcíclico-ácido-lactona [15], é quimicamente descrita como uma lactona fenólica ácida resorcíclica (Figura 3). A ZEA é um metabólito secundário fúngico predominantemente produzido por fungos do gênero *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* [47]. Estas espécies são conhecidas por colonizarem cereais e mostrarem tendência a se desenvolverem em baixas temperaturas [48]. Associados ao milho, esses fungos invadem a planta no estágio de floração, especialmente no período chuvoso e, se os níveis de umidade permanecerem altos após a colheita, o fungo se desenvolve e produz a toxina.

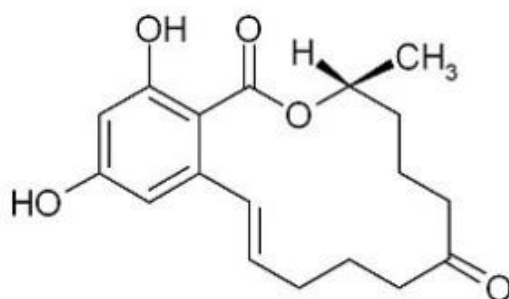


Figura 4. Fórmula estrutural da ZEA. Fonte: [14].

Como as micotoxinas, na sua maioria, são termicamente estáveis, o processo de destoxificação para tornar os grãos seguros para uso geralmente envolvem a adição de adsorventes não-destrutivos que se ligam as micotoxinas no trato gastrointestinal, diminuindo a biodisponibilidade e a toxicidade a ela associadas [15].

3.0 Técnicas de Determinação de Micotoxinas

Existem dois tipos de métodos de análise de micotoxinas, os métodos qualitativos e os métodos quantitativos. Os qualitativos determinam a presença ou não de micotoxinas,

em locais de recepção e armazenamento de matérias-primas para permitir a primeira evidência de amostras contaminadas.

Os métodos para quantificação de micotoxinas englobam, de um modo geral as etapas de amostragem, preparação da amostra, extração, purificação, separação, detecção, confirmação e quantificação. Hoje, existem diferentes métodos analíticos para a determinação de micotoxinas, sendo os mais usuais as técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia a gás/espectrometria de massas (GC/EM) e a técnica enzimática de imunoabsorção (ELISA).

3.1 - Cromatografia Camada Delgada (CCD)

A CCD foi a primeira técnica aplicada para a determinação de micotoxinas, sendo mais recomendada até a década de 1990. No entanto, para sua detecção são necessárias reações químicas que as tornem coloridas para sua detecção [49]. Devido as manipulações e reações necessárias, esta técnica oferece resultados com variabilidade na precisão de até 20% e muitos resultados falsos negativos [50].

O método consiste na separação de componentes de uma mistura mediante a migração diferencial sobre a camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação é fundamentado no fenômeno de adsorção, entretanto, utilizando fases estacionárias tratadas pode ocorrer por troca iônica ou partição [51].

3.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica analítica usada para separar e quantificar componentes numa mistura líquida utilizando pequenas colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões [51]. Para a determinação de micotoxinas, a CLAE deve ser associada à purificação com colunas de imunoafinidade, nas quais sua imunoafinidade é usada para reter antígenos e anticorpos [48]. A fase móvel (líquida) movimenta-se continuamente através da coluna contendo a

fase estacionária, e o soluto interage com as fases estacionária e móvel por adsorção, partição, exclusão molecular ou troca iônica. A CLAE requer que a amostra seja solúvel na fase móvel, sendo o método ideal para a separação de espécies iônicas.

A CLAE é a técnica oficial e mais recomendada internacionalmente por órgãos como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) para a determinação de micotoxinas, com alta seletividade e capacidade de detecção de baixos limites.

3.3 – Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/EM)

A técnica de GC/EM tem sido desenvolvida para a determinação de micotoxinas devido suas características de estabilidade térmica. Estudos [79] foram realizados para comparar os resultados dos métodos GC/EM e ELISA para a determinação de micotoxinas em amostras de alimentos, rações e cereais. Foram verificadas variações entre os resultados médios de 2,9 %, para AFL, FUM e ZEA e 10 % para a determinação de Ocratoxina.

Por meio de um sistema de injeção, na técnica de GC/EM a amostra é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária, e o uso de temperaturas adequadas permite a vaporização das substâncias que de acordo com as suas propriedades ou da fase estacionária, são retidos por tempos determinados saindo da coluna em tempos diferentes. Como as micotoxinas são compostos termicamente estáveis e voláteis, é possível sua determinação utilizando a técnica GC/EM em temperaturas elevadas, sem que haja decomposição [49]. A utilização de detectores adequados como espectrômetro de massas (EM) na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação de substâncias como micotoxinas.

3.4 – Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Este método é baseado nas interações entre anticorpos e antígenos. O fundamento da técnica ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) aplicada à detecção de micotoxinas decorre de uma reação de competição das moléculas eventualmente presentes (micotoxinas) numa determinada amostra, com outras que são adicionadas de forma controlada e que estão convenientemente marcadas (conjugado),

por meio da sua união a anticorpos. Uma vez que ambas têm a mesma afinidade, quanto mais contaminada estiver a amostra, mais moléculas sem marcar irão se unir ao anticorpo [48]. As micotoxinas precisam ser ligadas a proteínas transportadoras para separar complexos antígeno-anticorpo e detectam apenas o marcador livre [50].

Na técnica ELISA, a micotoxina alvo em uma porção do extrato compete com enzimas quimicamente marcadas por sítios de ligação em micropoços que contém anticorpos específicos. A adição de um substrato específico promove a alteração de cor possibilitando realizar a medida de absorbância da amostra [52]. Quanto menor a concentração da micotoxina, maior o desenvolvimento da cor, conforme Figura 5.

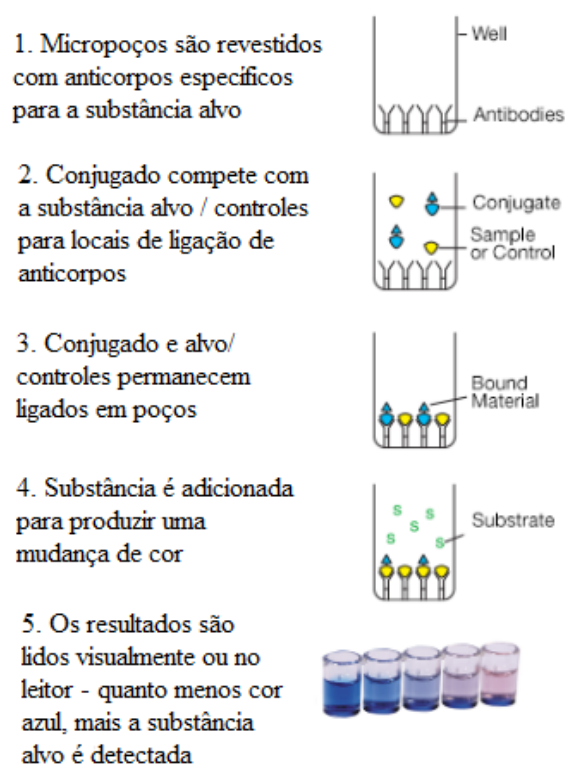


Figura 5. Princípio da técnica ELISA para determinação de micotoxinas. Fonte: [52]

Todas as técnicas para detecção e quantificação de micotoxinas são geralmente difíceis de serem executados, caras e não são adequadas para medidas de controle em tempo real. A Tabela 3 apresenta as principais vantagens e desvantagens da utilização de cada técnica para determinação de micotoxinas.

Tabela 3. Comparação dos métodos analíticos utilizados para a determinação de micotoxinas

Técnica	Vantagens	Desvantagens
GC/EM	Pode identificar mais de um tipo de micotoxina sem testes adicionais.	Muito lento. Mais caro do que outros métodos de análise.
CLAE	Pode identificar mais de um tipo de micotoxina.	Mais caro do que outros métodos de análise. Pode ser necessário teste para a confirmação da presença de micotoxinas. É o método referência para o desenvolvimento de novas metodologias analíticas.
CCD	Pode detectar mais de um tipo de micotoxina	Mais lento que o método ELISA. Pode ser necessário teste para a confirmação da presença de micotoxinas.
ELISA	Rápido, relativamente barato em relação aos demais métodos	Detecta apenas uma micotoxina por vez. Pode ser necessário teste para a confirmação da presença de micotoxinas. Valores de LQ elevados.

Fonte: Autor

A técnica ELISA oferece algumas vantagens em comparação com as técnicas cromatográficas para aplicações de monitoramento da qualidade de produtos e cereais como o milho. Além de garantir a confiabilidade dos resultados, possui menos interferentes tornando-a mais rápida, barata e acessível para as empresas. Apesar da técnica ser capaz de determinar apenas uma micotoxina por vez, o tempo de análise é muito menor que a análise cromatográfica possibilitando a realização de um maior número de análises. A rapidez dos resultados é fundamental para a tomada de decisões mais efetivas nas indústrias. Devido a estas vantagens, no presente estudo foi adotada a técnica ELISA para a determinação das micotoxinas AFL, FUM e ZEA em milho.

4.0 Objetivo Geral

Avaliar a incidência da contaminação por AFLs, FUMs e ZEA em milho produzido nos estados de PR, MT e MS.

4.1 Objetivos Específicos

- Coletar dados de temperatura e precipitação das regiões determinadas produtoras de milho;
- Relacionar os fatores de estresse aos índices de contaminação de cada micotoxina;
- Avaliar a influência das condições de temperatura e precipitação na probabilidade de contaminação de AFLs, FUMs e ZEA;
- Monitorar tendência nos resultados obtidos nos últimos anos da contaminação de AFLs, FUMs e ZEA.

5.0 Procedimento experimental

Os dados de umidade, temperatura e precipitação média diária foram obtidos na plataforma de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET¹) de 100 estações de monitoramento automáticas e convencionais dos estados avaliados. Os dados diários de umidade, temperatura e precipitação foram convertidos em resultados médios mensais e correlacionados aos resultados encontrados de micotoxinas.

6.0 Materiais e Métodos

6.1 Amostras

As amostras de milho foram coletadas de 600 fornecedores diferentes dos estados avaliados, distribuídos em cerealistas, cooperativas, armazéns e agricultores. Para o ensaio de AFLs, foram analisadas 12.372 amostras distribuídas da seguinte maneira: PR (n = 6.316), MS (n = 3.669) e MT (n = 2.387) Para o ensaio de FUMs, foram analisadas 14.009 amostras distribuídas da seguinte maneira: PR (n = 6.194), MS (n = 5.473) e MT (n = 2.342) Para o ensaio de ZEA, foram analisadas 9.268 distribuídas da seguinte maneira: PR (n = 4.972), MS (n = 2.745) e MT (n = 1.551) de. Todas as amostras correspondem ao período entre maio de 2015 e abril de 2018 e foram devidamente identificadas com localização, data de coleta e fornecedor. Após o recebimento das amostras no laboratórios, todas foram analisadas em até 48 horas.

6.2 Extração

Todos os ensaios foram realizados utilizando *kits* de Imunoabsorção Enzimática (Elisa) da marca Neogen[®]. O ensaio de AFL possui limite de detecção (LD) de 1,4 µg kg⁻¹, limite de quantificação (LQ) de 5 µg kg⁻¹ e intervalo de quantificação de 5 à 50 µg kg⁻¹; o ensaio de FUM possui LD de 200 µg kg⁻¹, LQ de 500 µg kg⁻¹ e intervalo de quantificação de 500 à 6000 µg kg⁻¹; e o ensaio de ZEA possui LD de 10 µg kg⁻¹, LQ de 25 µg kg⁻¹ e intervalo de quantificação de 25 à 500 µg kg⁻¹;

¹ <http://www.inmet.gov.br/portal/>

Cada amostra foi particionada em quarteador Johnes (Gehaka) e moída em moedor Marconi com peneira de 0,5 mm. A extração foi realizada com 10 g de amostra diluída em 50 mL solução de metanol 70 % (v/v) em pH 7,0 em agitador tipo Kline, marca Coleman, a 60 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos. A solução foi filtrada em papel qualitativo marca Unifil. Para as amostras com concentração superior ao limite máximo do último ponto da curva de calibração, foi realizada a diluição de 0,5 mL do extrato em 8 mL de água MilliQ-Millipore. Se necessário, outras diluições foram realizadas.

6.3 Metodologias para as Determinações

6.3.1 Aflatoxinas

Para curva de calibração de aflatoxina foram utilizados padrões de 0, 5, 15 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ que são fornecidos juntamente com os kits de análise. O volume de 100 μL do filtrado de cada amostra foi transferido para o micropoço de mistura e adicionou-se 100 μL do reagente conjugado e incubado por 20 segundos à temperatura ambiente. Um volume de 100 μL foi transferido do micropoço de mistura para o micropoço revestido com anticorpos e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. Após período de incubação, a amostra foi descartada e o micropoço lavado 5 vezes com água ultrapura. O excesso de água foi removido agitando-se o micropoço contra papel absorvente. Foi adicionado 100 μL de substrato no micropoço lavado e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente, e, após este período, foi transferido 100 μL de uma solução ácida (reagente *stop*) em cada micropoço para cessar a reação, e realizada medida de absorbância em leitora Elisa usando filtro de 650 nm.

6.3.2 Fumonisinias

Para curva de calibração foram utilizados padrões de 0, 500, 1000, 3000 e 6000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ fornecidos juntamente com os kits de análise. O volume de 100 μL do filtrado de cada amostra foi transferido para o micropoço de mistura e adicionou-se 100 μL do reagente conjugado e incubado por 20 segundos à temperatura ambiente. Um volume de 100 μL foi transferido do micropoço de mistura para o micropoço revestido com anticorpos e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Após período de incubação, a amostra foi descartada e o micropoço lavado 5 vezes com água ultrapura. O excesso de água foi

removido agitando o micropoço contra um papel absorvente. Foi adicionado 100 μL de substrato no micropoço lavado e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente, após período foi transferido 100 μL de reagente *stop* em cada micropoço, e realizada medida de absorbância em leitora Elisa usando filtro de 650 nm.

6.3.3 Zearalenona

Para a realização do ensaio de ZEA foi retirado 1 mL do extrato e diluído em 4 mL de água MilliQ-Millipore. Para as amostras com concentração superior a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi realizada a diluição de 0,5 mL do extrato em 8 mL de água MilliQ-Millipore. Para curva de calibração foram utilizados padrões de 0, 25, 75, 150 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ fornecidos juntamente com os kits de análises. O volume de 100 μL do filtrado de cada amostra foi transferido para o micropoço de mistura e adicionou-se 100 μL do reagente conjugado e incubado por 20 segundos à temperatura ambiente. Um volume de 100 μL foi transferido do micropoço de mistura para o micropoço revestido com anticorpos e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após período de incubação, a amostra foi descartada e o micropoço lavado 5 vezes com água ultrapura. O excesso de água foi removido batendo o micropoço contra um papel absorvente. Foi adicionado 100 μL de substrato no micropoço lavado, e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, após período foi transferido 100 μL de reagente *stop* em cada micropoço, e realizada medida de absorbância em leitora Elisa usando filtro de 650 nm.

6.3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software Action Stat[®] e planilhas de cálculo do Excel[®]. A avaliação por análise de variância (ANOVA) foi a técnica utilizada para tratamento dos dados a confiabilidade de 95%. ANOVA permite avaliar diferentes variáveis que combinadas podem indicar se existem diferenças significativas entre as médias e se os fatores avaliados exercem alguma influência sobre alguma das variáveis que podem ser dependentes.

O coeficiente de correlação de Pearson é um dado estatístico da medida de associação entre diferentes variáveis quantitativas que varia entre -1 e 1. Indica o grau de relação entre variáveis que podem indicar a dependência de um resultado em resposta a variação de alguma variável. Quanto mais próximos os resultados de 1 e -1 indicam alta correlação entre as variáveis, portanto, as variáveis são dependentes. Resultados

que variam de 0 a 0,5 e 0 a -0,5 indicam que há pouca correlação entre as variáveis avaliadas. Apesar do coeficiente de variação ser um fator indicativo do grau de variação do teor de micotoxina em função do fator precipitação e temperatura, existem também um grande número de amostras que não estão contaminadas, sendo estas excluídas dos testes de correlação por não serem variáveis contínuas.

Os dados estatísticos são apresentados ao longo dos resultados no decorrer da discussão de cada micotoxina analisada.

