

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação micológica e micotoxicológica
de silagens destinadas à alimentação de bovinos de
fazendas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro**

Luiz Antonio Moura Keller

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO MICOLÓGICA E MICOTOXICOLÓGICA DE SILAGENS
DESTINADAS À ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS DE FAZENDAS NO
ESTADO DE SÃO PAULO E RIO DE JANEIRO**

LUIZ ANTONIO MOURA KELLER

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

e Co-Orientação do Professor
Fernando Queiroz de Almeida

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal

**Seropédica, RJ
Fevereiro de 2009**

636.208598153

K29a

T

Keller, Luiz Antonio Moura, 1979-

Avaliação micológica e micotoxicológica de silagens destinadas à alimentação de bovinos de fazendas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro / Luiz Antonio Moura Keller - 2009. 58f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 71-81

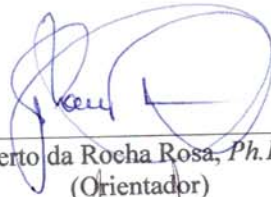
1. Bovino - Alimentação e rações - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 2. Bovino - Alimentação e rações - São Paulo (SP) - Teses. 3. Fungos - Teses. 4. Micotoxinas - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

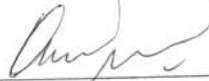
LUIZ ANTONIO MOURA KELLER

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19 / 02 / 2009



Prof. Carlos Alberto da Rocha Rosa, *Ph.D.*, L.D. - UFRRJ
(Orientador)



Prof. Ana Maria Dalcerro - UNRC (Argentina)



Prof. Lilia Renée Cavaglieri - UNRC (Argentina)

Dedico este trabalho à minha família, em especial minha mãe, irmã e noiva pelo amor e dedicação a todo instante...

AGRADECIMENTOS

Ao professor titular Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa pela orientação, apoio e amizade, essenciais para a concretização deste trabalho.

À minha família, principalmente minha mãe Cleide Moura de Andrade, irmã Kelly Moura Keller e noiva Nathalia Villela, por sempre me apoiarem em meu avanço e desenvolvimento pessoal.

Aos professores Dra. Glória Maria Direito, Dr. Marcelo Elias Fraga e ao colega Médico Veterinário Msc. Cesar Daniel Krüger pelos ensinamentos e auxílio.

Aos estagiários e colegas Águida Aparecida de Oliveira, Tatiana Xavier de Almeida, Ana Claudia Marassi, Michele Valadares Deveza, Marco Antonio Andrade Rodrigues, Beatriz de Sousa Monteiro, Lucila Maria Teixeira Nunes e tantos outros que passaram pelo Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas de nossa Universidade, pela alegria da convivência e trabalho em grupo.

Aos funcionários do Projeto Sanidade Animal, Convênio EMBRAPA-UFRRJ: Luiz Jorge, Valcir Pires, Adevaldo José Gonçalves e Joel Theodósio pelo incentivo e suporte técnico.

Ao CNPq e CAPES órgãos financiadores desses anos de pesquisa.

À Universidade Nacional de Rio Cuarto, onde conheci grandes amigos e colegas de trabalho.

Agradecimento especial às professoras Dras. Lilia Renée Cavaglieri e Ana Maria Dalcero, pelo apoio durante vários momentos do trabalho.

BIOGRAFIA

Luiz Antonio Moura Keller, filho de Cleide Moura de Andrade e Antonio Keller Neto, nasceu no dia 24 de dezembro de 1979 na cidade do Rio de Janeiro (RJ).

Ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no primeiro período letivo de 2001. Estagiou nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas de 2003 a 2006, tendo publicado trabalhos na área e participado dos projetos e convênios mantidos pelo Núcleo. Foi monitor da disciplina Micologia Veterinária para graduação, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, no período de 2004 a 2006. Colou grau em julho de 2006.

Em março de 2007, iniciou o Mestrado em Ciências Veterinárias da UFRRJ.

RESUMO

KELLER, Luiz Antonio Moura **Avaliação micológica e micotoxicológica de silagens destinadas à alimentação de bovinos de fazendas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro**. 2009. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Apesar de ter o segundo maior rebanho do mundo, a bovinocultura de corte brasileira apresenta modestos índices de produtividade. O desempenho dos animais em pastagens é razoável durante a estação chuvosa, observando-se na estação seca deficiência alimentar, causada pela baixa disponibilidade e qualidade do pasto, o que resulta em perda de peso dos animais. Assim, alimentos ensilados são uma solução atualmente utilizada a esta situação no processo produtivo. A avaliação deste substrato alimentar é escassa tanto no Brasil quanto no restante da América Latina, assim, os objetivos deste trabalho foram estabelecer a ocorrência natural de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas e determinar a presença de aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), fumonisina B₁ (FB₁) e deoxinivalenol (DON) em amostras de silagens destinadas ao consumo de bovinos de corte. Foram avaliados um total de 232 amostras de silagens de milho no período de junho 2007 a outubro 2007 e fevereiro 2008 a maio 2008 (avaliado o material pré e pós-fermentado nesse período), provenientes de três fazendas criadoras de gado de corte no Estado de São Paulo e uma no Estado do Rio de Janeiro. Foi observado que os substratos pós-fermentados apresentaram 70% das amostras contaminadas acima dos limites recomendados para alimentação animal de $1,0 \times 10^4$ ufc.g⁻¹ (GMP, 2008), com isso observou-se que a qualidade higiênica ruim e altas contagens encontradas levaram a uma micobiota variável e potencialmente toxígena, sendo *Aspergillus flavus* a espécie de maior ocorrência, seguida por *A. niger* agregados, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, além de outras espécies deste gênero. Do gênero *Aspergillus*, quando as cepas da seção Flavi foram testadas quanto a capacidade de produzir toxinas em condições adequadas, tivemos que pelo menos 30% das cepas isoladas foram potencialmente toxígenas. Somam-se a este fato que se detectaram altos níveis de toxinas produzidas por esse gênero, as aflatoxinas (níveis acima de 70 ppb) e ocratoxina A (níveis de até 10 ppm). Do gênero *Penicillium* ocorreu também variabilidade das espécies isoladas, tendo uma frequência maior de cepas isoladas do material pós-fermentado, a espécie que mais se destacou foi o *P. citrinum*, principal produtor da citrinina, onde 75% das cepas isoladas demonstraram ter capacidade de produção. O gênero *Fusarium* apresentou uma variabilidade baixa de espécies nas amostras avaliadas, mesmo nas amostras pré-fermentadas, onde poderia ser esperada uma maior quantidade de cepas; com a ocorrência de apenas duas espécies *F. verticillioides* e *F. graminearum*. Além disso, também foram detectados baixa frequência e níveis das toxinas deste gênero (níveis de 0,32-2 ppm de FB₁ e níveis de 0,56-2 ppm de DON). Tais achados reforçam a avaliação mais ampla desse substrato que é base alimentar durante grandes períodos do ano para o nosso rebanho.