7.0 Resultados

7.1 Precipitação e Temperatura

De acordo com estudo realizado por Rodriguez-Amaral [53], as variações de temperatura e precipitação ano a ano, diferentes climas, práticas agrícolas, manuseio pós-colheita, processamento e condições de armazenamento não devem ser tomados como absolutos, mas são indicativos das causas de diferentes níveis de contaminação. O clima no Brasil é muito diversificado, o que pode favorecer o desenvolvimento de micotoxinas no milho. O clima de uma região é condicionado por fatores como precipitação, umidade relativa, radiação solar, temperatura do ar, velocidade do vento, direção do vento e pressão atmosférica [14]. Esses fatores, por sua vez, são influenciados por altitude, latitude, topografia, características do solo e da vegetação, entre outros aspectos [54, 55].

Os dados de precipitação e temperatura podem estar diretamente relacionados aos resultados de micotoxinas analisadas no presente estudo. Os estados de MT e MS apresentam distribuições semelhantes na precipitação, diferentemente do PR que concentra a precipitação entre novembro a março e reduzindo a média deste período de ano a ano. Estes dados são apresentados conforme Figuras 6 e 7.

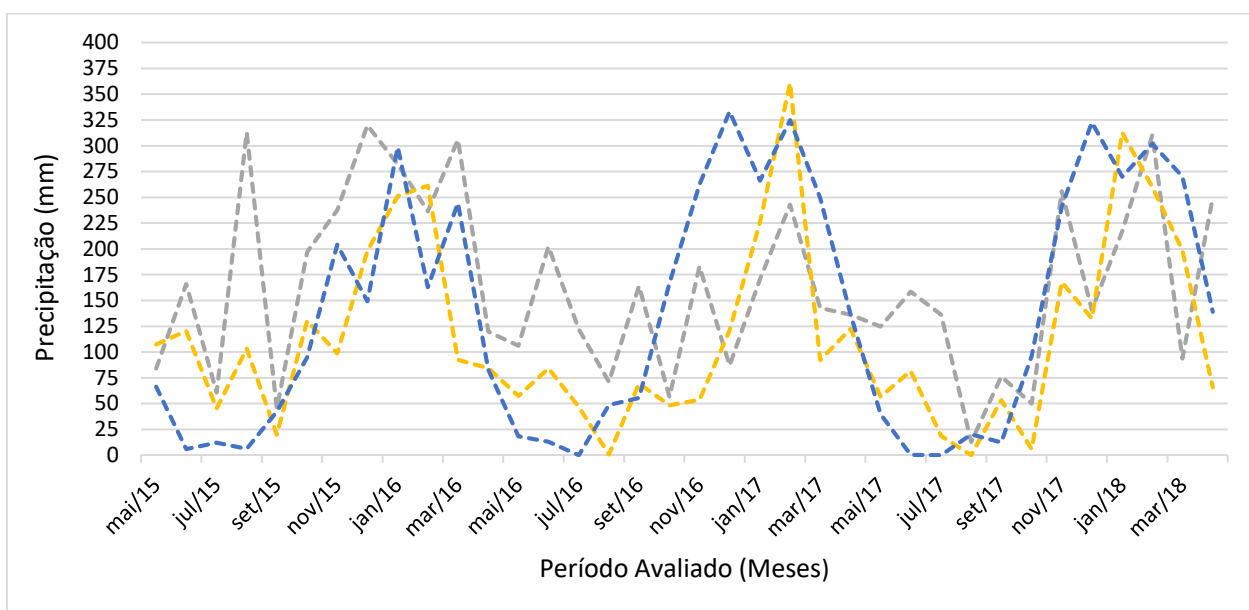


Figura 6. Dados de Precipitação média entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: [56]

— PR;
— MT;
— MS.

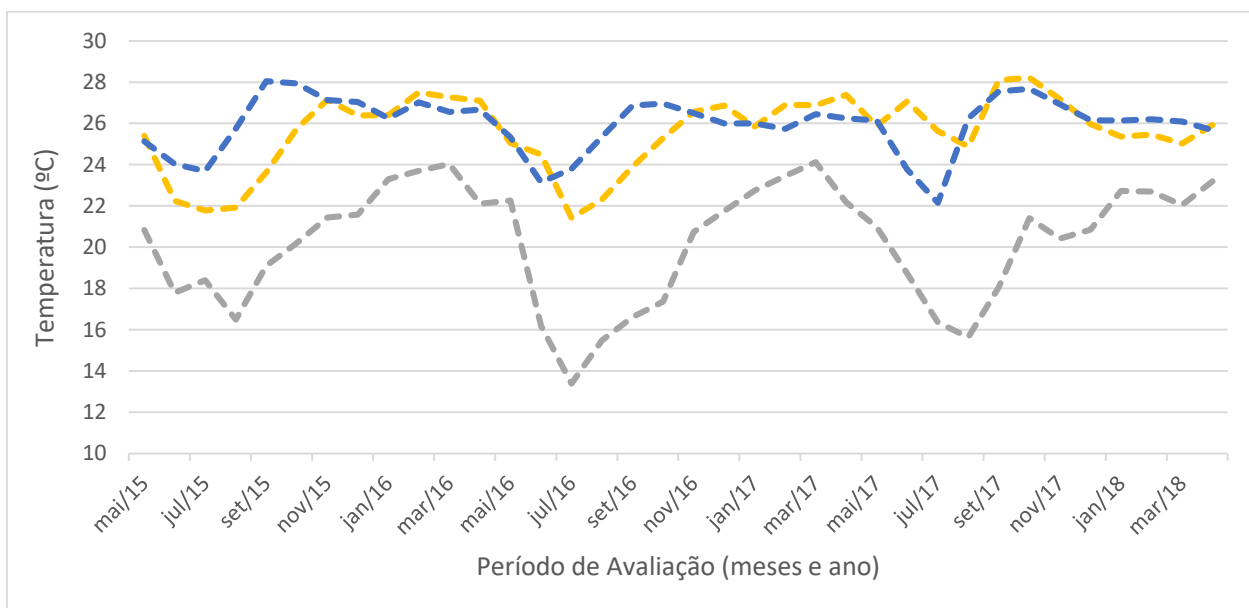


Figura 7. Dados de Temperatura média entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: [56]

— PR;
— MT;
— MS.

As variações de temperatura entre os períodos de avaliação são pouco significativas ($p > 0,05$; 0,093), entretanto, é possível observar variação nesta condição ao longo do mesmo período, e observar similaridade entre os dados de temperatura e

precipitação durante o mesmo período do ano. Estas variações são na sua maioria decorrentes da estação do ano, as quais o período de inverno tem as menores temperaturas e menores índices de precipitação. Entre os estados é possível observar diferenças nestes índices, que serão discutidas e contextualizadas ao longo das discussões acerca dos resultados das micotoxinas.

7.2 Zearalenona

A contaminação por ZEA em milho foi detectada em diferentes estados e períodos. A análise de variância (ANOVA), utilizando programa Excel profissional *plus*, versão 2013 mostra que existem diferenças significativas durante o período de avaliação ($p < 0,05$) entre os Estados do PR e MT ($F = 18,32$) e MT e MS ($F = 20,01$). Entre PR e MS ($F = 0,92$) não há diferença significativa. Como demonstrado na Tabela 4, ao decorrer do período de avaliação, todos os estados seguem a mesma tendência de diminuição de resultados médios em função do tempo.

Tabela 4. Resultados médios de ZEA entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: Autor.

	2015/16		2016/17		2017/18	
	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
PR	458,5 \pm 537,2	6500,0	240,5 \pm 266,2	7800,0	120,3 \pm 184,2	2700,0
MS	441,2 \pm 464,4	3632,0	150,1 \pm 197,8	1835,0	107,8 \pm 150,1	1100,0
MT	119,8 \pm 140,2	860,3	105,7 \pm 142,1	891,5	57,0 \pm 42,7	175,0

S = Desvio padrão médio

De acordo com os resultados das análises realizadas, o estado do PR apresentou a maior variação de ZEA no período de maio de 2015 à abril de 2016, com resultado máximo de 6500,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mesmo período que os demais estados apresentaram as maiores variações, sendo menos representativas que a do estado do PR. Para os demais períodos, a menor variação foi no estado do MT no período de maio de 2017 à abril de 2018 com concentrações de até 175,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mesmo período no qual ocorreu a menor concentração média encontrada em todos os estados, 120,3, 107,8 e 57,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No período inicial (2015/16), dados [23] apontam que a lavoura foi fortemente afetada pelas condições climáticas, e as temperaturas apresentaram variações significativas e ficaram acima da média na maioria dos estados, registrando ondas de calor muito intensas e baixa umidade relativa do ar conforme apresentado anteriormente nas Figuras 6 e 7.

Observa-se que os resultados médios de ZEA diminuíram 72,03 % na relação do primeiro para o último período de avaliação. Da mesma forma, a frequência da contaminação média diminuiu de 73,17 % para 15,15 % no mesmo período, o que representa uma redução de 58,02 % na presença de amostras contaminadas com ZEA. A porcentagem de amostras acima de $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ calculadas a partir das amostras contaminadas também diminuiu significativamente ao longo do período, sendo os índices de contaminação verificados entre as Figuras 8 e 16.

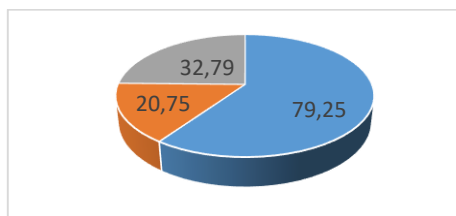


Figura 8: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 1º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

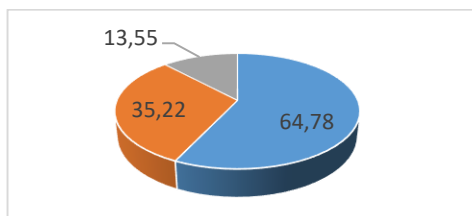


Figura 9: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

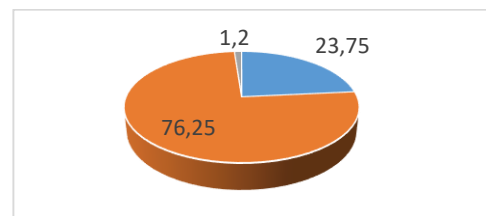


Figura 10: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 3º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

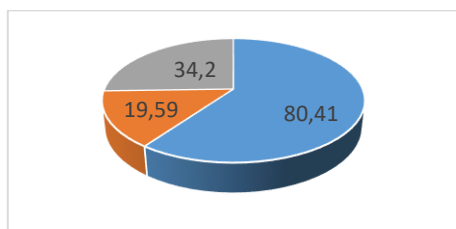


Figura 11: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 1º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

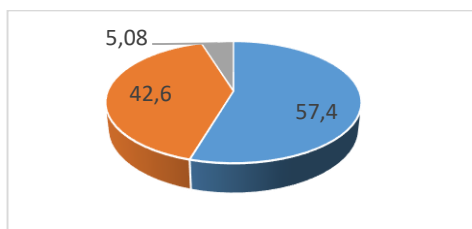


Figura 12: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

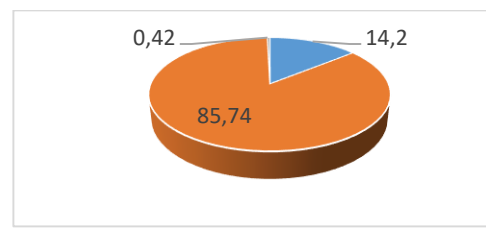


Figura 13: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 3º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

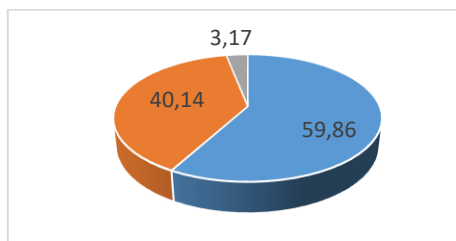


Figura 14: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado MT. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

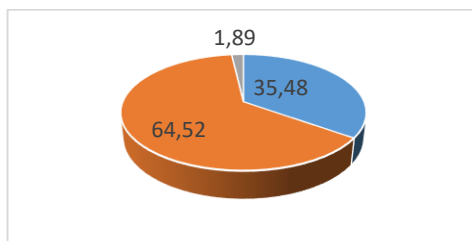


Figura 15: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 2º período, estado MT. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

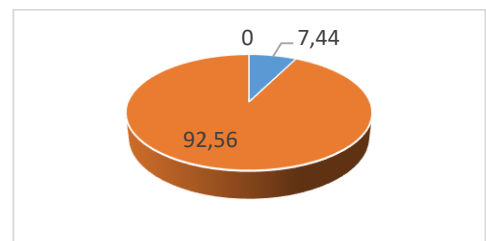


Figura 16: Percentual de contaminação de amostras com ZEA no 3º período, estado MT. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

Legenda:

%AVM: percentual acima do valor máximo permitido

%ACO: percentual amostras contaminadas

%ALQ: percentual abaixo do limite de quantificação

A redução no teor médio para Zearalenona entre os períodos é observada na Figura 17.

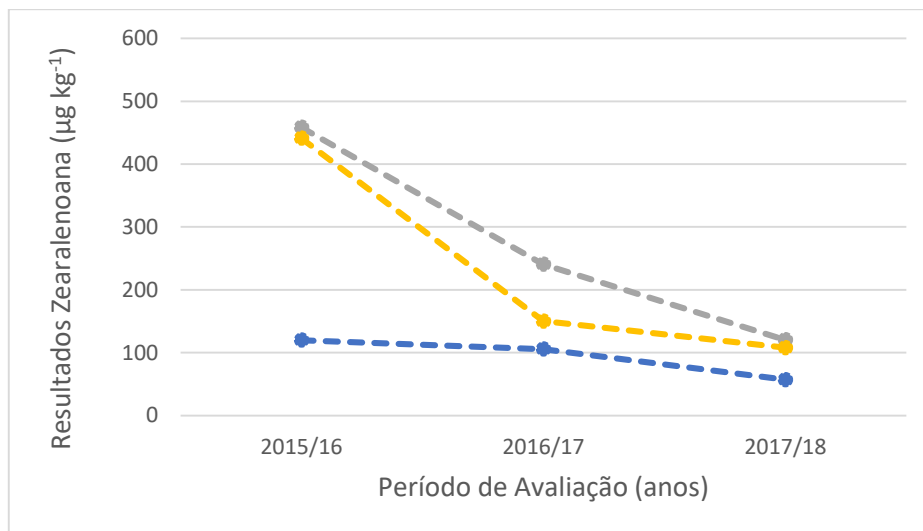


Figura 17: Resultados médios de ZEA ao longo do período de amostragem. Fonte: Autor

— PR;
— MT;
— MS.

Dados apontam que para a safra 2015/16 houve ocorrência de vendavais e chuvas de granizo em diversas regiões produtoras, causadas principalmente pelo fenômeno El Niño [23]. Na região Sul, no início do inverno, ocorreram geadas e fortes chuvas, enquanto que no PR ocorreram vários focos de ferrugem, evidenciando a diminuição da qualidade do grão possibilitando as condições adequadas para aumento na concentração de micotoxinas [57]. Entretanto, na safra 2017/18 ocorreram adversidades climáticas na época de plantio (estiagem), estágio vegetativo (excesso de chuvas) e na fase reprodutiva com excesso de chuva, falta de luz e falta de calor no estado do PR sendo que os demais estados apresentaram maior estabilidade no clima e na distribuição das chuvas [58]. A maior estabilidade no clima afetou positivamente a qualidade do grão produzido, sendo isso verificado diretamente na concentração de ZEA encontrada nas amostras avaliadas.

Em todos os estados avaliados no período amostrado, foi detectada a presença da ZEA em 6946 das 14789 amostras analisadas, o que representa 46,97 %. A quantidade de 1131 amostras apresentaram concentrações de ZEA acima de $400 \mu\text{g kg}^{-1}$, o que representa 10,26 % do total de amostras. O estado do PR teve a maior quantidade de amostras acima do valor máximo permitido ($n = 690$), além da maior média, $273,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e maior percentual de amostras com concentração acima de $400 \mu\text{g kg}^{-1}$, 15,85 %.