Palavras chave: micotoxinas, fungos, milho.

ABSTRACT

KELLER, Luiz Antonio Moura **Mycological and mycotoxicology evaluation of silage intended to a food on cattle Farms in the State of São Paulo and Rio de Janeiro.** 2009. 58p. Dissertation (Magister Scientiae in Veterinary Sciences, Animal Health). Institute of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Microbiology and Immunology, University Federal Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Despite having the second largest cattle herd in the world, the Brazilian has low rates of productivity. The performance of the animals in pastures is reasonable during the rainy season, being deficient in the dry season, caused by the low availability and quality of grass, which results in weight loss of animals. Thus ensiled foods are a recently solution to this situation in the production process. But we have a very few studies on this food substrate in Brazil and Latin America. The objectives of this study were to establish the natural frequency of species from the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* potentially mycotoxins producers and detect mycotoxins presents in the samples (aflatoxins, ochratoxin A, fumonisin B₁ and deoxynivalenol). It was observed that the post-fermented substrates had 70% of samples contaminated above the limits recommended for feeding of 1.0×10^4 ufc.g⁻¹ (GMP, 2008), thus it was observed that the bad hygienic quality and high counts led to a variable and potentially toxigenic microbiota. *Aspergillus flavus* is the species of greatest occurrence in the samples evaluated, followed by *A. niger* aggregate, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, and other species of this genera. In genera *Aspergillus*, when strains were tested against their ability to produce toxins under appropriate conditions had an output of at least 30% of the strains potential toxigenic. Add to this fact that the detection of high levels of toxins produced by this genera, aflatoxins (levels above 70 ppb) and ochratoxin A (up to 10 ppm). The genera *Penicillium* had also variability of the species isolated, with a higher frequency of strains from post-fermented material, the kind that most stood out was the *P. citrinum*, the main producer of citrinin, which have demonstrated capacity to produce that toxin in 75% of the strains. The *Fusarium* sp. showed a low variability of species in the samples evaluated, even in pre-fermented samples where counts were higher and had the occurrence of only two species *F. verticillioides* and *F. graminearum*. Moreover, were also detected low frequency and levels of toxins from this genus (0,32-2 ppm levels of FB₁ and levels of 0,56-2 ppm of DON). This observation creates the need to expand studies related to ensiled food, which the animals were feed during major periods of the year.

Keywords: mycotoxins, fungi, corn.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Aspergillus</i> que contaminam produtos vegetais.	09
TABELA 2: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Penicillium</i> que contaminam produtos vegetais.	11
TABELA 3: Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Fusarium</i> que contaminam produtos vegetais.	12
TABELA 4: Características físicas do milho pré-fermentado nos diferentes setores de amostragem do silo.	25
TABELA 5: Características físicas do milho pós-fermentado nos diferentes setores de amostragem do silo.	25
TABELA 6: Contagem fúngica do milho pré e pós-fermentado em diferentes meios de cultivo.	28
TABELA 7: Percentual de amostras de milho contaminadas acima dos limites recomendados.	29
TABELA 8: Freqüência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de AFs em milho quantificados através de CLAE.	32
TABELA 9: Freqüência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de OTA em milho quantificados através de CLAE.	32
TABELA 10: Freqüência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de FB ₁ em milho quantificados através de ELISA.	33
TABELA 11: Freqüência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de DON em milho quantificados através de ELISA.	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Conidióforo de <i>Aspergillus</i> sp. bisseriado (<i>A. ochraceus</i>) e terminologias das estruturas usadas na classificação e identificação.	08
FIGURA 2: “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, terverticilado; e, quaterverticilado. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada.	10
FIGURA 3: Vista frontal do silo, após período de fermentação de \pm 90 dias. Esquema dos pontos de coleta nos silos.	17
FIGURA 4: Esquema da divisão linear dos silos com linhas de coletas.	17
FIGURA 5: Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (ufc g ⁻¹).	19
FIGURA 6: Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero <i>Aspergillus</i> nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas.	20
FIGURA 7: Esquema de inoculação e incubação de duas cepas do gênero <i>Penicillium</i> a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C).	20
FIGURA 8: Esquema de incubação das cepas do gênero <i>Fusarium</i> nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final.	21
FIGURA 9: Avaliação das condições do milho pré-fermentado. A e B - crescimento de micélio fúngico na superfície da espiga.	26
FIGURA 10: Avaliação das condições do milho pós-fermentado. Crescimento de micélio em uma grande área do interior do silo.	26
FIGURA 11: Avaliação das condições do milho pós-fermentado. Acúmulo de umidade em vários pontos da superfície do silo, onde as setas indicam estes pontos.	27
FIGURA 12: Temperaturas, umidades relativas e pluviosidades médias durante o período.	27
FIGURA 13: Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados no milho pré e pós-fermentado.	29
FIGURA 14: Densidade relativa (%) de espécies de <i>Aspergillus</i> no milho pré e pós-fermentado.	30
FIGURA 15: Densidade relativa (%) de espécies de <i>Penicillium</i> no milho pré e pós-fermentado.	30

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Hipótese	02
1.2 Objetivo geral	02
1.3 Objetivos específicos	02
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A bovinocultura brasileira	03
2.2 Tipos de silagens	04
2.3 Os fungos	05
2.4 Micobiota tóxigena em produtos vegetais, silagens e rações	06
2.5 Gênero <i>Aspergillus</i>	07
2.6 Gênero <i>Penicillium</i>	09
2.7 Gênero <i>Fusarium</i>	11
2.8 Micotoxinas e micotoxicoses: características gerais	12
2.8.1 Aflatoxinas	13
2.8.2 Fumonisinias e deoxinivalenol	13
2.8.3 Ocratoxinas	14
2.8.4 Citrinina	14
2.9 Métodos de detecção das micotoxinas	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Amostragem	16
3.2 Avaliação física das amostras	18
3.2.1 Percentual de matéria seca	18
3.2.2 Atividade de água (A_w) e pH	18
3.3 Dados climatológicos e localização geográfica	18
3.4 Determinação da micobiota	18
3.5 Isolamento e identificação fúngica	19
3.6 Caracterização do perfil tóxico das espécies	21
3.6.1- Perfil tóxico de fungos produtores de ocratoxina A	21
3.6.1- Perfil tóxico de fungos produtores de citrinina	22
3.6.1- Perfil tóxico de fungos produtores de aflatoxinas	22
3.6.1- Perfil tóxico de fungos produtores de gliotoxina	22
3.7 Detecção e quantificação de micotoxinas	23
3.7.1 Detecção e quantificação de aflatoxinas e ocratoxina A	23
3.7.2 Detecção e quantificação de fumonisinina B ₁ e deoxinivalenol	23
3.8 Análises estatísticas	24
4. RESULTADOS	25
4.1- Avaliação física das amostras, dados climatológicos e localização geográfica	25
4.1.1- Avaliação física das amostras	25
4.1.2- Dados climatológicos e localização geográfica	27
4.2 Contaminação fúngica	27
4.3 Determinação da micobiota	28
4.4 Perfil tóxico: habilidade como produtora	29

4.5 Análises micotoxicológicas	31
4.5.1 Aflatoxinas	31
4.5.2 Ocratoxina A	32
4.5.3 Fumonisina B ₁ e deoxinivalenol	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

INTRODUÇÃO

A contaminação fúngica de alimentos destinados ao consumo animal com conseqüente formação de micotoxinas constitui um problema de grande importância em nível mundial. As micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos, causam efeitos adversos tais como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, nefrotoxicidade e imunossupressão provocando diversas patologias e grandes perdas econômicas agropecuárias.

De acordo com diretrizes internacionais, tem sido observado, que os propágulos fúngicos constituem um indicador da condição higiênico sanitária de rações animais, e que as contagens não devem exceder o valor de 1×10^4 ufc g^{-1} (unidades formadoras de colônias por grama de alimento) (GMP, 2008). A legislação brasileira atual não fixa nenhum limite máximo tolerado, no que diz respeito à contaminação fúngica em rações para animais, e consideram os fungos como simples agentes de deterioração.

Dois pontos fundamentais devem ser avaliados como indicadores de qualidade sanitária: a quantidade de propágulos fúngicos em um produto vegetal ou ração e a concentração de micotoxinas nestes produtos, pois a grande maioria das micotoxinas são produtos extracelulares e não necessariamente vão estar presentes no citoplasma celular de hifas, conídios e esporos.

A ocorrência de micotoxicoses entre os animais domésticos é reflexo do sistema produtivo adotado pelos criadores. Quanto mais evoluído for esse sistema, maior será a utilização de alimentos concentrados, a base de grãos, tornando maior a probabilidade de intoxicação pelas micotoxinas quando não se controla a inocuidade destes.

As espécies que aparecem com maior frequência nos cereais pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, com forte implicação toxicológica, afetando os parâmetros produtivos, com graves perdas econômicas e riscos para a saúde humana e animal.

As aflatoxinas são produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A aflatoxina B₁ (AFB₁), mais freqüente e mais tóxica, é reconhecida como o mais potente hepatocarcinógeno de origem biológica para o homem e os animais.

A ocratoxina A (OTA) é produzida principalmente pelos fungos *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* agregados (que são um grupo de espécies morfológicamente semelhantes, porém filogeneticamente distintas). É reconhecida como um potente nefrotóxico para o homem e os animais.

Além disso, temos o deoxinivalenol (DON) e a fumonisina B₁ (FB₁), toxinas associadas principalmente com contaminação pré-colheita, pois seus fungos produtores, do gênero *Fusarium*, são fitopatógenos importantes.

O risco de contaminação dos alimentos para animais está sempre presente, e há em nosso país, pouquíssimos dados de monitoramento com relação aos níveis de contaminação em produtos destinadas à alimentação de bovinos. Este fato impossibilita quaisquer tentativas de estabelecimento de risco de exposição; não existem dados adequados e nem estatisticamente confiáveis.

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostraram que em 2003 o rebanho bovino brasileiro já ultrapassava 12 milhões de cabeças, e desse total a maior concentração se dava nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Por serem escassos os dados sobre a microbiota toxígena e a produção de suas micotoxinas em silagens para bovinos, este trabalho permitirá conhecer parcialmente o risco toxicológico desse alimento. Isto poderia ser de grande relevância já que estas micotoxinas, quando presentes afetam parâmetros produtivos e da saúde animal.

Considera-se essencial para o controle de qualidade de alimentos, a identificação da microbiota contaminante. A identificação específica dos fungos poderá prover dados importantes para o conhecimento da biologia, taxonomia, bioquímica e fisiologia destes microrganismos incluindo a produção de suas micotoxinas. Com tais informações poderão ser desenvolvidas formas de controle e de prevenção dos problemas decorrentes.

1.1- Hipótese

Os alimentos fornecidos a bovinos são susceptíveis à contaminação pelas principais espécies de fungos toxígenos e suas micotoxinas.

1.2- Objetivo geral

Estabelecer a ocorrência natural de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas e determinar a presença de aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), fumonisina B₁ (FB₁) e deoxinivalenol (DON) em amostras de silagens destinadas ao consumo bovino.

1.3- Objetivos específicos

1. Realizar a enumeração quantitativa dos propágulos fúngicos das amostras coletadas.
2. Determinar a frequência da microbiota total realizando sua identificação taxonômica em nível de gênero.
3. Isolar e identificar espécies do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, estabelecendo a densidade relativa de cada uma.
4. Caracterizar o perfil toxígeno de espécies isoladas.
5. Detectar e quantificar AFs e OTA por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
6. Detectar e quantificar FB₁ e DON usando a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).
7. Avaliar e analisar estatisticamente os resultados.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A bovinocultura brasileira

A bovinocultura, demanda um amplo conhecimento não apenas do bovino, mas também do seu ambiente criatório. É necessário, conhecer sua reprodução, suas características raciais, seu comportamento e suas necessidades nutricionais e também saber manejar as pastagens e suas principais fontes de alimentação, bem como as doenças que os atacam e como preveni-las, além de conhecer as construções e instalações para manter os bovinos (ALMEIDA, 2000).

Os ganhos da pecuária bovina, em alguns países como o Brasil chegou a atingir aproximadamente R\$ 4 bilhões de reais no ano de 2004 (FAO, 2007). De acordo com o IBGE, ao final de 2005, a bovinocultura brasileira era praticada em quatro milhões de propriedades rurais, envolvendo 200 milhões de cabeças; 28 milhões das quais foram abatidas em frigoríficos oficiais para consumo interno e para exportação. Estimasse que cerca de 10 milhões de cabeças tiveram outro tipo de abate, pois 38 milhões foi o número de peles bovinas processadas nos curtumes brasileiros.

As estatísticas para 2008, previam que o Brasil se tornaria o maior produtor e exportador mundial de carne bovina, e que a produção de leite comercializado sob supervisão oficial seria de 16 milhões de litros (IBGE 2003; 2005).