Estes índices são bastante preocupantes, pois apesar dos níveis médios estarem abaixo do limite preconizados de $400 \mu\text{g kg}^{-1}$, para algumas espécies e raças de animais estes níveis são considerados elevados. Em um estudo [59] foi realizada a avaliação de 120 amostras de milho safrinha de 2018 oriundos dos estados do Pará (PA), Maranhão (MA), MT, MS, Minas Gerais (MG), PR e RS, sendo detectada a presença de ZEA em apenas 0,8% das amostras, no entanto, com concentração média de $704,9 \mu\text{g kg}^{-1}$. A incidência de contaminação é baixa, comparada com o presente estudo que, no mesmo período, encontrou contaminação em 15,15 % das amostras nos estados do PR, MS e MT.

Quando o índice de precipitação é avaliado, o estado do PR tem os dados mais elevados no primeiro período, com precipitação média de 162,3 mm, fator fundamental para o desenvolvimento de micotoxinas. No estudo realizado por Oliveira e colaboradores [60] foram analisadas amostras neste estado ($n = 57$) e detectou-se a presença de ZEA em 73,6 % das amostras, com concentrações de até $444,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de milho. Queiroz [61] relata a presença de ZEA em 95 % das amostras de milho do Brasil, com níveis até $990 \mu\text{g kg}^{-1}$, e em outro estudo [62], em vinte variedades de milho da região Sul do Brasil, relatou-se a presença em 75 % das amostras, com níveis de até $640 \mu\text{g kg}^{-1}$. Estudos [63] relatam a contaminação de milho com ZEA em níveis médios de $195,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. No entanto, outro estudo [64] relata níveis mais baixos de ZEA, até $12,26 \mu\text{g kg}^{-1}$, e [65], em seu estudo, não encontraram a presença de ZEA em milho produzido em Goiás (GO) no ano de 2016, no entanto sua amostragem foi bastante reduzida (7 amostras).

Os demais estados têm o maior período de precipitação média entre os meses de outubro a março do ano. Pode-se observar que nos estados de MT e MS ocorre tendência de aumento da concentração de ZEA conforme ocorre aumento na temperatura e precipitação média mensal. Conforme Tabela 5 e Figuras 6 e 7 observa-se que os mesmos períodos nos quais há maior volume de precipitação, há também

maior temperatura, fato observado ao longo dos três períodos, sendo que houve maior precipitação média no período 2015/16, mesmo período no qual houve a maior presença de contaminação.

A análise de correlação demonstra que o aumento na precipitação responde por 10,63% do aumento na concentração de ZEA para o estado do PR (correlação = 0,326), enquanto que o aumento na temperatura corresponde por aumento de 15,05% no teor de ZEA (correlação = 0,388) em milho proveniente do estado do PR. Para o estado do MT variações na precipitação e temperatura não influenciam no teor de ZEA (correlação = -0,085 e 0,038), já para o estado de MS o aumento na temperatura corresponde a um aumento de 2,50% do teor de ZEA (correlação = 0,158).

Tabela 5. Dados de precipitação e temperatura média. Fonte: [56]

	2015/2016		2016/2017		2017/2018	
	Precipitação média (mm)	Temperatura média (°C)	Precipitação média (mm)	Temperatura média (°C)	Precipitação média (mm)	Temperatura média (°C)
PR	197,3 ± 101,0	20,7 ± 2,4	140,4 ± 55,5	19,6 ± 3,6	152,2 ± 90,4	20,3 ± 2,5
MS	126,1 ± 74,8	26,3 ± 2,2	106,9 ± 97,7	25,7 ± 1,9	112,8 ± 102,4	25,9 ± 1,1
MT	114,2 ± 97,99	23,0 ± 1,4	156,2 ± 127,2	22,5 ± 1,2	142,8 ± 129,8	22,1 ± 1,5

Resultado de precipitação e temperatura média ± desvio padrão médio

Nos estados de MT e MS, o período que antecede o mês de maio é o que apresenta as maiores temperaturas médias, sendo que nestas regiões de altas temperaturas pode ocorrer impacto na fase de enchimento dos grãos reduzindo a produtividade com perda de peso e da qualidade do grão devido à exposição às condições de estresse.

Alguns fatores característicos são importantes serem avaliados, como a distribuição dos resultados ao longo dos períodos. É nesta condição que é possível observar o mesmo padrão de repetição dos resultados entre o primeiro e terceiro trimestre de alguns estados conforme Figuras 18 e 19.

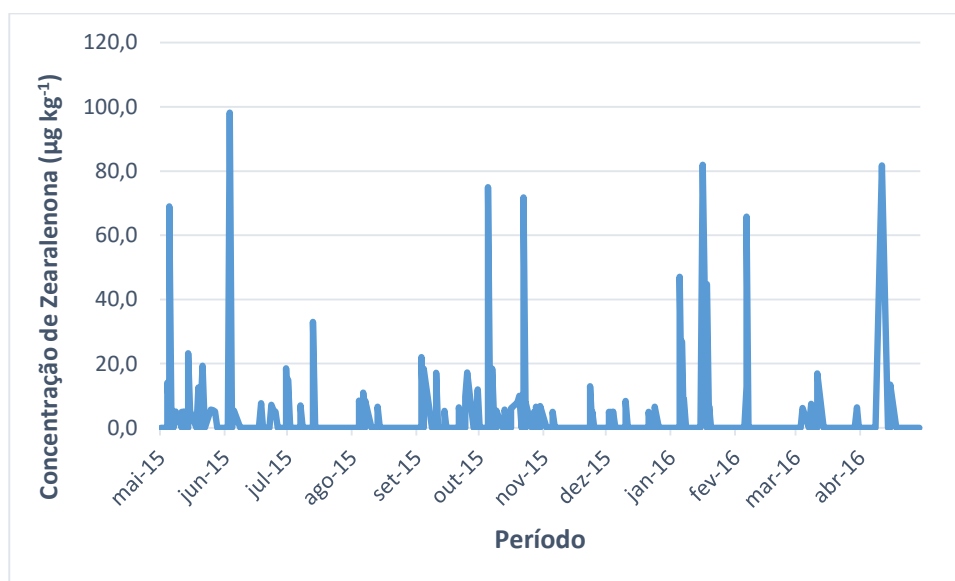


Figura 18. Resultados de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de ZEA no estado de MT, período 2015/2016.
Fonte: Autor

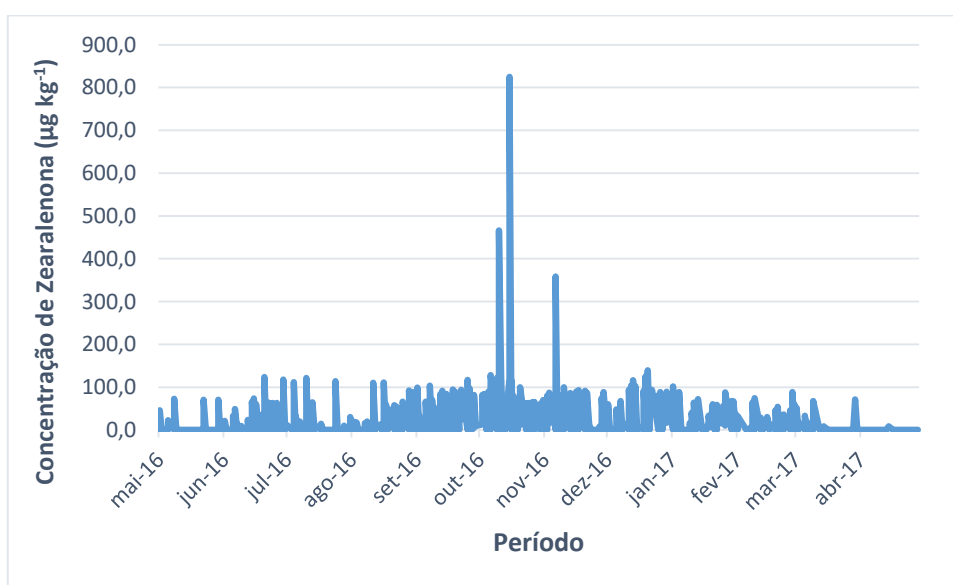


Figura 19. Resultados de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de ZEA no estado de MT, período 2016/2017.
Fonte: Autor.

No primeiro trimestre do período (maio 2015 a abril 2016) para o estado de MS e para o segundo período (maio 2016 a abril 2017), no estado de MT, existem maiores quantidades de amostras com elevadas concentrações de ZEA. Este comportamento pode estar ocorrendo no primeiro trimestre devido à diminuição de 42,22 % do volume total de precipitação, enquanto que para o terceiro trimestre está ocorrendo o aumento de 104,38 % do volume de precipitação, o que pode indicar que, além do excesso de

umidade e chuva, a diminuição da umidade relativa do ar também interfere diretamente na condição da qualidade do grão produzido.

O estado do PR apresenta a maior variação dos demais estados avaliados. A concentração é a mais elevada e não apresenta nenhuma tendência que é visualizada dos demais estados. Houve, no entanto, diminuição entre o período 2015/16 para 2017/18 de 73,76 % na concentração e de 55,50 % na incidência de ZEA em milho produzido no PR conforme Figuras de 20 a 22.

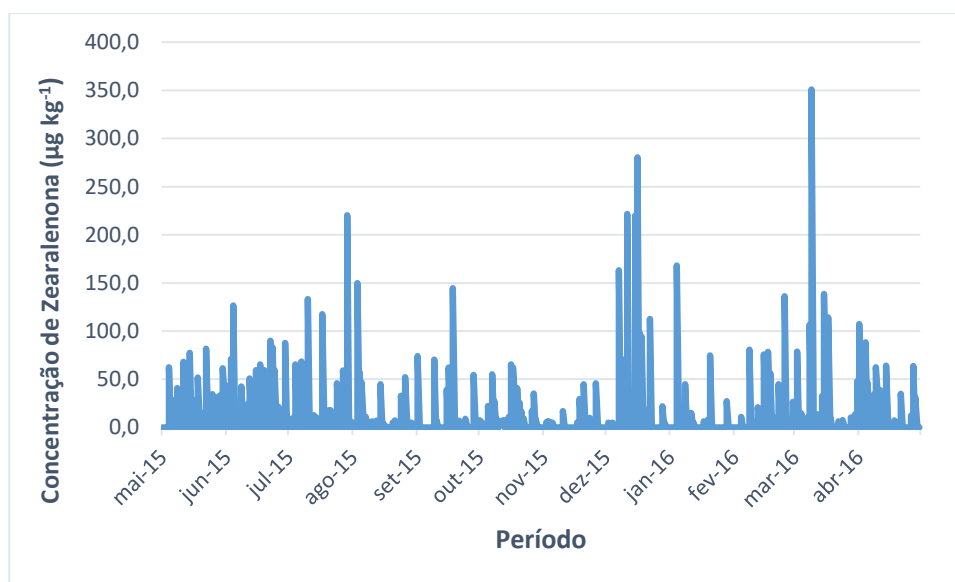


Figura 20. Resultados de ZEA ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no estado do PR no período 2015/2016. Fonte: Autor.

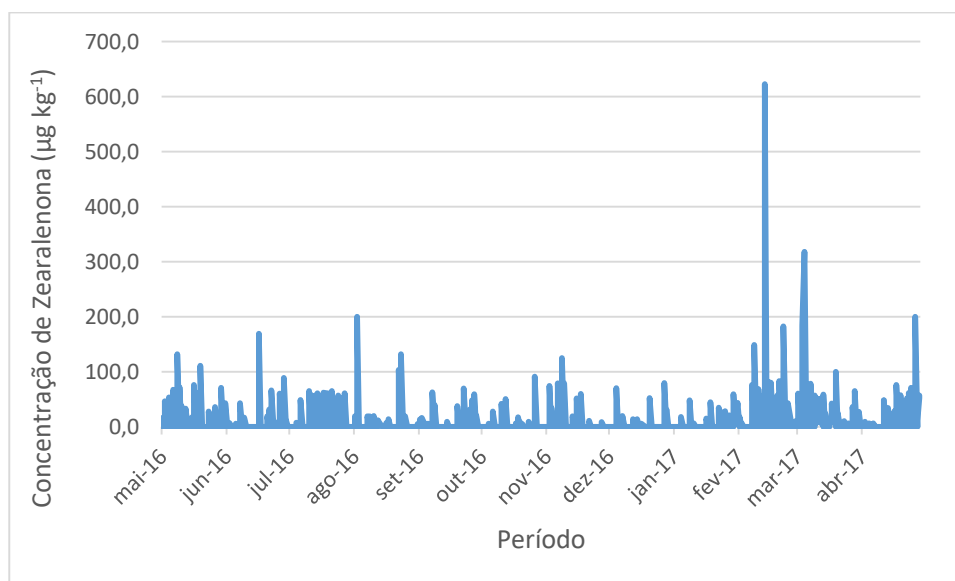


Figura 21. Resultados de ZEA ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no estado do PR no período 2016/2017. Fonte: Autor.

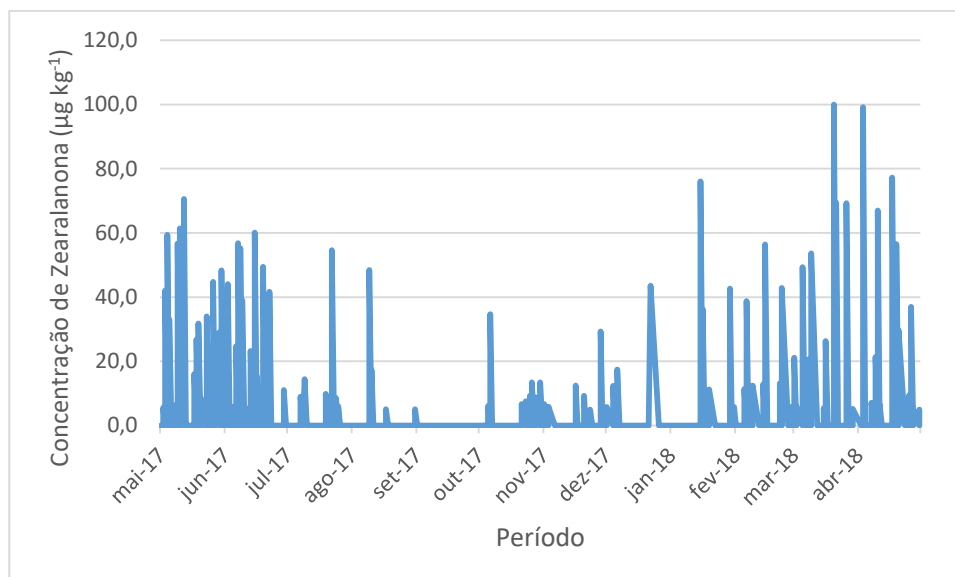


Figura 22. Resultados de ZEA ($\mu\text{g kg}^{-1}$) no estado do PR no período, 2017/2018. Fonte: Autor.

O estado do PR apresentou a maior quantidade de amostras com teor de ZEA acima de $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($N= 690$), além de ter a maior concentração média em todos os períodos avaliados, $273,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, e os maiores níveis de contaminação máxima, $8300 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2015/16), $7800 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2016/17) e $2700 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2017/18). Estes valores quando comparados com os resultados médios dos estados de MS e MT (com médias gerais de $233,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $94,17 \mu\text{g kg}^{-1}$) demonstram a alta contaminação das amostras oriundas do PR. Estes dados demonstram também que apesar dos estados de MS e PR serem os grandes produtores de milho, é de onde provém também a maior quantidade média de amostras contaminadas com ZEA, $55,93 \%$ no PR e $50,69 \%$ no MS.

Dentro do mesmo estado avaliando os três períodos é possível observar que em alguns casos há diferenças conforme entre as Figuras 23 e 25.

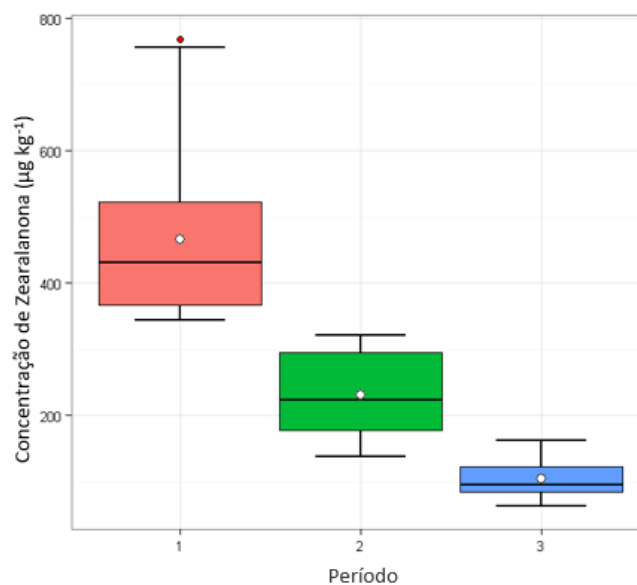


Figura 23: Comparação dos resultados médios anuais de ZEA no estado do PR ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

Estatisticamente, os dados de análise de variância (ANOVA) para $p < 0,05$ demonstram que existe diferença significativa entre os valores do primeiro período para os valores dos demais períodos. Conforme Figura 23, há uma grande redução na concentração média por período de avaliação, sendo este mesmo dado observado nas Figuras 24 e 25.