Apesar de ter o segundo maior rebanho do mundo, a bovinocultura de corte brasileira, em geral, apresenta modestos índices na qualidade da produtividade. O desempenho dos animais em pastagens é razoável durante a estação chuvosa, observando-se na estação seca uma deficiência alimentar, causada pela baixa disponibilidade e qualidade do pasto, o que resulta em perda de peso dos animais. Esta situação é caracterizada por uma baixa taxa de fertilidade, alta taxa de mortalidade e abate tardio dos animais, além de animais com qualidade de carcaça inferior e de alto custo de produção. Estes, entre outros problemas, aliados à crescente demanda de alimentos, inclusive de carne bovina, sugerem mudanças em determinados segmentos da bovinocultura de corte brasileira (MAPA, 2008).

Nos períodos de estiagem há escassez de forragem aliada ao baixo valor nutritivo das forrageiras, o que tem provocado, entre outros fatores, um prejuízo na engorda e manutenção do gado. Assim sendo, para atender às necessidades básicas de alimentação dos animais durante estes períodos faz-se necessário o uso de tecnologias para produção e armazenamento de forragem, como a ensilagem e fenação. Em vários países, a utilização dessas técnicas mais apuradas é realizada a partir do excedente de matéria prima do período chuvoso, e têm minimizado os danos aos animais no período de seca. Algumas plantas forrageiras como o sorgo, milho e capim elefante, entre outras, vêm sendo largamente utilizadas na produção de silagens (ALMEIDA, 2000).

Silagem é o resultado de um processo de anaerobiose, isto é, ausência de oxigênio, por acidificação do material verde vegetal. A ensilagem é o processo que dá origem a silagem e consiste no corte da planta na época ideal, o enchimento do silo (local destinado ao armazenamento da silagem), compactação da massa verde picada e vedação do silo (ALMEIDA, 2000). Destacam-se como benefícios da silagem, a manutenção de um maior número de animais por unidade de terra; a manutenção ou maximização da produção principalmente durante os períodos de escassez de alimentos; permite, através do

confinamento, ofertar animais bem nutridos em épocas de melhor preço; permite armazenar grande quantidade de alimento (matéria seca) em pouco espaço.

O milho e o sorgo têm sido apresentados como as espécies mais adaptadas ao processo de ensilagem pelas facilidades de cultivo, alto rendimento e pela qualidade da silagem produzida. Cerca de 1,5 milhões de hectares de diversas culturas são ensilados por ano no Brasil, sendo o milho a cultura mais empregada em todo o mundo na produção de silagem (FAO, 2007).

2.2- Tipos de silagens

Da mesma forma como a silagem pode ser feita com tipos diferentes de insumos, existem também diferentes maneiras de produção da silagem. De acordo com Almeida (2000), os silos mais comumente utilizados são:

Silagem de Planta Inteira - É a silagem de milho mais conhecida e comumente utilizada. Consiste em cortar toda a planta de milho através de ensiladeiras adequadas, para posterior compactação e vedação no silo.

Silagem de Parte Superior - É a silagem de milho semelhante à anterior; a diferença está no material aproveitado. Nesta, a planta é cortada da espiga para cima; o restante do processo como compactação e vedação é idêntico ao de uma silagem comum. Devido a esta restrição no corte, esta silagem possui um menor percentual de fibra e conseqüentemente, maior digestibilidade.

Silagem de Grão Úmido - É a silagem feita apenas com os grãos do milho. Consiste na colheita do milho quando os grãos apresentam entre 35% e 40% de umidade, através de colheitadeiras convencionais, posterior trituração em moinhos adaptados, compactação e vedação em silos construídos em locais cobertos.

O silo pode ter diferentes tamanhos e se adaptar a diferentes condições da propriedade, principalmente do terreno. Ainda de acordo com Almeida (2000), para ser definido o tamanho do silo deve-se considerar os pontos abaixo:

- A. O número de animais a ser alimentado, levando-se em consideração o peso inicial dos animais e a produtividade que se deseja alcançar (carne, leite).
- B. O número de dias ou período em que os animais receberão a silagem.
- C. Quantidade de silagem fornecida aos animais por dia, que é determinada em função do peso do animal, produtividade que se deseja alcançar e potencial produtivo dos animais.
- D. A espessura de corte diário da silagem, devido ao contato com o ar atmosférico.
- E. A estrutura da fazenda ou propriedade versus o período para o corte, enchimento, compactação e vedação do silo.
- F. O tamanho do local para construção do silo e posicionamento com relação às instalações
- G. O peso médio da silagem por metro cúbico.
- H. O percentual de perdas, consideradas normais devido a processos fermentativos.

Assim, os silos podem ser divididos em dois tipos: verticais aéreos e horizontais. Sendo os silos verticais aéreos normalmente fixos, e os de crescimento horizontal, normalmente móveis, de estruturas temporárias. Atualmente, a grande maioria dos produtores tem construído os silos horizontais, em especial o tipo trincheira, pois como são de feitura simples e estrutura temporária, apresentam benefícios em custo, funcionalidade e durabilidade (ALMEIDA, 2000).

2.3- Os fungos

Desde o tempo em que o homem primitivo começou a cultivar vegetais e a estocar alimentos, a contaminação fúngica tem demandado sua atenção. Os fungos vêm lentamente invadindo, acidificando, fermentando, descolorindo e deteriorando os alimentos e, assim transformando nutritivos produtos agrícolas em produtos tóxicos e insalubres (MILLER, 1996).

A micologia de alimentos, como parte da microbiologia, foi por muito tempo negligenciada em função da pouca importância dada aos fungos contaminantes. Este grupo de microrganismos era visto pelo aspecto estético e de deterioração, além disso, como agentes infecciosos, produzindo micoses superficiais e profundas de caráter deformante (ROSA, 2002).

Os produtos fúngicos têm ampliado cada vez mais sua importância no cenário mundial, com suas propriedades antibióticas, anabolizantes, estrogênicas, carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, bem como outras. Ao ponto das micotoxinas serem consideradas como "poluentes ambientais". As micotoxinas são um grupo diverso de substâncias químicas, que podem afetar a todos os animais, incluindo o ser humano. Estas substâncias, produzidas por fungos, podem atingir principalmente órgãos como o fígado, rins e os sistemas nervoso, endócrino e imune (ROSA, 2002).

Não se sabe quantas micotoxinas e metabólitos fúngicos tóxicos existam ao certo, apesar de ser possível fazer uma estimativa. Turner (1978) catalogou aproximadamente 1200 metabólitos secundários produzidos por fungos. Turner; Alderidge (1983) catalogaram mais de 2000 metabólitos produzidos por aproximadamente 1100 espécies, o que, em média, dá dois metabólitos únicos por espécie. Já Hawksworth (1991) estimou que existisse cerca de 69000 espécies fúngicas conhecidas, o que representa 5% das espécies fúngicas que se estima que existam no mundo, isto é, 1,5 milhões. Assumindo-se que existam dois metabólitos únicos por espécie, podem existir cerca de três milhões de metabólitos secundários produzidos por fungos. Porém apenas cerca de dez por cento dos metabólitos secundários descritos por Turner (1978) e por Turner; Alderidge (1983) foram classificados como sendo tóxicos por Cole; Cox (1981). Cole; Cox (1981) listaram aproximadamente 300 compostos tóxicos, mas estima-se que possam existir entre 20000 a 300000, bem como uma grande diversidade de mecanismos de ação. Existem, portanto, um número muito grande de metabólitos tóxicos e micotoxinas por descobrir. Entretanto, o número de micotoxinas que são frequentemente detectadas em alimentos é reduzido, fica entre 20 a 30.

Atualmente o estudo dos fungos vem se tornando um ponto de interesse não apenas dos micologistas, mas também vem tomando seu lugar no contexto da ciência e tecnologia de alimentos, saúde das populações e sanidade animal (SAMSON et al., 2000). A contaminação fúngica causa inúmeros prejuízos sobre a produtividade agropecuária. Os fungos são responsáveis pela contaminação de parte significativa das safras agrícolas, principalmente em países de clima tropical úmido, em que as tecnologias agrícolas adequadas, principalmente de colheita e pós-colheita, nem sempre estão disponíveis (PIMENTEL, 1991; RUSTOM, 1997).

As micotoxinas têm sido consideradas como um dos principais fatores de risco para a saúde animal, seja pela sua ingestão, pelo contato direto ou pela inalação junto a partículas vegetais ou poeira. Espécies fúngicas até então consideradas inócuas e saprófitas de vida livre têm sido atualmente identificadas como toxígenas (CAST, 2003). Cada micotoxina se desenvolve em um tipo específico de substrato. O meio é determinante na sua produção, afetando tanto a qualidade como o tipo de metabólito tóxico produzido. Madhyastha et al. (1990), observou que no milho e no trigo o *Penicillium verrucosum* produzia citrinina, mas não foi observada a mesma produção em frutos oleaginosos. Fato semelhante ocorreu com a

ocratoxina B (OTB) que foi produzida por *Aspergillus alutaceus* nos frutos oleaginosos e não em cereais.

A variabilidade na produção de toxinas em diferentes alimentos pode ser atribuída às características físicas e químicas do substrato. Os parâmetros físicos incluem disponibilidade de água, de oxigênio e a condutividade térmica no produto, o que influi sobre a temperatura nos grãos. Entre as características químicas, destacam-se o conteúdo de proteínas, gorduras, aminoácidos e minerais (MADHYASTHA, 1990). A produção de micotoxinas está também diretamente relacionada com as concentrações de gases atmosféricos. Esta é mais sensível do que o crescimento fúngico. As baixas concentrações de O₂ (< 0,1%) e/ou altas concentrações de CO₂ previnem o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas na maioria dos casos (PASTER; BULLERMAN, 1988).

2.4- Micobiota toxígena em produtos vegetais, silagens e rações

Estudos recentes demonstraram que os fungos mais encontrados aqui na América do Sul são primeiramente os do gênero *Aspergillus*, seguido por *Penicillium*. Entretanto, observou-se também a grande incidência de outros gêneros como *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Mucor*, entre outros, compondo a micobiota dos mais variados produtos vegetais. Dalcerio et al. (1997, 1998) e Magnoli et al. (1998) pesquisaram a micobiota em rações e seus constituintes, destinadas para alimentação de frangos de corte na Argentina durante o período de 1995 a 1997. As espécies de maior prevalência foram às pertencentes ao gênero *Penicillium* em 98% das amostras, seguida de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. Magnoli et al. (2002; 2005; 2007) ao dar continuidade aos seus estudos, nos fornecem dados importantes para avaliação do substrato milho no cenário e condições da América do Sul.

Rosa (2002) estudou a micobiota toxígena de milho e rações destinadas à alimentação de frangos de corte em quatro fábricas de ração do Estado do Rio de Janeiro e observou que o gênero *Aspergillus* foi o prevalente (41%), seguido do *Penicillium* (40%) e do *Fusarium* (15%), dentre outros. Outros autores colaboram para essa avaliação, encontrando frequências dos gêneros citados semelhantes com os demais estudos, como Fraga et al. (2007), com a avaliação de milho, rações de frango de corte e camas de frango; Ribeiro et al. (2007) com avaliação de substratos para alimentação bovina (cevada, radícula); Keller et al. (2007) com avaliação de rações para equinos; e Campos et al. (2008) avaliando rações para cães e ingredientes destas.

No Brasil e América Latina existem poucos estudos para produtos ensilados e, portanto uma avaliação escassa sobre sua qualidade higiênica e o risco de contaminação por micotoxinas, quanto ao seu tipo e grau. No Brasil destacamos dois estudos Pereira et al. (2005), que detectou a presença de aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos de leite em Minas Gerais e Sassahara; Yanaka; Netto (2003) que detectou aflatoxinas e zearalenona (ZEA) em silagens e outros substratos destinados também a alimentação de bovinos leiteiros no norte do Paraná, ambas acima dos níveis propostos como de risco pela ANVISA (2002).

Em publicações européias Cole et al. (1977) e Scudamore; Livesey (1997) avaliaram a qualidade do material ensilado oferecido aos bovinos na Europa determinado que estes estavam acima de limites europeus de higiene e contaminação por micotoxinas e alertavam para o risco da contaminação destes substratos pelo *A. fumigatus*. Além disso, neste mesmo substrato já em 2005, Boudra; Morgavi (2005) concluíram que os mesmos substratos, principalmente milho continuavam acima dos limites europeus permitidos e, juntamente a isso, destacaram novamente a contaminação por *A. fumigatus* e os riscos envolvidos deste contaminante na cadeia produtiva dos bovinos.

Na Argentina, apenas foram encontradas pesquisas mais atuais, onde Amigot et al. (2006), que avaliou novos parâmetros de higiene e qualidade da silagem oferecida aos bovinos como alimento; González Pereyra et al. (2007), que avaliou parâmetros micológicos e toxicológicos de silos de milho de uma região específica daquele país; e Pereyra et al. (2008) que avaliou a presença de *A. fumigatus* e toxinas produzidas por essa espécie em silos de milho. Nos estudos argentinos destacou-se à semelhança dos resultados europeus, que a qualidade higiênica e contaminação por micotoxinas estavam acima de limites estabelecidos.