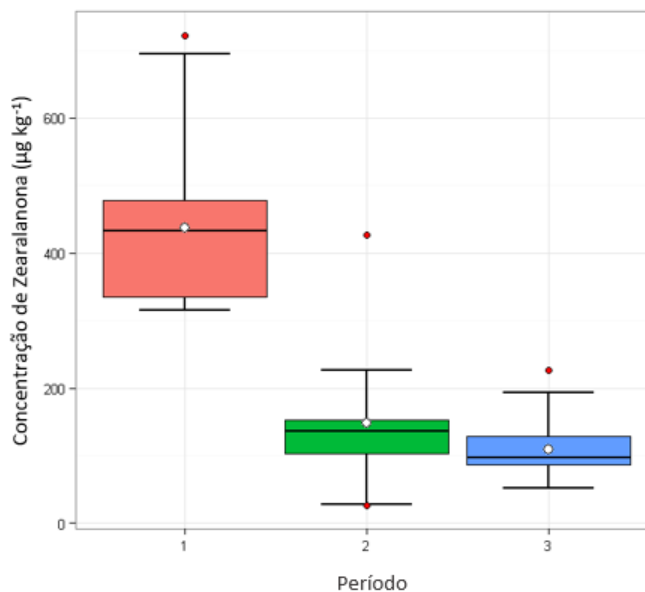


Figura 24: Comparação dos resultados médios anuais de ZEA no estado do MS ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

No estado do MS, estatisticamente os dados de análise de variância (ANOVA) demonstram que assim como no PR há diferença significativa entre os valores do primeiro período para os valores dos demais períodos. Entretanto, a concentração média no segundo e terceiro período de avaliação não foram significativamente diferentes.

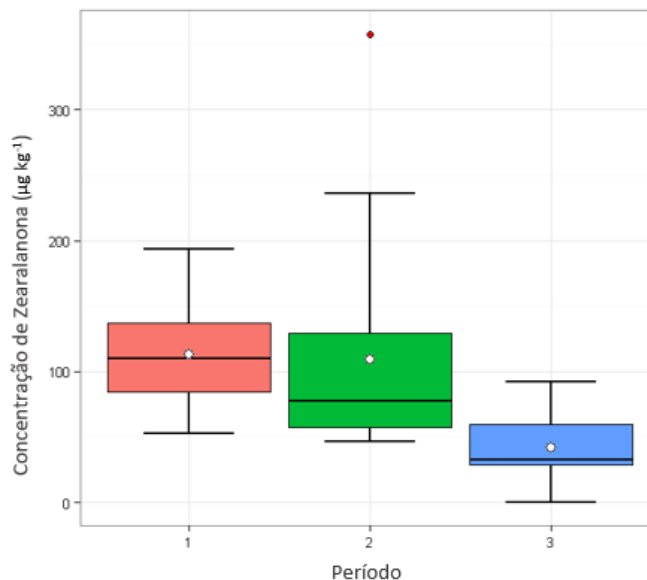


Figura 25. Comparação dos resultados médios anuais de ZEA no estado do MT ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

Estatisticamente os dados de análise de variância (ANOVA) para $p < 0,05$ (0,139) demonstram que não existem diferenças significativas nas concentrações médias dos diferentes períodos para o estado do MT. Apesar de ser observada redução na concentração média, a concentração de ZEA no estado do MT é muito menor em comparação com os estados de PR e MS.

Ao longo do período de avaliação, pode ser observado que durante o primeiro período (maio/2015 a abril/2016) ocorreu grande variação nos resultados com posterior melhora e estabilidade. A variação inicial é decorrência direta das variações que ocorreram no clima no período, e são observadas com uma posterior melhora e estabilidade nas condições e distribuições de precipitação e temperatura, fatores que contribuíram significativamente para diminuir a incidência de ZEA e, assim, melhorar a qualidade dos grãos em geral, conforme Figura 26.

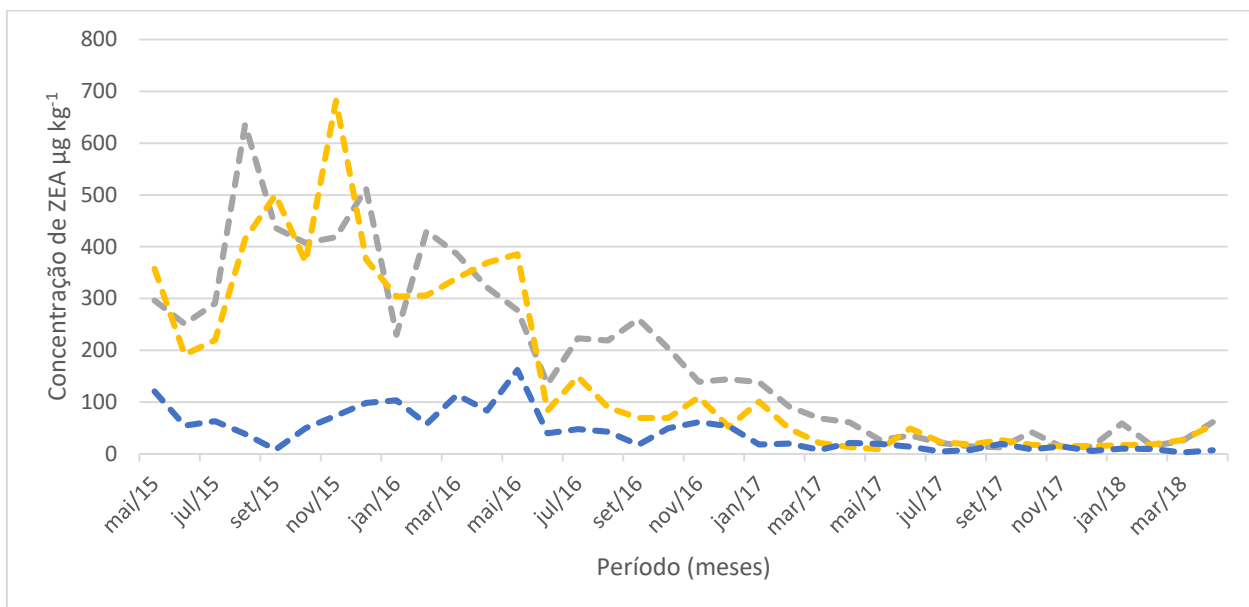


Figura 26: Resultados médios de ZEA ao longo do período de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

— PR;
 — MT;
 — MS.

Pode ser observado que ao longo do tempo houve diminuição nos resultados de ZEA em todos os estados avaliados. Estes dados são importantes pois demonstram como estão os níveis de contaminação por ZEA encontrados nos grãos de milhos, pois a falta de monitoramento pode acarretar grandes prejuízos à saúde dos animais e financeiros aos produtores. As elevadas concentrações de ZEA em milho destinado a produção de ração animal pode impactar diretamente nos ganhos reais principalmente para mamíferos, visto que seus efeitos são similares aos do hormônio estrogênio, podendo induzir, em altas concentrações, a feminilização, além de interferir na ovulação, concepção, implantação e desenvolvimento fetal [66].

A combinação do alto índice de precipitação no primeiro período pode ser um fator fundamental para os altos resultados de ZEA principalmente no estado do PR, devido à combinação de fatores ideais que podem favorecer o desenvolvimento da ZEA. A temperatura média demonstra exercer impacto com menor significância. Contudo, medidas preventivas devem ser tomadas em todas as etapas de produção, armazenamento e proteção das influências climáticas para minimizar os efeitos causadores do desenvolvimento de micotoxinas para que se tenham produtos seguros e de qualidade.

7.3 Fumonisinás

Estatisticamente, os dados demonstram, a partir da análise de variância (ANOVA) que não existem diferenças significativas entre os estados amostrados durante o período de avaliação ($p < 0,05$), sendo PR e MT ($F = 1,92$), MS ($F = 2,44$) e entre PR e MS ($F = 0,78$). Como demonstrado na Tabela 6, pode ser observado que os resultados de FUMs não seguem a mesma tendência que a micotoxina ZEA, uma vez que durante o período de avaliação, todos os estados tiveram a tendência de diminuição de resultados médios com o tempo. Para o estado do PR ocorreu diminuição dos resultados no segundo período com ligeiro aumento no terceiro, entretanto, para os estados de MT e MS ocorreu o inverso, aumento no segundo período e diminuição no terceiro.

Tabela 6. Resultados de FUM entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: Autor

	2015/16		2016/17		2017/18	
	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
PR	11445,8 \pm 10221,0	95100,0	9632,7 \pm 8676,8	67000,0	2732,2 \pm 5043,7	9000,0
MS	14375,0 \pm 11619,5	84000,0	16561,7 \pm 8568,3	97500,0	7224,6 \pm 12630,6	98400,0
MT	9970,6 \pm 5341,4	52000,0	10635,9 \pm 5549,3	44800,0	4232,8 \pm 6004,0	8000,0

Resultado \pm desvio padrão.

De acordo com os dados analisados, pode ser observado que o estado do MS apresentou a maior concentração de FUMs no período avaliado, de 14.375,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 16.561,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 7.224,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, o estado do PR apresentou a maior redução na concentração média de resultados entre os períodos, 76,13 %, seguido pelos estados de MT, 57,55 % e MS, 49,74 %. Estes dados demonstram que, apesar das maiores concentrações de FUM serem oriundas do estado do MS, é onde há maior estabilidade dos resultados ao longo do período, evidenciando uma tendência de desenvolvimento desta micotoxina nesta região produtora. Conforme dados apontados pela CONAB [23] na safra 2015/16, ocorreram intensas variações nas condições de temperatura e precipitação, fatores fundamentais que podem interferir significativamente na qualidade dos grãos. Entretanto, é observado aumento 15,21 % na concentração média entre o primeiro e o segundo período de avaliação para o estado do MS.

A concentração média diminuiu 60,35 % em relação ao primeiro e o último período, entretanto, quando são avaliados individualmente os períodos, é possível verificar que para os estados de MT e MS ocorreu aumento na concentração de FUM entre o primeiro

e o segundo período, sendo de 11,71 %. Estes dados de FUMs em comparação com os de ZEA apresentam discordância, pois ao contrário houve redução da contaminação ao longo de todo o período. O estado do PR foi o único que apresentou redução da contaminação durante todo o período. Quando é avaliada a concentração média por período em cada estado, é possível observar redução durante os períodos conforme Figuras 27 a 29.

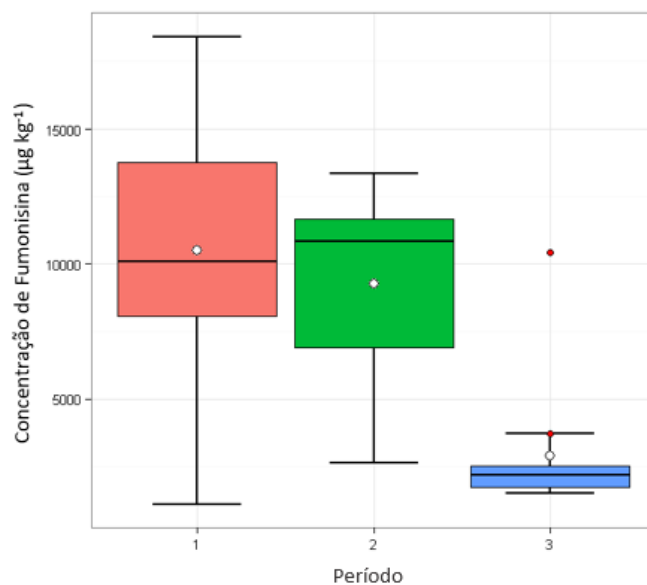


Figura 27. Comparação dos resultados médios anuais de FUM no estado do PR ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

A análise de variância (ANOVA) demonstra que estatisticamente o primeiro e o segundo período não possuem diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração média de FUM, entretanto, há grande amplitude dos resultados nestes períodos, contribuindo para que não exista diferenças significativas entre eles e o terceiro período. Se os dados de amplitude não fossem considerados a redução na concentração de FUM durante todo o período, 60,35 %, evidenciaria grande diferença significativa entre o terceiro período dos demais. Com a redução na concentração, houve também a redução do percentual de amostras com resultados AVM.

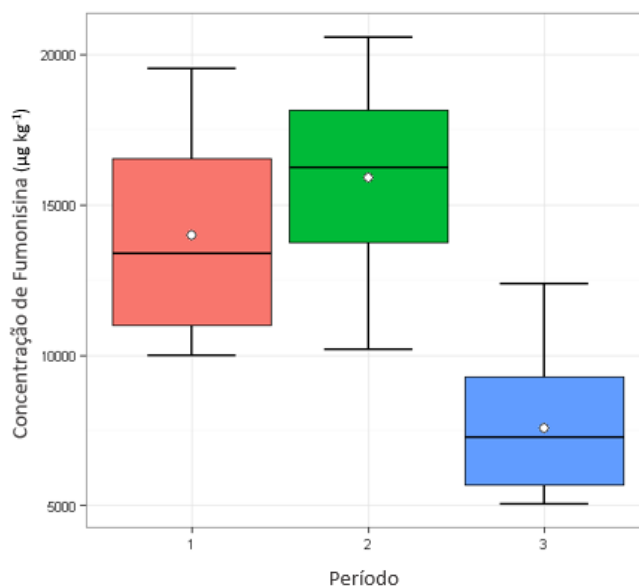


Figura 28. Comparação dos resultados médios anuais de FUM no estado do MS ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

Estatisticamente os dados demonstram que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores durante os períodos para o estado do MS. Assim como no estado do PR, os dados apresentam grande amplitude dos valores, contribuindo para que não exista diferenças significativas entre eles e o terceiro período.

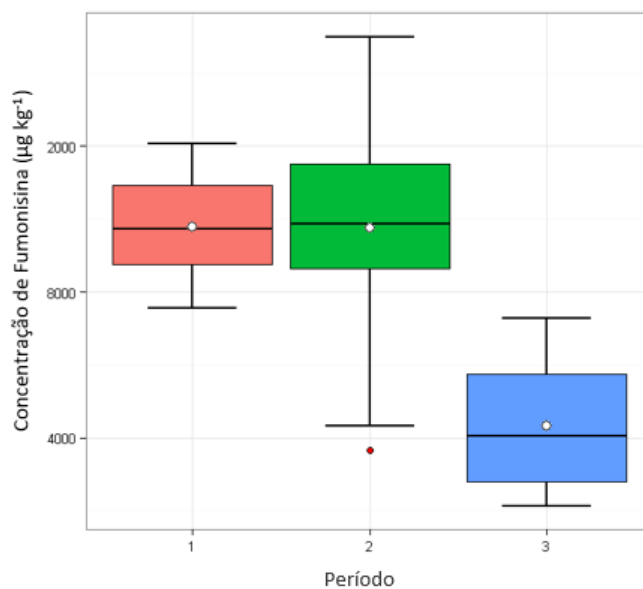


Figura 29. Comparação dos resultados médios anuais de FUM no estado do MT ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

Estatisticamente não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores do primeiro e segundo período, mas há diferença significativa entre os valores do primeiro com o terceiro período para o estado do MT. Entretanto, o segundo período tem grande amplitude nos resultados, que mesmo com a redução de 60,20 % na concentração média para o terceiro período acaba o deixando estatisticamente similar ao terceiro período.

É possível observar, entretanto, que houve variação pouco significativa nos índices de precipitação e temperatura no segundo período em relação aos demais, sendo que ocorreu pequena redução mínima nestes índices 4,54 % e 1,95 % conforme Figura 30.

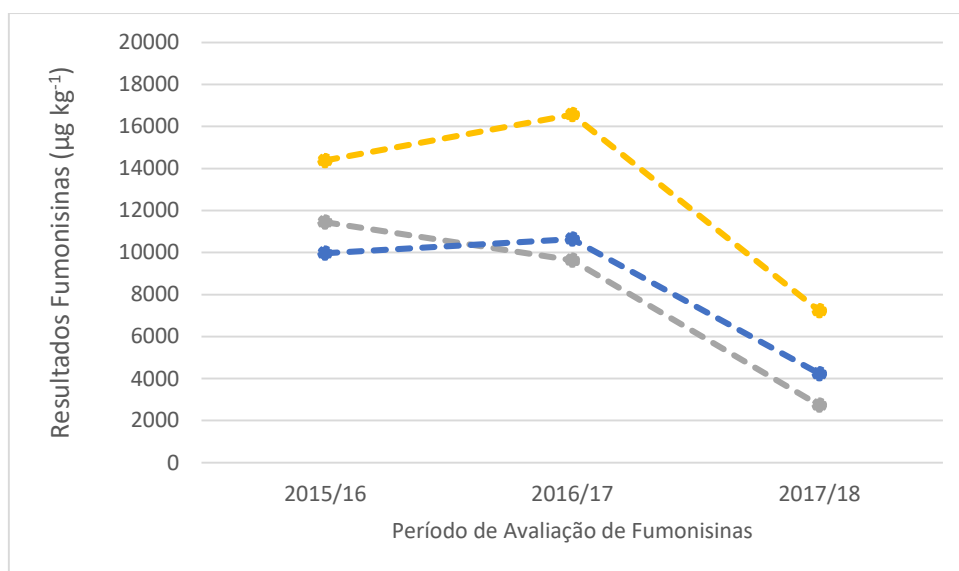


Figura 30. Resultados médios de FUMs ao longo do período de amostragem. Fonte: Autor

— PR;
— MT;
— MS.

A análise de correlação demonstra a um nível de confiança de 95% que para o estado do MS as variações de precipitação e temperatura não interferem significativamente nos resultados obtidos (correlação = 0,054 e 0,014), entretanto, a redução do índice de precipitação corresponde a diminuição de 5,57% no teor de FUMs obtidas para o estado do MT (correlação = -0,236). O maior impacto é possível ser observado no aumento de precipitação no estado do PR que responde por aumento no teor de FUMs de 40,07% (correlação = 0,633), sendo a redução na temperatura respondendo por 12,07% (correlação = -0,337).

Da mesma maneira, a frequência da presença de FUMs reduziu ao longo dos períodos de 95,76 %, 92,59 % e 62,88 % nos estados avaliados. Esta redução é menor

que a redução na concentração de ZEA no mesmo período, mas este dado demonstra que, apesar da redução ter ocorrido em menor taxa, se manteve em todos os períodos como pode ser observado na Tabela 6.

Em todos os estados avaliados no período amostrado, detectou-se a presença de FUMs em 11.779 das 14.009 amostras analisadas, que representa 84,08 %, sendo que 48,84 % das amostras apresentaram concentrações acima de 5.000,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valor máximo aceito pela legislação para a finalidade de produção de ração animal.

Este índice é muito alto principalmente se forem avaliados os dados individualmente por período, sendo observados índices médios de contaminação acima de 5.000,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de 84,33 %, 47,82 % e 14,38 % nos períodos. O estado que teve a maior contaminação acima de 5.000,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi o MT, com índices de 93,74 %, 87,89 % e 23,82 %, apresentando também as maiores concentrações médias nos períodos. A FUM é considerada uma micotoxina pós-colheita, mas a contaminação pode ocorrer ainda a campo desenvolvendo-se quando expostas as condições ambientes que a favoreçam. Os altos índices de contaminação e concentração da micotoxina estão diretamente ligados às condições do ambiente de desenvolvimento da planta e são justificadas pela CONAB [23] devido as grandes alterações no clima durante a produção da safra 2015/16.

O estado de MT teve neste período o menor índice de precipitação, 114,2 mm que é a menor em todo o período. O estado do MS teve precipitação similar a esta durante o terceiro período de monitoramento, mas não foi observado a mesma variação que ocorreu no estado do MT. Devido aos altos índices de contaminação, é importante ressaltar os efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos que esta micotoxina pode causar no organismo consumidor causados pela contaminação por FUMs.

Um estudo muito importante [67] foi realizado para monitorar qual a principal fase na qual ocorre a contaminação de amostras de milho por FUMs. Foram avaliadas três fases da cadeia produtiva do milho: campo, recepção e pré-secagem, de duas safras consecutivas, 2003 e 2004, no estado do PR. Foi detectada a contaminação por FUMs nas amostras de campo em níveis variando de 70,0 a 15.320,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em amostras de recepção os níveis tiveram variação entre 30,0 a 1.590,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e variação entre 20,0 a 1.878,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para as amostras da pré-secagem. Os níveis de menores concentrações são da safra de 2004.

No estudo de Oliveira et al. [60] foi realizada a avaliação de amostras do estado do PR (n=57) e detectaram a presença de FUMs em 100 % das amostras, com concentrações de até 66.274 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de milho. Já outro estudo [61] relata a presença de FUMs em 82,5 % das amostras de milho do Brasil, com níveis até 6.450,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para um outro estudo [68] houve a presença de contaminação em 77,3 % das amostras de milho, sendo que destas 88,3 % tiveram resultados positivos para as fumonisinas FUMB1 e FUMB2. Estes dados de contaminação não apresentam grande diferença entre os dados do presente estudo, entretanto, o último período de avaliação deste estudo teve diminuição de resultados e incidência da contaminação, não sendo possível obter mais dados para fazer comparações.

Silva e colaboradores [80] buscaram avaliar a ocorrência da contaminação por FUM B1 e FUM B2 e predominância do gênero de *Fusarium* em duas diferentes variedades de milho em duas regiões produtoras do grão no sul do Brasil. Foi possível observar que o *Fusarium verticillioides* foi o gênero de fungo predominante encontrado, sendo possível observar que existem diferenças na contaminação em relação a origem geográfica do milho produzido, mas não foi possível fazer diferenciação do índice de contaminação em relação as variedades do milho.

Conforme Figura 6, os períodos de maior precipitação média em todos os estados ocorrem entre os meses de outubro a março. Pode-se observar, conforme Figura 31, que neste período há diminuição dos resultados de FUMs, enquanto que há aumento nos resultados entre maio e setembro.

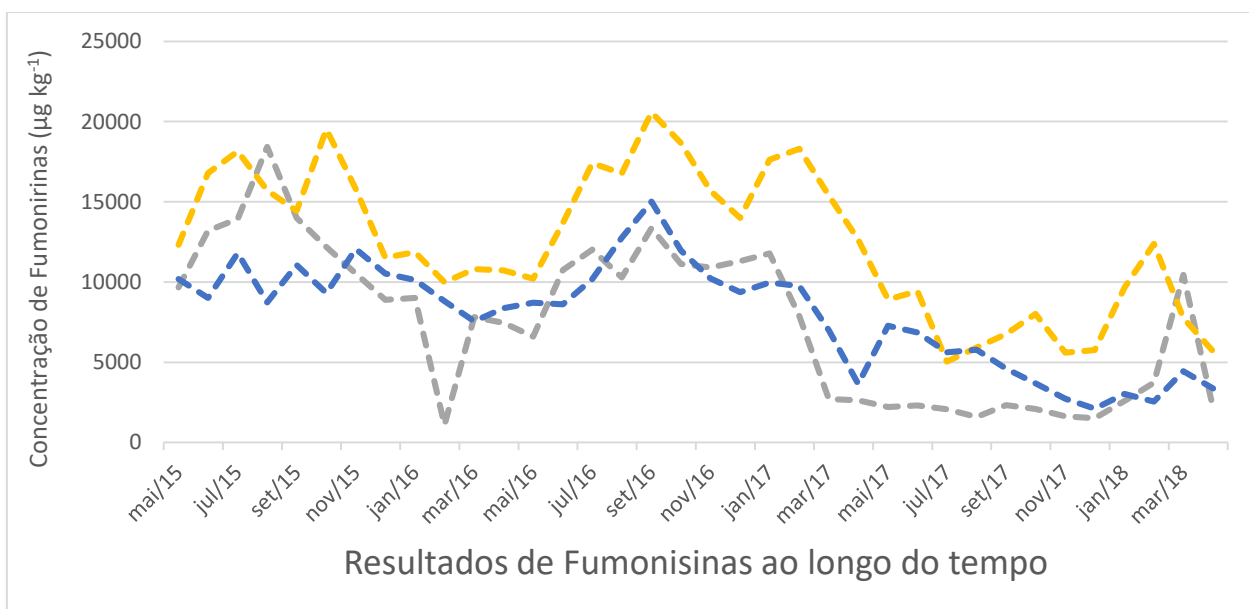


Figura 31. Resultados de FUMs ao longo do período de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

— PR;
— MT;
— MS.

Ocorreu a diminuição percentual de amostras contaminadas ao longo de todo o período e, assim, houve aumento das amostras que tiveram os resultados ALQ. No período, as amostras tiveram resultados ALQ consecutivamente de 4,24 %, 7,41 % e 37,12 % que representa aumento final de 32,88 % no número de amostras que tiveram a redução de índice de contaminação por FUMs. Estes dados são demonstrados entre as Figuras 32 e 40, sendo o percentual de AVM calculado apenas sobre a população de amostras contaminadas.

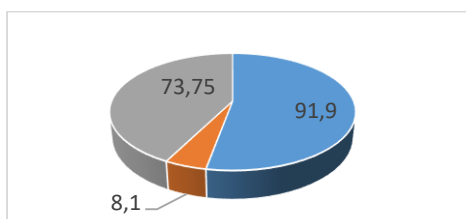


Figura 32: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 1º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

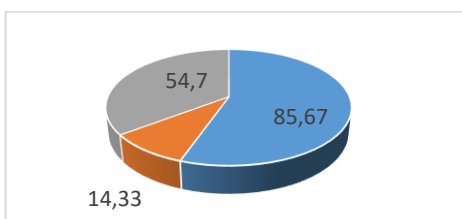


Figura 33: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

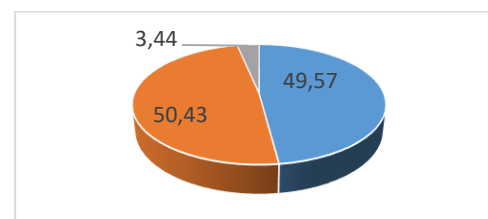


Figura 34: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 3º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

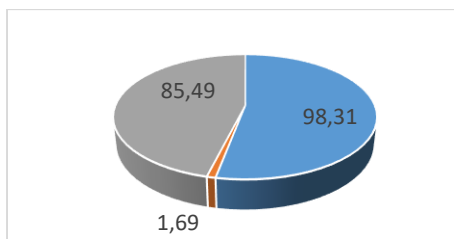


Figura 35: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 1º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

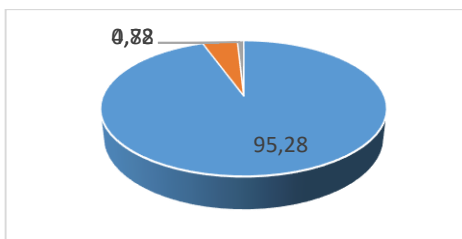


Figura 36: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

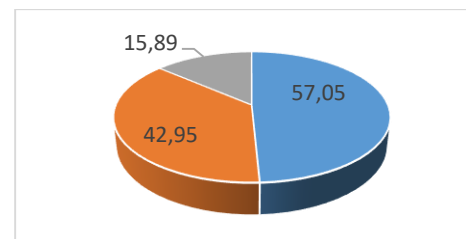


Figura 37: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 3º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

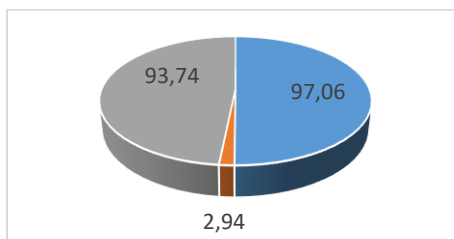


Figura 38: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado MT. Fonte: Autor

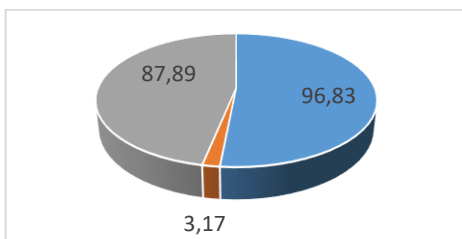


Figura 39: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 2º período, estado MT. Fonte: Autor

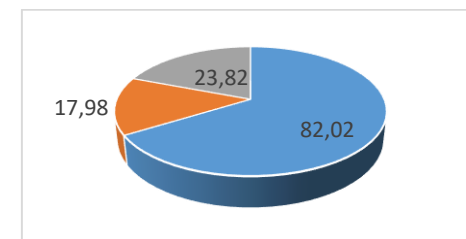


Figura 40: Percentual de contaminação de amostras com FUM no 3º período, estado MT. Fonte: Autor

— % AVM;
 — % ACO;
 — % ALQ.

— % AVM;
 — % ACO;
 — % ALQ.

— % AVM;
 — % ACO;
 — % ALQ.

Legenda:

%AVM: percentual acima do valor máximo permitido

%ACO: percentual amostras contaminadas

%ALQ: percentual abaixo do limite de quantificação

Os dados demonstram que está ocorrendo aumento percentual de amostras que apresentam redução na concentração de FUMs. Esta redução de 60,35 % na concentração é maior que a redução no índice de contaminação global de 34,34 %, e menor que a redução no percentual de amostras AVM, 82,95 %. Está ocorrendo a diminuição da contaminação de modo que há maior quantidade de amostras que apresenta ausência ou resultado ALQ de FUMs, enquanto que há aumento de amostras que apresentam AVM, demonstrando que há redução da contaminação e da concentração de FUMs.

Durante os primeiros períodos ocorreu grande variação entre os resultados, sendo os mesmos estabilizados apenas no terceiro período. Entretanto, quando avaliados os dados de precipitação e temperatura pode-se afirmar que ocorreram maiores índices de temperatura média e precipitação durante o primeiro período. As menores temperaturas médias ocorreram nos meses de julho de cada ano, visto que há o início da estação do inverno, mas ocorre também diminuição no índice de precipitação nesta época, sendo o período que apresenta maior índice de precipitação a época que compreende entre os meses de novembro a abril.

Quando os cereais são colhidos com alto teor de umidade, estes podem apresentar alto potencial de crescimento de fungos e desenvolvimento de micotoxinas durante o período de armazenagem. Entretanto algumas espécies de fungos como o *Aspergillus* se desenvolvem em locais nos quais a umidade pode estar abaixo de 18 % [69]. A contaminação dos grãos por fungos pode ocorrer, em geral, ainda no campo ou no armazenamento. A contaminação de campo requer um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa do ar de 90-100 % para crescerem [70], sendo os fungos do gênero *Fusarium* invasores nesta condição. A contaminação no armazenamento por fungos requerem menores teores de umidade e umidade relativa, com teores de atividade de água entre 0,7 e 0,9 e os fungos do gênero *Aspergillus* invasores nesta fase [71].

Uma das possíveis causas da diminuição dos níveis de FUMs apenas no último período pode estar relacionado ao processo de armazenamento e estocagem dos grãos. Observa-se que a partir dos meses de janeiro, quando se inicia o processo de colheita, há uma diminuição nos teores de FUMs encontrados nos grãos avaliados, enquanto que quando se encerra este período os resultados voltam a aumentar, podendo ser consequência da contaminação do grão direto do campo ou mesmo como contaminação cruzada nos silos de armazenamento, apresentando como efeito o desenvolvimento da micotoxina.

Em um estudo [72] foi avaliado o crescimento de fungos e desenvolvimento de micotoxinas em amostras de milho conservadas hermeticamente em condições de umidade constante. As amostras não foram esterilizadas e não houve a adição de inóculos e, mesmo assim, ocorreu o desenvolvimento de micotoxinas. Observou-se relação positiva entre o crescimento fúngico e teor de umidade nas amostras, sendo visível o desenvolvimento de mofo nas amostras de milho armazenadas em condições superiores de 20 % de umidade. Entretanto, foi possível observar relativo crescimento em condições menores de umidade (16, 18 e 20 %). O desenvolvimento de micotoxinas como a AFL foi detectado nas amostras nas quais o milho esteve exposto às maiores condições de umidade, mas ausente nas amostras controle e no milho com 14 % de teor de umidade.