2.5- Gênero *Aspergillus*

As espécies do gênero *Aspergillus* são saprófitas e podem crescer sobre uma ampla faixa de substratos naturais devido à capacidade de muitas de suas espécies, crescerem e produzirem metabólitos em baixas atividades de água e altas temperaturas (MOSS, 1991). Eles possuem grande versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios no ambiente. Entretanto, muitas espécies são consideradas patógenas, alergênicas, toxicogênicas e decompositoras, bem como podem ser utilizadas na produção de alimentos fermentados (PITT; HOCKING, 1997).

As espécies patogênicas representam risco real para a saúde, dado que podem produzir numerosas enfermidades tais como: aspergilose aviária e aborto micótico (ROSA et al., 1985), aspergilose pulmonar, aspergilose cutânea, aspergilose hepato-esplênica, etc. Os conídios podem causar hipersensibilidade em pessoas sensibilizadas, como fibrose e pneumonia. Este gênero tem particular importância pois algumas espécies são produtoras de micotoxinas e causadoras de importantes micotoxicoses em humanos e animais (PITT; HOCKING, 1997).

As chaves de classificação atualmente utilizadas para a taxonomia de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram descritas por Samson (1995); Klich; Pitt (1988) e mais recentemente Klich (2002). Segundo Klich (2002), a taxonomia deste gênero é baseada nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas das colônias desenvolvidas nos meios de cultivo: agar extrato de malte (MEA), agar Czapek extrato de levedura (CYA), agar nitrato glicerol 25% (G25N) e agar Czapek extrato de levedura sacarose 20% (CY20S).

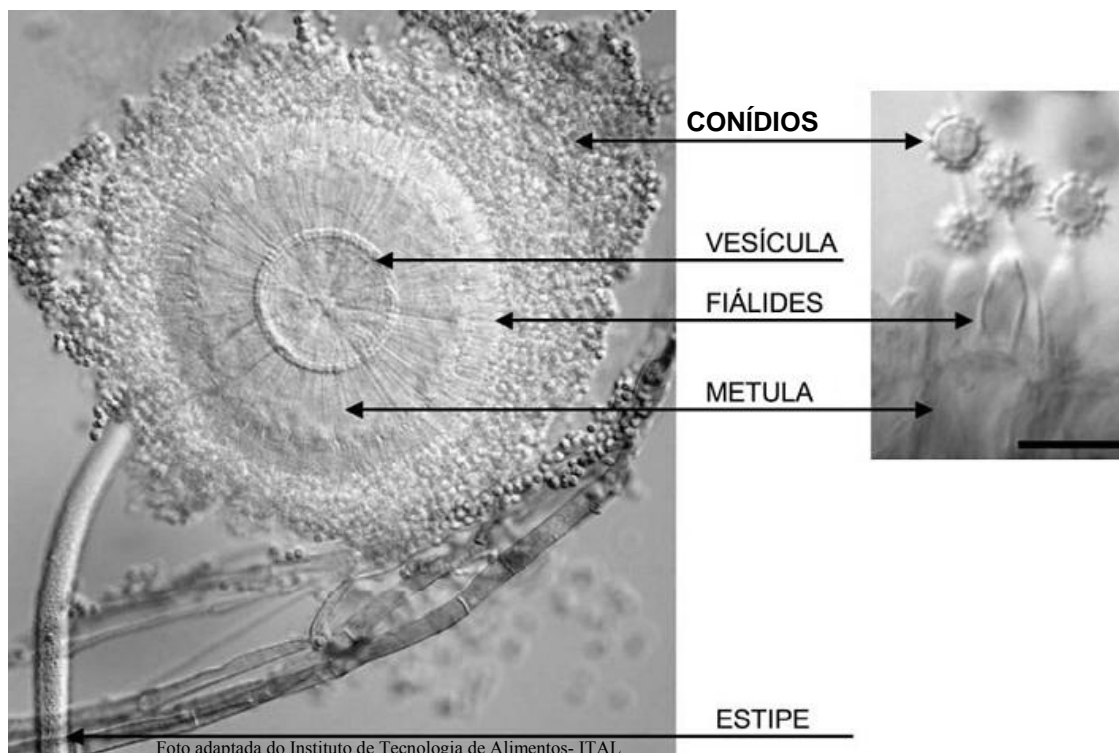


FIGURA 1: Conidióforo de *Aspergillus* sp. bisseriado (*A. ochraceus*) e terminologias das estruturas usadas na classificação e identificação. Escala = 10 μ m.

As características macroscópicas mais importantes, do ponto de vista taxonômico, que devem ser observadas são: cor e diâmetro das colônias; cor do micélio e do reverso da colônia; formação de esclerócios. E as características microscópicas mais importantes do ponto de vista taxonômico e sistemático são: conidióforo; vesícula e cabeça conidial; fiálides e métulas; conídios (Figura 1) e células de *Hülle*.

Frisvad; Samson (1991) bem como Pitt; Hocking (1997) demonstraram que muitas espécies do gênero *Aspergillus* são reconhecidamente capazes de produzir metabólitos tóxicos, demonstrados na Tabela 1.

TABELA 1: Potencial toxígeno das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam produtos vegetais.

Espécies	Micotoxinas
<i>A. candidus</i>	Ácido kojico, candidulina, terfenilina, xantoacina
<i>A. clavatus</i>	Citochalasina E, patulina, ascladiol, clavatul, triptoquivalinas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarin B
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ e B ₂ , aflatrem, ácido aspergílico, ácido ciclopiazónico, ácido kójico, aflavininas, ácido 3-nitropropiónico, paspalinas
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorginas A e C, gliotoxinas, fumigaclavinas, fumitoxinas, fumigatinas, fumagilinas, espinulosinas, triptoquivalinas, verruculogen
<i>A. niger</i> agregados	Ocratoxinas, malforminas, naptoquinonas
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas B e G, ácido aspergílico, ácido kójico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, ácido penicílico, ácido kójico, ácido secalónico A, xantomegnina, viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Ácido ciclopiazónico, ácido kójico, ácido 3-nitropropiónico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B e G, ácido aspergílico, ácido kójico, aflavininas
<i>A. tamaritii</i>	Ácido ciclopiazónico, ácido kójico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, patulina, citreoviridina, mevinolina, territrem, ácido terreico, terramide A
<i>A. ustus</i>	Austamida, austidiol, austinas, austocistina
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatocistina, versicolorinas, nidulotoxinas
<i>A. wentii</i>	Metilxantonas, ácido 3-nitropropiónico, ácido kójico
<i>Eurotium amstelodami</i>	Equinulinas, auroglaucinas
<i>E. chevalieri</i>	Equinulinas, auroglaucinas, xantocilina X
<i>E. herbariorum</i>	Auroglaucinas, flavoglaucinas
<i>E. repens</i>	Equinulinas, auroglaucinas, asperflavinas
<i>E. rubrum</i>	Equinulinas, auroglaucinas, rubroglaucinas, gliotoxina

Fonte: FRISVAD; SAMSON (1991) e PITT; HOCKING (1997).