Marques e colaboradores [62] realizaram estudo no PR para avaliar o índice de contaminação por micotoxinas em grãos híbridos comerciais de milho em função da umidade nos grãos durante o período de colheita. Foi observado que diferentes gêneros de fungos se comportam de maneiras diferentes em função dos teores de umidade nos grãos de milho. Ocorreu menor contaminação das amostras por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em função do aumento de teor de umidade na colheita, enquanto aumentou a incidência de contaminação por fungos do gênero *Fusarium*. Estes dados são divergentes com outro estudo [73].

Entre a safra 1995/96 um estudo [39] realizou a avaliação de contaminação por FUMs de 150 amostras no estado do PR relacionado aos dados de umidade, temperatura e precipitação média mensal. Neste estudo, o estado foi dividido em três regiões, central, sul e norte, sendo encontradas diferenças significativas entre o índice de contaminação por FUMs em milho, sendo diretamente relacionadas as mudanças de precipitação, temperatura e umidade média mensal. Chuvas intensas (243 mm) resultaram em teores

de umidade de 14 a 28% no milho recém colhido, sendo indicativo de que a umidade relativa do ar ser é fator de estímulo ao crescimento de fungos e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de micotoxinas. Foram encontradas a presença de FUMs em 72% das amostras das regiões central e sul, enquanto na região norte foi detectado em 92% das amostras. No presente estudo, os índices de precipitação foram inferiores ao estudo na literatura [39], bem como, os dados de contaminação por FUMs também foram menores conforme os dados já apresentados nas Tabelas 4 e 5. Os estudos têm apresentado grande relação entre a incidência de chuvas e teor de umidade com a concentração de micotoxinas como a FUMs.

7.4 Aflatoxinas

Estatisticamente os dados demonstram, a partir da análise de variância (ANOVA), que não existem diferenças significativas entre os estados amostrados durante o período de avaliação ($p < 0,05$) sendo PR e MT ($F = 0,10$), MT e MS ($F = 0,08$) e entre PR e MS ($F = 1,33$). Como demonstrado na Tabela 7, pode ser observado que os resultados de AFLs seguem a mesma tendência que os resultados da micotoxina FUMs, e diferentes de ZEA. Ocorreu no segundo período de avaliação aumento na concentração de AFLs, enquanto ocorreu ao longo dos três períodos a tendência de diminuição de resultados médios de ZEA com o tempo em todos os estados.

Tabela 7: Resultados de AFLs entre maio de 2015 e abril de 2018. Fonte: Autor.

	2015/2016		2016/2017		2017/2018	
	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm S	Valor Máximo Encontrado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
PR	31,7 \pm 42,0	351,0	34,9 \pm 48,5	33,4	20,5 \pm 20,4	100,0
MS	18,9 \pm 28,1	282,4	26,7 \pm 29,6	175,0	16,7 \pm 18,7	88,0
MT	16,1 \pm 20,5	98,2	42,9 \pm 52,3	824,9	9,1 \pm 4,1	20,20

Resultado \pm desvio padrão.

De acordo com os resultados das análises, o estado do PR apresentou a maior concentração média de AFLs em todo o período, $29,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, entretanto, a maior concentração média foi durante o período 2016/17 no estado de MT de $42,9 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Dentro do mesmo estado é possível observar que há variação entre os períodos em relação ao resultado médio, conforme pode ser verificado entre as Figuras 41 e 44.

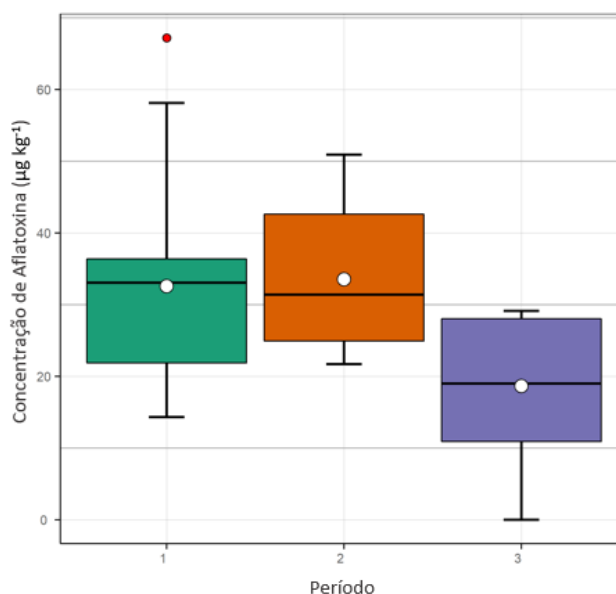


Figura 41. Comparação dos resultados médios anuais de AFL no estado do PR ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

Estatisticamente não há diferença significativa entre os resultados médios dos três períodos avaliados para o estado do PR, mesmo com redução da concentração média ao longo dos períodos.

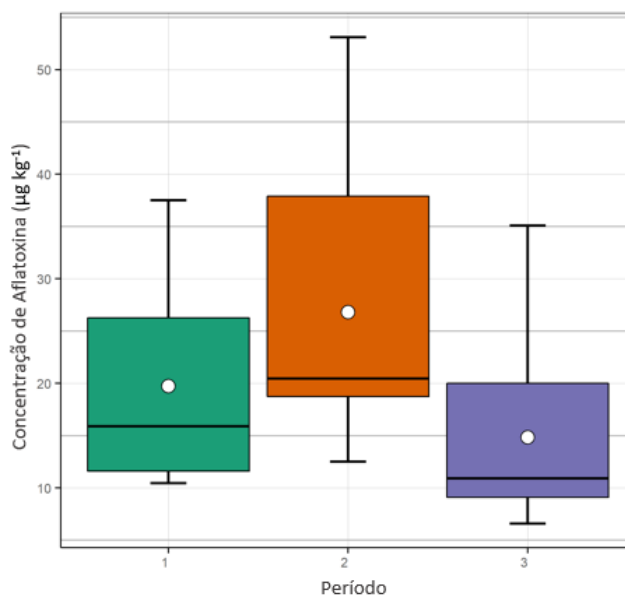


Figura 42. Comparação dos resultados médios anuais de AFL no estado do MS ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

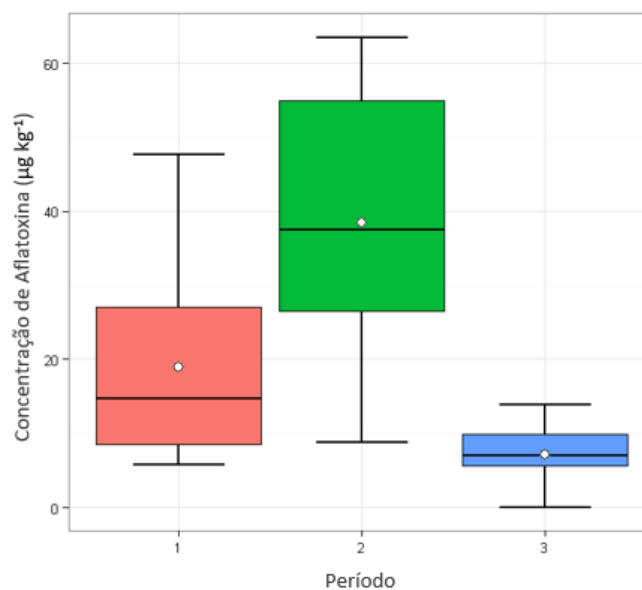


Figura 43. Comparação dos resultados médios anuais de AFL no estado do MT ao longo dos períodos de avaliação do estudo. Fonte: Autor.

Assim como para o estado do MS e MT é possível observar que ocorreu aumento na concentração média durante o segundo período, sendo reduzido durante o terceiro período. Nos dois estados, entretanto, todos os períodos são estatisticamente semelhantes.

A concentração média de AFLs reduziu 30,63 % entre o início e o final do monitoramento, entretanto, ocorreu aumento na concentração entre o primeiro e o segundo período de 56,76 % com similar redução de 55,74 % na concentração do último período. A incidência de AFLs apresentou redução de 8,02 % ao longo de todo o período, e aumento na incidência para 40,00 % no segundo período, sendo o aumento influenciado pelo estado do MT que teve incidência média no período de 43,53 %, conforme observado na Figura 44.

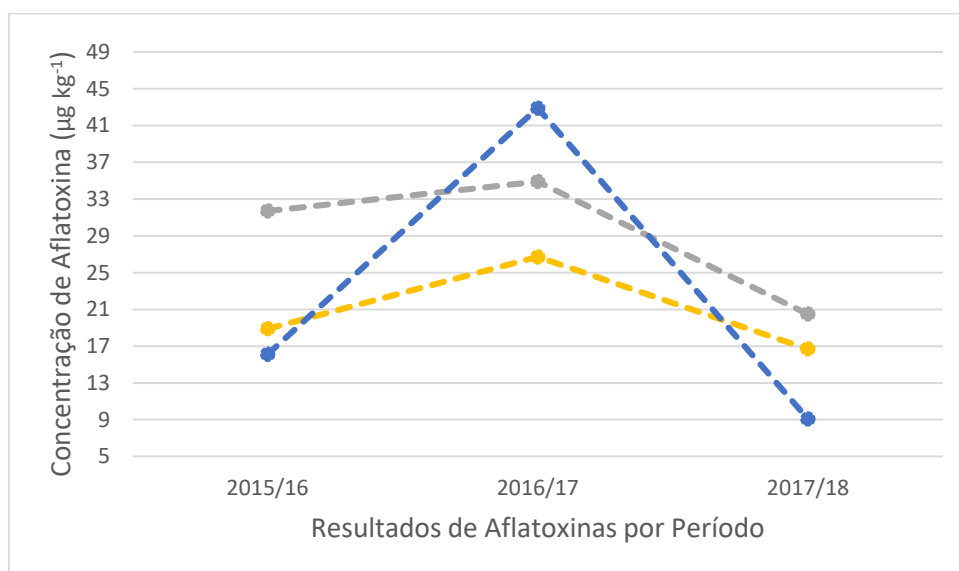


Figura 44. Resultados médios anuais de AFLs ao longo do período de amostragem. Fonte: Autor.

— PR;
— MT;
— MS.

O estado do MT apresentou aumento bastante significativo na concentração durante o segundo período em relação aos demais estados, e um fator importante observado é que durante o primeiro e o último período tiveram as menores concentrações médias de AFLs. O aumento na incidência de AFLs no estado do MT é mais que 2 vezes em relação aos estados de MS e PR, e 3 vezes maior que a incidência no primeiro período no estado do MT. Coincidentemente, os dados de concentração de FUMs no segundo período foram maiores nos estado de MT e MS, sendo o PR único que teve redução gradual em todos os períodos. Entretanto, os dados de temperatura não demonstram que

houve maior variação de temperatura para o estado do MT neste período, mas houve ao longo do segundo e terceiro período a maior variação nos índices de precipitação, conforme Tabela 8;

Tabela 8. Dados de desvios padrões de temperatura e precipitação. Fonte: Autor.

	2015/2016		2016/2017		2017/2018	
	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)
PR	101,0	2,4	55,5	3,6	90,4	2,5
MS	74,8	2,2	97,7	1,9	102,4	1,1
MT	97,9	1,4	127,2	1,2	129,8	1,5

Marques e colaboradores [62] afirmam que os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* se comportam de maneira diferenciada, em função dos teores de umidade presente no grão, sendo que a produção de AFLs pode ocorrer nos grãos de milho presos ainda às espigas. Os fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de desenvolverem-se em ambientes de menor umidade relativa, por isso as AFLs são geralmente consideradas toxinas de pós-colheita e armazenamento, já os fungos do gênero *Fusarium* desenvolvem-se em condições de maior umidade relativa.

Os resultados mostram que o acúmulo de AFLs estava relacionada ao crescimento de fungos e ao tempo de armazenamento. Os maiores níveis de AFLs $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $<150 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram detectados nas amostras de milho armazenados com teor de umidade entre 18 e 20%, durante período de armazenamento de 60 dias, enquanto que amostras nas mesmas condições de teor de umidade 20%, avaliadas após 30 dias de armazenamento, tiveram níveis de concentração de AFLs de $81 \mu\text{g kg}^{-1}$ [62].

Ao observar os dados de precipitação ao longo dos períodos, e sua distribuição nos principais estados produtores de milho, nota-se que o mês de fevereiro é o que apresenta o maior índice de precipitação coincidindo em algumas regiões com a época de colheita do milho, enquanto que o mês de agosto é o que tem o menor índice de precipitação, mas não é época de colheita do grão. O estado do PR é o que apresenta as menores variações de precipitação ao longo do tempo, conforme pode ser verificado nas Figuras de 45 a 50.

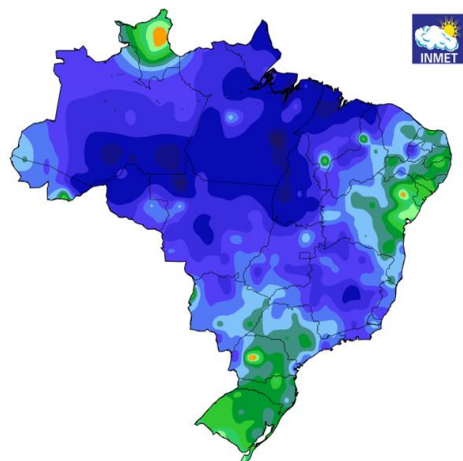


Figura 45. Precipitação acumulada em Fev/2016.

Fonte: INMET

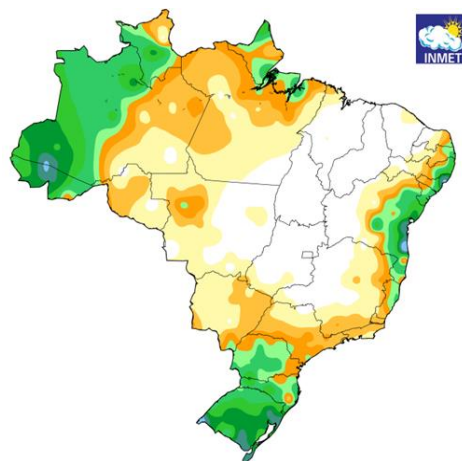


Figura 46. Precipitação acumulada em Ago/2016.

Fonte: INMET

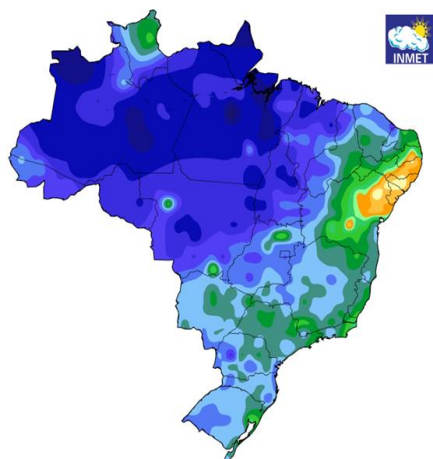


Figura 47. Precipitação acumulada em Ago/2017.

Fonte: INMET

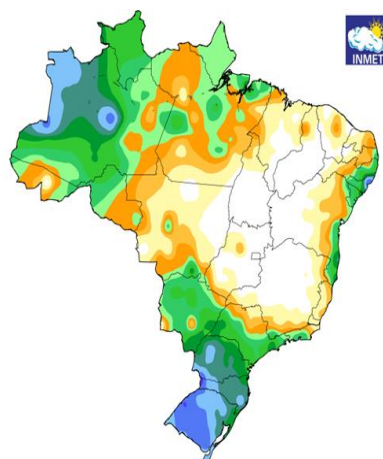


Figura 48. Precipitação acumulada em Fev/2017.

Fonte: INMET

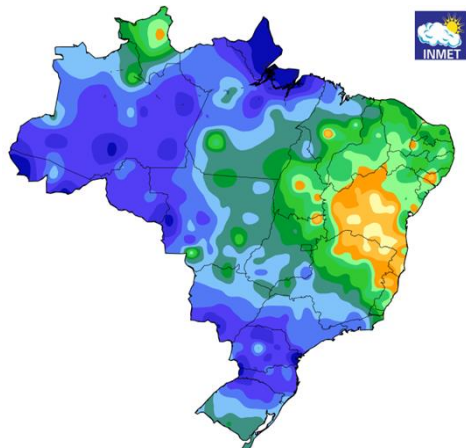


Figura 49. Precipitação acumulada em Ago/2018.
Fonte: INMET

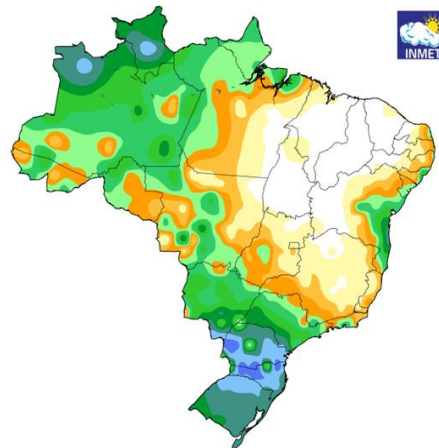
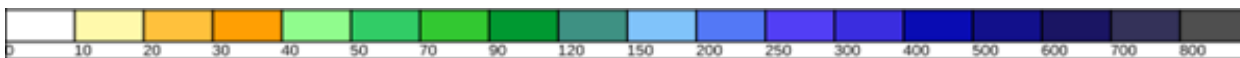


Figura 50. Precipitação acumulada em Fev/2018.
Fonte: INMET



Os dados analisados de AFLs demonstram que ocorreu aumento médio na contaminação durante o segundo período em cerca de 10,97 % com aumento de 56,76 % na concentração de AFLs e aumento de 225,21 % na quantidade de amostras AVM de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. O aumento significativo no segundo período ocorre em função da alta incidência de amostras AVM no estado do MT, 15,70 %. É observado que 16,67 % das amostras analisadas apresentaram contaminação por AFLs ao longo de todo o período enquanto 83,33 % das amostras apresentaram resultados ALQ. Cerca de 3,50 % das amostras apresentaram resultados AVM, e 77,78 % das amostras apresentaram incidência média abaixo deste valor, sendo o resultado final influenciado diretamente pelos resultados de MT no segundo período.

Os estados de PR e MS tiveram também aumento na incidência de amostras AVM no segundo período, entretanto menos expressivos conforme pode ser observado entre as Figuras 51 e 59. Os dados de AVM são calculados baseados no número de amostras contaminadas, sendo as amostras não apresentaram contaminação, ou abaixo do LQ do método não foram consideradas.

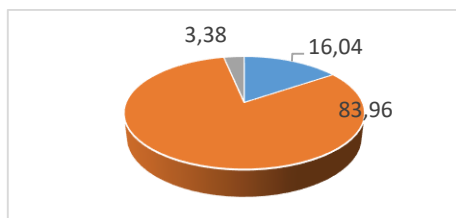


Figura 51. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 1º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

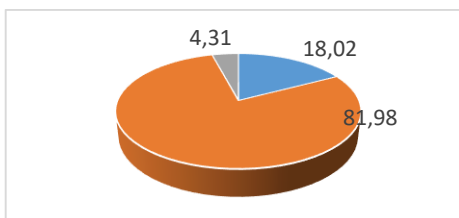


Figura 52. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

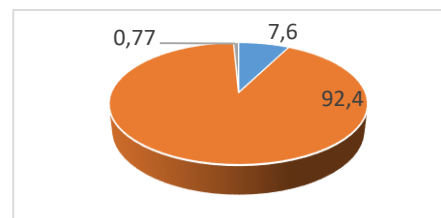


Figura 53. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 3º período, estado PR. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

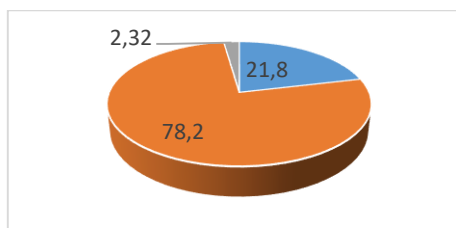


Figura 54. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 1º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;

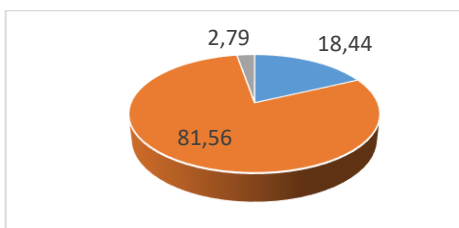


Figura 55. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;

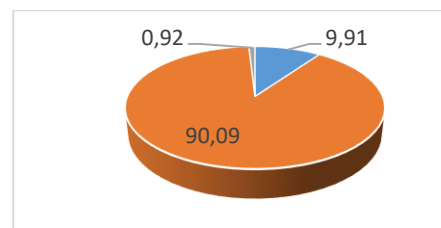


Figura 56. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 3º período, estado MS. Fonte: Autor

— % AVM;

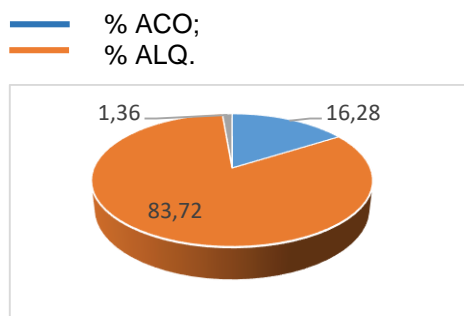


Figura 57. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado MT. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

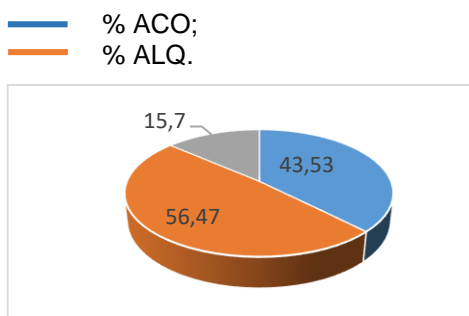


Figura 58. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 2º período, estado MT. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

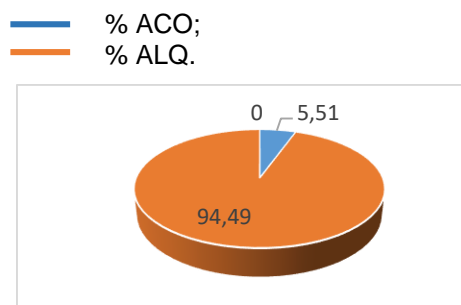


Figura 59. Percentual de contaminação de amostras com AFL no 3º período, estado MT. Fonte: Autor

— % AVM;
— % ACO;
— % ALQ.

Legenda:

%AVM: percentual acima do valor máximo permitido

%ACO: percentual amostras contaminadas

%ALQ: percentual abaixo do limite de quantificação

O período de maior aumento na concentração de AFLs em milho no estado do MT foi entre agosto de 2016 e março de 2017. Neste período foram analisadas 731 amostras não sendo detectada a contaminação ou abaixo do limite de quantificação. A contaminação nos estados de PR e MS durante todo o período não apresentou muita variação em função do tempo, precipitação e temperatura, conforme Figura 60.

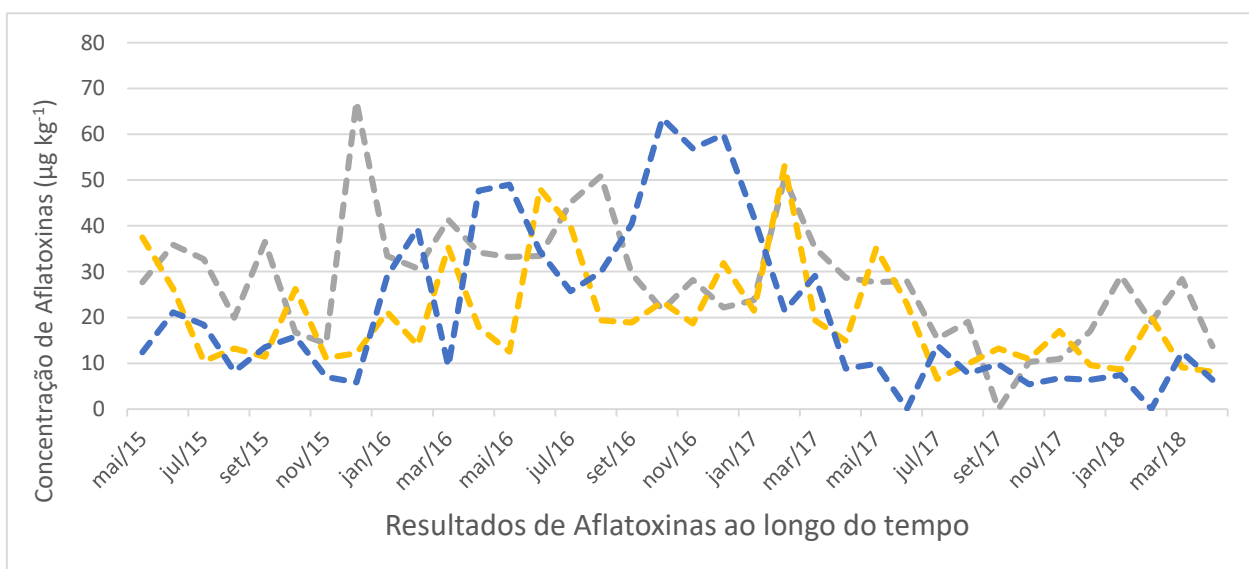


Figura 60. Resultados de AFLs ao longo do período de avaliação do estudo. Fonte: Autor

— PR;
— MT;

— MS.

Os dados de temperatura não demonstram que houve maior variação no estado do MT no segundo período, mas ao longo do terceiro período ocorreram os maiores desvios nos índices de precipitação. O período que ocorreram as maiores concentrações foi entre maio de 2016 até maio de 2017 conforme pode ser verificado na Figura 61.

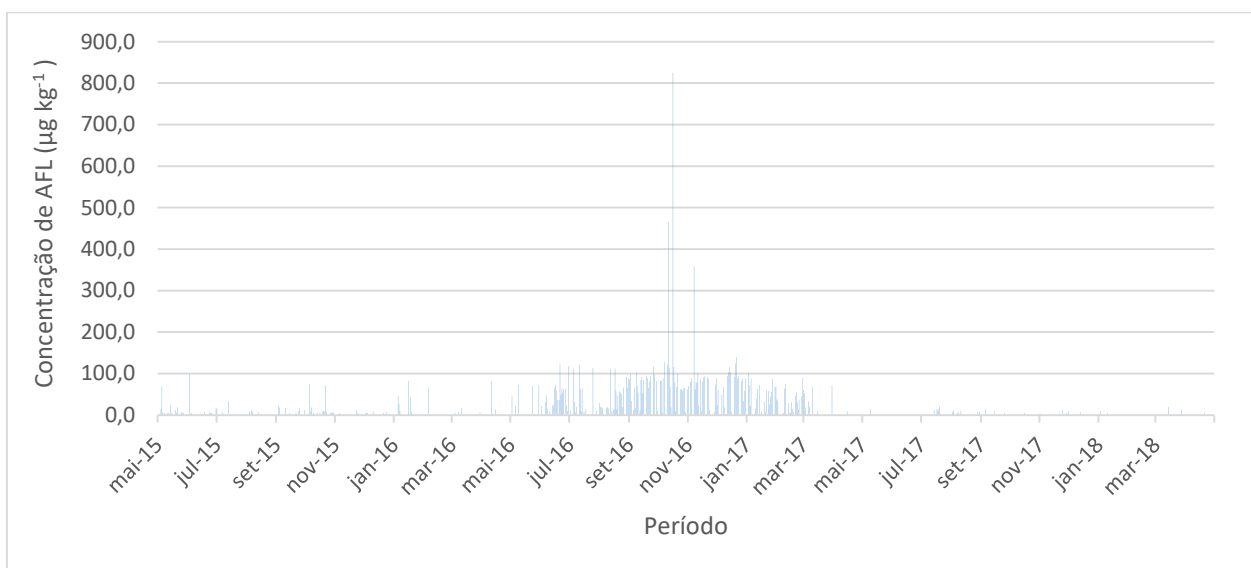


Figura 61. Dados da concentração de AFLs no Estado de MT

De modo geral, ocorreram 3 grandes desvios de resultados neste período, 465,9 e 824,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em outubro de 2016 e 358,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em novembro de 2016. Estes dados estão muito acima da média do período, de 42,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Se estes dados fossem desconsiderados, a concentração média no período cairia para 40,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que representa uma redução de 6,76%. Esta redução pode parecer pouco significativa, mas se for levado em consideração que 26,66% das amostras analisadas no período tem resultado ALQ, isso demonstra que há um impacto significativo no resultado. Entretanto, observa-se que existe uma relação entre os altos resultados de AFLs e FUMs no segundo período de avaliação, especialmente para o estado do MT.

A análise de correlação demonstra a um nível de confiança de 95% que o aumento na precipitação impactam diretamente no aumento do teor de AFL de 22,75%, 3,20% e 1,32% respectivamente para os estados de PR, MS e MT (correlação = 0,477, 0,115 e

0,179). A variação na temperatura, entretanto, não interfere significativamente nos resultados obtidos.

Segundo dados da CONAB [58], o MT foi o maior produtor de milho no Brasil na safra 2017/18. O Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária (IMEA) [74] relata a falta de espaço para guardar o milho produzido. Uma alternativa, normalmente adotada pelos agricultores, é usar o silo bolsa, uma espécie de bolsão gigante. A bolsa tem capacidade para três mil sacas e custa, em média, R\$ 1,8 mil. A lona, feita de polietileno, garante as características do produto estocado por até 18 meses, no entanto, o silo bolsa só pode ser usado uma única vez, já que é rasgado na hora da retirada dos grãos ou por ação física externa.

Em um estudo [75] foi realizada a avaliação da efetividade de armazenamento em silos bolsas quanto a garantia da qualidade dos grãos estocados. Foram avaliados grãos com teores de umidade de 14,5 e 18,0 % nas condições de temperaturas de 25, 30 e 35°C. Foram realizadas análises de umidade após 30, 60, 90, 135 e 180 dias. Verificou-se que não houve variação do teor de umidade dos grãos de milho armazenados nos silos bolsa.

Outro estudo [76] avaliou a presença de contaminação de fungos de presentes em amostras de grãos nas safras 2009/2010, e determinaram a predominância de fungos dos gêneros *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* nos grãos de milho armazenados após a secagem dos grãos, com umidade controlada de 13%, sugerindo que a contaminação ocorreu durante o cultivo no campo e seu desenvolvimento avançou na fase de armazenamento.

O fator de estocagem pode ser um dos principais elementos dos elevados índices de concentração de AFLs no segundo período de avaliação. Segundo dados [77], insetos-praga, fungos e micotoxinas, somados a ataques de roedores, são problemas que têm imposto perdas consideráveis em torno de 15 % e podem estar relacionadas ao armazenamento inadequado dos grãos. A Embrapa [77] afirma que, além das perdas quantitativas, o mau armazenamento também pode provocar perdas qualitativas, as quais podem afetar a segurança alimentar dos humanos e dos animais. Para ter-se boas condições de armazenamento que garantam a qualidade dos grãos, a recomendação é o armazenamento nas seguintes condições:

- Os grãos devem conter teor de umidade de até 13%;
- Classificação e armazenamento dos grãos sadios antes do armazenamento;

- Realizar a limpeza dos grãos antes do armazenamento, no caso da produção a granel;
- Evitar a mistura de grãos recém-colhidos com grãos de safras anteriores;
- Assegurar que piso, telhado e paredes estejam em condições de impermeabilização;
- Realizar periodicamente o tratamento da estrutura com inseticidas protetores.

Dalpasquale [78] afirma que o processo de limpeza e secagem dos grãos antes do armazenamento é uma prática agrícola fundamental para assegurar a qualidade dos grãos durante o armazenamento. Neste estudo não foram avaliadas as condições de umidade dos grãos analisados para a determinação das micotoxinas, entretanto, a disponibilidade de umidade é um dos fatores fundamentais para o desenvolvimento de fungos e a produção das micotoxinas, mas em diferentes condições de umidade há o desenvolvimento de diferentes fungos produtores de diferentes micotoxinas [60, 70]. O teor de umidade é importante ser avaliado, mas altas condições de umidade, temperatura e precipitação não irão definir o desenvolvimento de fungos causadores de micotoxinas, é necessário a disponibilidade de esporos destes fungos e o ataque aos grãos.

Os fatores de precipitação média e armazenamento podem ser os principais elementos que exercem a maior influência no resultado de contaminação de AFLs, enquanto a temperatura média parece exercer impacto com menor significância. Contudo, medidas preventivas devem ser tomadas em todas as etapas de produção, armazenamento e proteção das influências climáticas para minimizar os efeitos causadores do desenvolvimento de micotoxinas para que se tenham produtos seguros e de qualidade.