2.6- Gênero *Penicillium*

As espécies do gênero *Penicillium* também são saprófitas e tem ecofisiologia muito semelhante aos fungos do gênero *Aspergillus*. Da mesma forma muitas espécies são consideradas patógenas, decompositoras, bem como podem ser utilizadas na produção de alimentos fermentados, como por exemplo, os conhecidos *P. roqueforti* e *P. camemberti* (PITT; HOCKING, 1997). Também podem produzir diversas classes de metabólitos

secundários bioativos. São descritas também várias micotoxinas para esse gênero. Estes metabólitos são descritos como contaminante de grãos, alimentos e fluidos biológicos.

O gênero *Penicillium* apresenta taxonomia bastante complexa. A dificuldade de taxonomia e identificação esta ligada a variabilidade inerente ao gênero. Admite-se que cerca de 70 a 80% dos conidióforos são identificáveis morfologicamente com bastante confiança (Figura 2). Entretanto, espera-se uma dada proporção de conidióforos atípicos ou fora dos padrões normalmente seguidos (PITT, 1988).

Uma das chaves de classificação mais utilizadas para a taxonomia de espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* foram descritas por Pitt (1988); atualmente vem sendo bastante utilizada chave proposta por Pitt; Hocking (1997) que apresenta várias espécies em sua forma anamórfica e dois teleomorfos associados incluídos nos gêneros *Eupenicillium* e *Talaromyces*.

Os autores definem as características macroscópicas mais importantes, do ponto de vista taxonômico, como: diâmetro, textura, cor da colônia e seu reverso, bem como presença de exsudado e pigmentos solúveis. Avalia-se também a formação de esclerócios, produção de gimnotécios ou cleistotécios.

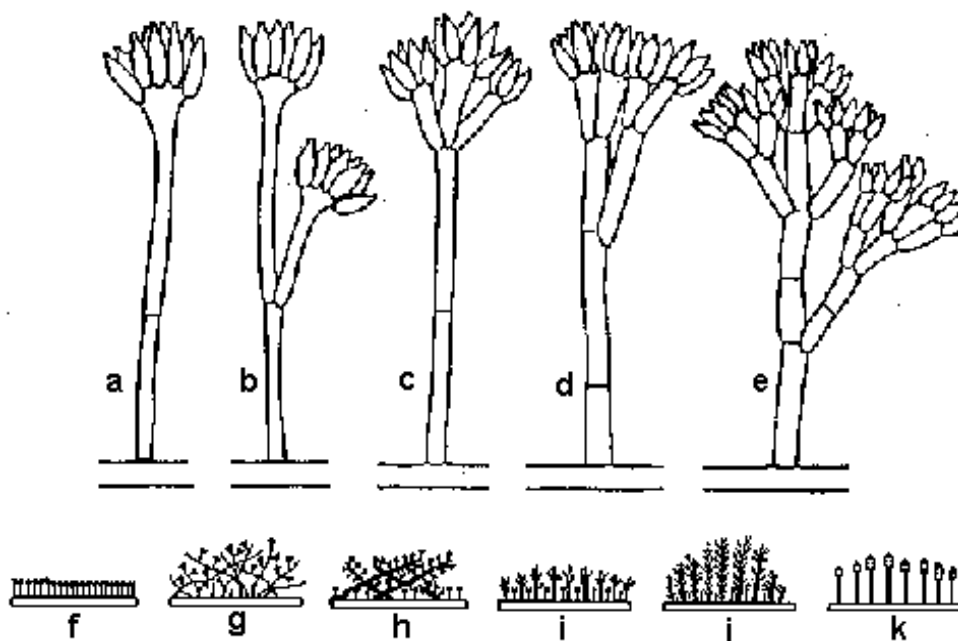


FIGURA 2- “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, terverticilado; e, quaterverticilado. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada. **Fonte:** Samson et al. (2000).

As características microscópicas mais importantes do ponto de vista taxonômico são: caracterização do conidióforo; número e disposição das métulas; forma das fiálides e a relação entre seu tamanho e das métulas; caracterização da estípede, conídios, ascos e ascosporos.

TABELA 2: Potencial toxígeno das principais espécies de *Penicillium* que contaminam produtos vegetais.

Espécies de <i>Penicillium</i>	Micotoxinas
<i>P. aethiopicum</i>	Griseofulvina, Viridicatumtoxina
<i>P. aurantiogriseum</i>	Ácido Penicílico, Roquefortina C, Xantomegnina, Viomeleim, Verrucosidina
<i>P. brevicompactum</i>	Ácido Micofenólico
<i>P. camemberti</i>	Ácido Ciclopiazônico
<i>P. chrysogenum</i>	Roquefortina C, Ácido Ciclopiazônico
<i>P. citreonigrum</i>	Citreoviridina
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. commune</i>	Ácido Ciclopiazônico, Ácido Ciclopáldico, Ácido Ciclopólico, Ciclopiamina, Palitantina, Rugulovasinas
<i>P. funiculosum</i>	Patulina
<i>P. griseofulvum</i>	Patulina, Ácido Ciclopiazônico, Roquefortina C, Griseofulvina
<i>P. islandicum</i>	Cicloclorotina, Islanditoxina, Leuteoskyrina, Eritroskyrina
<i>P. janthinellum</i>	Toxinas Tremorgênicas
<i>P. oxalicum</i>	Ácido Secalônico D
<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoxinas
<i>P. raistrickii</i>	Griseofulvina, Toxinas Tremorgênicas
<i>P. roqueforti</i>	PR Toxina, Patulina, Ácido Penicílico, Roquefortina C, Ácido Micofenólico
<i>P. simplicissimum</i>	Verrucologem, Fumitremorgem B, Ácido Penicílico, Viridicatumtoxina
<i>P. variabile</i>	Rugulosina
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A, Citrinina

Fonte: Pitt; Hocking (1997).

2.7- Gênero *Fusarium*

O *Fusarium* sp. é um fungo cosmopolita, compreendendo uma grande quantidade de espécies que são conhecidas por causar doenças em culturas de importância agrônômica, bem como patologias em humanos e animais. Juntamente com *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., o gênero *Fusarium* é um dos contaminantes alimentares mais importantes (GARON et al., 2006). Espécies do gênero *Fusarium* encontram-se amplamente distribuídas em plantas e no solo, sendo um importante fitopatógeno. Temos como exemplo a Giberela, causada pelo fungo *Gibberella zeae* (anamorfo *F. graminearum*), que é uma doença de infecção floral sendo de importante diagnóstico para prevenção e combate nas lavouras de trigo e milho principalmente. Esse gênero possui cerca de vinte espécies, distribuídas em 12 seções. Pode-se citar como espécies mais comuns o *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. chlamydosporum*. Liseola é a seção mais importante deste gênero, pois contém espécies potencialmente produtoras das micotoxinas mais frequentes, como o *F. verticillioides* e *F. graminearum*.