8.0 Conclusões

O monitoramento da qualidade dos grãos de milho analisados possibilitou mostrar que há alta incidência de contaminação das amostras analisadas. O PR é o estado que possui a maior incidência da contaminação por ZEA, enquanto o estado de MS possui a maior contaminação por FUMs e a maior contaminação por AFLs é no estado do MT. Os dados demonstram que ao longo do período de avaliação houve redução significativa na concentração e contaminação das amostras com todas as micotoxinas avaliadas.

Estatisticamente não existem diferenças significativas entre os resultados de AFLs e FUMs entre todos os estados durante os períodos de avaliação, entretanto, é possível observar que há diferença significativa entre o estado do MT para os demais em relação à contaminação por ZEA. A concentração e contaminação por ZEA no estado do MT é a menor, mas esta característica é esperada devido as propriedades da própria micotoxina de desenvolvimento em condições de temperaturas mais baixas.

As reduções nas concentrações médias de todas as micotoxinas analisadas ao longo do tempo demonstram que há um aumento significativo na probabilidade de ocorrer a contaminação do milho em condições nas quais ocorra maior incidência de precipitação, e conseqüentemente, aumento na umidade relativa do ar. A temperatura tem um efeito maior probabilidade de favorecer o desenvolvimento da produção de ZEA, entretanto, para as micotoxinas AFLs e FUMs o impacto tem menor significância que a precipitação e umidade relativa. O armazenamento é outro fator importante que é preciso ser considerado, entretanto, neste presente estudo não foi possível mensurar o impacto deste fator no resultado da contaminação das amostras.

Os resultados deste estudo permitem concluir que os fatores precipitação, umidade e temperatura exercem influência em diferentes proporções sobre a incidência, níveis de contaminação e concentração de AFLs, FUMs e ZEA em milho produzido nos estados de PR, MS e MT. Isto reflete a necessidade de estar atento às mudanças climáticas em curso, principalmente os eventos extremos já observados em várias regiões brasileiras.

Contudo, é necessário conhecer estes aspectos para que se faça um controle e planejamento da produção e armazenamento a fim de minimizar os impactos na qualidade causados pelas micotoxinas.

9.0 Referências Bibliográficas

- [1] CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. V. 5 - SAFRA 2017/18- N. 7 - Sétimo levantamento, Abril 2018
- [2] SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ, D. E. The Mycotoxin Blue Book. Nottingham: Nottingham University Press, 2005; p. 225-234.
- [3] TANAKA M.A.S.; MAEDA J.A.; PLAZAS I.H.A.Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. *Scientia Agrícola*, v. 58, n. 3, 2001; 501–508.
- [4] WU, F. et al. Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize. *World Mycotoxin Journal*, v. 4, n. 1, 2011; p. 79–93.
- [5] MALLMANN, C.A.; DILKIN P.; GIACOMINI L. Z.; RAUBER R. H.; PEREIRA C.E. Micotoxinas e Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura. 2007; p. 191 – 204.
- [6] JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed – Porto Alegre: Artmed, 2015. p.633-640..
- [7] FAO. *Micotoxinas em Grãos*. Centro Técnico para Cooperação Agrícola e Rural ACP-EU. Folheto Técnico Nº 3. Países Baixos. Junho 1997.
- [8] ZUMMO, N. & SCOTT, G.E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. *Plant Disease*, 76, 1992; 771-773,
- [9] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, 1988; página 21.968.
- [10] IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas Em Alimentos. In: Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. Anais, 2013; v. 7, n. 0, p. 138–161.
- [11] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Análise de resíduos e contaminantes em alimentos/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 2011; 32p.
- [12] MOREIRA, I.; ROSTAGNO, H.S.; TAFURI, M.L. et al. Uso de milho processado a calor na alimentação de leitões. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, v.23, 1994; p.412-421.
- [13] FREITAS, E. S.; SAKAMURA, N. K., NEME, R.; BARBOSA, N.A.A. Valor nutricional do milho processado, usado na ração pré-inicial para frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, 2005; p.510-517.
- [14] VALMORBIDA, R. *Fungos e Micotoxinas em Grãos de Milho (Zea mays L.) e seus Derivados Produzidos no Estado de Rondônia, Região Norte do Brasil* (dissertação). Florianópolis, SC. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos; 2016.
- [15] FERNANDES, R.R.G. *Micotoxinas: a situação atual da legislação e metodologias analíticas* (tese). Aveiro, Portugal: Universidade de Aveiro; 2007.
- [16] SCUSSEL, V.M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (ed). *Armazenagem de grãos*. Campinas: IBG, 2002; p.675-804.
- [17] RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARINI, L. J.; ELIAS, M.C. Hermetic and conventional storage systems in oat grains conservation. *Cienc. Rural*, v. 34, n. 6: Santa Maria, Nov/Dez. 2004

- [18] BEBER-RODRIGUES, M. SCUSSEL, V. M. Mycoflora and Mycotoxicological Quality of Four Freshly Harvested Paddy Rice Cultivars and Relation with Harvest to Industry Reception Timing. *Rice Science*, 2013, 20(4): 303-308. DOI: 10.1016/S1672-6308(13)60151-1.
- [19] BANKOLE, S; SCHOLLENBERG, M, DROCHNER, W. Mycotoxins in food systems; in sub saharan Africa: A review. *Mycotoxin Research*, 22(3), 2006; 163 e 169. http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user_upload/Mtahghighat/tfood/ARTICLES/chemical_safety/Mycotoxins_in_food_systems_in_Sub_Saharan_Africa_A_review.pdf
- [20] P. W; AKELLO; BANDYOPADHYAY. Aspergillus section Flavi community structure in Zambia influences aflatoxin contamination of maize and groundnut. *International Journal of Food Microbiology* Volume 261, 2017, p. 49-56
- [21] LOPES, L. S. Avaliação Quantitativa de riscos de Fumonisina em Milho Produzido em Diferentes Regiões do Brasil: Influência das Condições Climáticas. (Dissertação). UNICAMP. Campinas, SP: [s.n.], 2019.
- [22] KAWASHIMA, L.M. Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil (Dissertação). UNICAMP, Campinas, SP: [s.n.], 2004.
- [23] CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. 2016, 106 - 116.
- [24] COLE, R.J. & COX, R.M. In: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York: Academic Press, 1981; 937p.
- [25] IARC. INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs*, 56, 1997; 245-395.
- [26] BUTLER, W.H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) *Mycotoxins*. Elsevier, 1-28, 1974
- [27] CULLEN, J.M. & NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (eds.) *The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press Inc., 1994; 3-26.
- [28] CALDAS, E. D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista de Saúde Pública*, 36(3), 2002; 319-323.
- [29] FREIRE, F.C.O. VIEIRA, Í.G.P. GUEDES, MARIA I.F. MENDES, F.N.P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Documento 110. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2007.
- [30] HORN, M.B. Micotoxinas em silagem de milho do sul do Brasil e metodologia analítica para aflatoxinas por espectrofotometria de infravermelho próximo em milho. (Dissertação). Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.
- [31] HENNIGEN, M.R. & DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in corn in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 12, 1995; 677-681.

- [32] MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L.M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 2001; 1001-1007.
- [33] DI CASTRO, I; OLIVEIRA, H.F.; MELLO, H.C.; MASCARENHAS, A. G. Micotoxinas na Produção de Suínos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. Ed 110. 2015; p 6-13.
- [34] CORRÊA, T.B.S.; RODRIGUES, H.R.; VARGAS, E. A.; ASSAD, E.D.; PRADO, G.; COSTA, P.P. Evaluation of the incidence of mycotoxins in Brazilian maize. In: *Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin*; São Paulo. 2000; p.134.
- [35] AMORIM, S.S.; SILVA, C.M.G.; PIRES, R.A.; SANTOS, E.A.; CASTRO, L.; SÁ, T.A. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: *Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin*. São Paulo, 2000; p. 141.
- [36] FERNÁNDEZ-IBAÑEZ, V. SOLDADO, A. MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, B. ROZA-DELGADO, de La. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. Department of Animal Nutrition, Grassland and Forages, Regional Institute for Research and Agro-Food Development (SERIDA). *Food Chemistry*, Ed. 113. Spain, 2009; p 629-634.
- [37] GELDERBLOM, W.C.; MARASAS, W.F.; LEBEPE-MAZUR, S.; SWANEVELDER, S.; VESSEY, C.J.; HALL, P.L. Interaction of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in a 37 short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology*. 171(2-3), 2002; 161-173.
- [38] HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M., GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2 (3), 1990; 217-221.
- [39] ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMOCHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural microflora and fumonisins in freshly harvested corn of the state of Parana, Brazil. *Mycopathol*. 147: 1999; 139-148.
- [40] KELLER, K.M; QUEIROZ, B. D.; KELLER, L. A. M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The Mycobiota and toxicity of equine feeds. *Veterinary Research Communications*, v. 31, n. 8, 2007; p. 1037-1045.
- [41] HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants*, 13, 1996; 173-183.
- [42] MACHINSKI JR., M. & VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. *Food Additives and Contaminants*, 17, 2000; 875-879.
- [43] ZINEDINE, A. SORIANO, J.M. MONTÓ, J. MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 45, 2007; p.1-18.

- [44] KLOSS, A.B. Revisão Bibliográfica sobre micotoxinas em rações. UFPR, Curitiba, 2010.
- [45] BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, v. 16, n. 3, 2003; p. 497-516.
- [46] KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7(3), 1987; 253-306.
- [47] SANTOS, W.C. Síntese e Avaliação Farmacológica das Lactonas de 14-Membros Planejados a Partir dos Lipídios Fenólicos Não-Isopropenóides de *Anacardium Occidentale*. (Dissertação). Brasília, Universidade de Brasília, 2008.
- [48] MARQUES, M.F.C. Métodos de Determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona por HPLC com Purificação por Colunas de Imunoafinidade (Dissertação). Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2007.
- [49] FURLONG, E.B. Técnicas cromatográficas acessíveis para determinação de contaminantes fúngicos. *Scientia Chromatographica*. Ed 7, N 4. 2015; p 261-273.
- [50] CIGIC IK, PROSEN H. An overview of conventional and emerging analytical methods for determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2009; 62-115.
- [51] COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 5ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1993.
- [52] NEOGEN. Veratox for Mycotoxins. <foodsafety.neogen.com/en/veratox#mycotoxins>. Acesso 09/06/2018
- [53] RODRÍGUEZ-AMARAL, D. B; SABINO, M.; Mycotoxin Research in Brazil: The Last Decade in Review. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. 2 Seção de Química Biológica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil *Brazilian Journal of Microbiology* (2002) 33:1-11 ISSN 1517-8382
- [54] VAREJÃO-SILVA, M.A. Meteorologia geral I. Campina Grande: Editora Universitária, 2005; p. 1-449.
- [55] ALVARENGA, L. A. Precipitação no sudeste brasileiro e sua relação com a Zona de Convergência do Atlântico Sul. *Revista Agrogeoambiental*, v.4 n.2, agosto, 2012.
- [56] INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. 2019.
- [57] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio. Brasília, 2017.
- [58] CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. V. 5 - SAFRA 2017/18- N. 7 - Sétimo levantamento, Abril 2018.
- [59] BORUTOVA, R. Pesquisa de Micotoxinas no Milho – Nutriad Adisseo Brasil, 2018. Engormix, 2018.
- [60] OLIVEIRA, M. S; ROCHA, A; SOLYOK, M; KRŠKA, R; MALLMANN, C. A; Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.033> *Food Control* 73 (2017) 127e132

- [61] QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. O.; CONCEIÇÃO, R. R. P; GUIMARÃES, L. M; MENDES, S. M; RIBEIRO, P. E. A; COSTA, R. V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.039> / Food Control 28 (2012) 83;86
- [62] MARQUES, O. J; et al. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. Acta Sci., Agron. (Online), Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, Dec. 2009. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212009000400018&lng=en&nrm=iso>. Access on 24 Nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v31i4.5690>.
- [63] CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. Rev. Saúde Pública. v.36, n.3, 2002; p.319-323.
- [64] PEZZINI, V. et al. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. Rev Inst Adolfo Lutz, 64(1):91-6, 2005.
- [65] REGES, J.T.A. JESUS, M.N. SILVA, S.D.R. SOUZA, M.H. SANTOS, I.J. SANTOS, S.M. RODRIGUES, J.W. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn grains in Jataí – GO, Brazil. DOI: <http://dx.doi.org/10.23850/24220582.342> Rev. Colomb Investig Agroindustriales 2016 p- 34-39.
- [66] KLOSS, A.B. Revisão Bibliográfica sobre micotoxinas em rações. UFPR, Curitiba, 2010.
- [67] HIROOKA, E.Y.*; ONO, E.Y.S.; BERND, L.P.; ZUCARELI, C.; GERAGE, A.C.; NDRADE, D.S.; HOMECHIN, M. (in memorian); TAKAHASHI, H.W.; GARCIA, G.T.; ITANO, E.N.; SUGIURA, Y.; KAWAMURA, O. Micotoxinas na cadeia produtiva de milho. Associação Brasileira de Milho e Sorgo – ABMS, Set, 2010.
- [68] DE CEZARO, L. A. et al. Análise de Fumonisinas (B1 e B2) em Milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS). In: 26a Jornada Acadêmica Integrada da UFSM (Universidade Federal de Santa Maria). Anais, 2012.
- [69] JOBIM, C. C., GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade Sanitária de Grãos e de Forragens Conservadas “versus” Desempenho Animal e Qualidade de seus Produtos. Anais do Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas. Maringá, 2001; p.242-261.
- [70] MÁRCIA, B.A., LÁZZARI, F.A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 18, n.4. Campinas 1998. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000400001>>
- [71] SILLIKER, J. H., ELLIOT, R. P., BAIRD-PACKER, A. C., BRYAN, F. L., CHRISTIAN, J. H.B., CLARK, D. S., OLSON, J. C., ROBERTS, T. A. Jr. Cereales y sus productos derivados. Cap. 23. In: Ecología microbiana de los alimentos. p. 278. Vol. II. 1985; Ed. Acribia. S.A. Zaragoza, Espanha.
- [72] SULEIMAN, R. BERN, J. D. BRUM, T. J. ROSENTRATER, K. A. Impact of moisture content and maize weevils on maize quality during hermetic and non-hermetic storage. Journal of Stored Products Research 78 (2018) 1e10

- [73] MARIN, S.; SANCHIS, V.; SAENZ, R.; RAMOS, A. J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Environmental-factors, in-vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, v. 102, n. 7, 1998; p. 831-837.
- [74] IMEA. Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária. Estimativa da Safra de milho – 2016/17, Setembro de 2017. Disponível em: <http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/12092017185654.pdf>
- [75] COSTA, A.R. et al Qualidade de grãos de milho armazenados em silos bolsa. *Rev. Ciênc. Agron.*, Fortaleza, v. 41, n. 2, 2010; p. 200-207.
- [76] BENTO, L. F., CANEPPELE, M. A. B, ALBUQUERQUE, M.C.F., KOBAYASTI, L., CANEPPELE, C., ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, n. 71(1): 2012; p.44-49.
- [77] EMBRAPA. Armazenamento Inadequado de Grãos Resulta em cerca de 15% de Perdas. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais. 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/busca-de-noticias/-/noticia/3860638/armazenamento-inadequado-de-graos-resulta-em-cerca-de-15-de-perdas>>. Acesso 25/05/2019.
- [78] DALPASQUALE, V.A. Modelo matemático para simulação de resfriamento de produtos agrícolas em fluxos contracorrentes. *Acta Scientiarum*, Maringá, PR, v.24, n.5, 2002; p.1213-1217.
- [79] TURNER, H. BRAMHMBHATT, M. SZABO-VEZSE, A. POMA, R. COKER, S.A. PILETSKY, *Analytical Methods for Determination of Mycotoxins: an update (2009 – 2014)*, *Analytica Chimica Acta* (2015).
- [80] SILVA, J.J. VIARO, H.P. FERRANTI, L.S. OLIVEIRA, A.L.M. FERREIRA, J.M. RUAS, C.F. ONO, E.Y.S. FUNGARO, M.H.P. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations and occurrence of fumonisins in maize grown in Southern Brazil. Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina. *Crop Protection* N° 99 160 a 167, (2017).
- [81] Resolução RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União, Seção 1, nº. 252, página 756, de 30 de dezembro de 2013.
- [82] Resolução-RDC nº. 7, de 18 de fevereiro de 2011, publicada no Diário Oficial União, Seção 1, nº. 46, página 66, de 9 de março de 2011.