Dentre as toxinas produzidas por *Fusarium* sp., as mais importantes são: fumonisinas, ZEA, patulina e tricotecenos (Tabela 3). Os tricotecenos formam um grupo de mais de 50 compostos relacionados e que têm como núcleo químico básico os 12,13-epoxitricotecenos. Dentre estas substâncias, ressaltamos a T-2 toxina, diacetoxiscirpenol (DAS), neosolaniol, nivalenol, diacetilnivalenol e DON (NELSON; TOUSSOUN; MARASSAS, 1983).

TABELA 3: Potencial toxígeno das principais espécies de *Fusarium* que contaminam produtos vegetais.

Micotoxinas	Espécies de <i>Fusarium</i>	Substrato
Tricotecenos (DON, T-2, DAS, etc)	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Milho, trigo, cevada
Zearalenona	<i>F. graminearum</i>	Milho, trigo, cevada
Fumonisina	<i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i>	Milho

Fonte: Adaptado de Bhatnagar et al., (2003).

2.8- Micotoxinas e micotoxicoses: características gerais

As micotoxinas conferem aos fungos uma vantagem competitiva sobre outros fungos e bactérias presentes no ambiente. Quase todas são citotóxicas, resultando na ruptura de membranas celulares e outras estruturas, ou interferindo em processos vitais como síntese protéica, de RNA ou DNA, imunossupressão, quadros nervosos e hemorrágicos, diminuição da eficiência produtiva e reprodutiva, deficiências metabólicas e bioquímicas, gastroenterites, enfermidades autoimunes, deficiências em vitaminas e/ou minerais, alterações genéticas, teratogênicas, carcinogênicas, incluso a morte em alguns casos (CAST, 2003; HUSSEIN; BRASEL, 2001). As micotoxinas podem estar presentes em alimentos processados a partir de produtos contaminados, podendo também ser metabolizadas pelo animal, e ocorrer na carne, em ovos e no leite. São compostos orgânicos de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários tóxicos por várias espécies de diferentes gêneros fúngicos, com estruturas químicas variada. Chegando a ter 100 vezes mais potencial carcinogênico relativo do que as outras categorias de substâncias encontradas em dietas como as sintéticas (pesticidas e aditivos), os condimentos e compostos formados durante o cozimento de alimentos (aminas heterocíclicas, benzopirenos e etc..) (MILLER, 1996).

A contaminação por micotoxinas geralmente ocorre em baixas concentrações nos cereais, exceto em situações particulares, onde o problema é decorrente da safra devido a chuvas, dificuldades com a colheita e armazenagem subsequente, quando então, podem ser observados níveis elevados. Assim, casos de micotoxicose aguda com sintomatologia e alterações anatomopatológicas evidentes, são menos freqüentes, predominando os efeitos crônicos, menos perceptíveis. Estes, entretanto, por serem mais numerosos, determinam incalculáveis prejuízos à saúde animal com repercussão na economia agropecuária, bem como também prejuízos a saúde humana (RINALDI, 1983; CAST, 2003; ROSA et al., 2002; DILKIN; MALLMANN, 2004; MORGAVI; RILEY, 2007).

2.8.1- Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A AFB₁ é a micotoxina mais freqüente e mais tóxica, sendo reconhecida como o mais potente hepatocarcinógeno de origem biológica para o homem e os animais (IARC, 1993). Estas toxinas são encontradas como contaminantes naturais de cereais e rações e mesmo em baixas concentrações produzem alterações sobre o metabolismo, provocando danos à saúde e a produtividade do animal. Os efeitos mais freqüentemente observados pela ingestão desta toxina são a diminuição da velocidade de crescimento e da eficiência alimentar, causados pela redução do metabolismo protéico e absorção de gorduras e a supressão da resposta imune (IARC, 1993).

Produtos de origem animal também podem apresentar teores residuais de AFs biotransformadas através do sistema misto oxidase hepático do animal que as ingeriu, tais como a aflatoxina M₁ (AFM₁), o aflatoxicol (AFL), a aflatoxina B₂ (AFB₂), além da própria AFB₁. Estas substâncias têm sido detectadas em leite e derivados; ovos e derivados; fígado, músculo e derivados cárneos (PEREIRA, 2005).

As AFs atuam no DNA levando à morte celular ou sua transformação em tumor. Devido à transferência da aflatoxina para o leite (transferência de até 6,7% de AFB₁ da dieta para AFM₁ no leite) (PEREIRA, 2005), a maioria dos países regulamentou limites legais máximos de AFB₁ na dieta de ruminantes. A legislação brasileira (MAPA, 1988) admite um nível de contaminação máximo por aflatoxinas totais equivalente a 50 µg.Kg⁻¹; válido para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente em rações destinadas ao consumo animal. Porém o limite estabelecido pela comunidade europeia para rações animais é de 20 µg.Kg⁻¹ (GMP, 2008), menos da metade limite praticado em nosso país.

2.8.2- Fumonisinias e Deoxinivalenol

Diversas micotoxinas de *Fusarium* podem co-ocorrer em um ingrediente particular ou em rações comerciais. Em geral, combinações de toxinas deste gênero resultam em efeitos aditivos; interações de sinergismo e/ou potencialização e representam grande preocupação para a saúde e produtividade dos animais domésticos (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999). Estudo realizado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* mostrava que apenas 6 países no mundo inteiro já haviam fixado seus valores limites para fumonisinias (FAO, 2005). Nessa mesma publicação, os limites aceitos de DON pela União Européia em produtos para alimentação animal (de origem vegetal) é e 1 µg g⁻¹. Sendo que no Brasil não há regulamentação específica até o momento com relação aos limites máximos admissíveis para estas classes de micotoxinas.

Encontradas em várias culturas estas micotoxinas entram na cadeia produtiva através de ingredientes contaminados. Podem entrar nas dietas de ruminantes através dos concentrados ou forragens e são parcialmente metabolizados no rúmen. A FB₁, a mais prevalente das fumonisinias pode ser metabolizada no rúmen de forma bastante lenta e baixa; apesar disso, não parece afetar o metabolismo ruminal. Nos ruminantes os órgãos alvo são o fígado e os rins, sendo produzida principalmente pelo *F. verticillioides*.

O deoxinivalenol também será metabolizada no rúmen, no entanto afeta o metabolismo digestivo do bovino, promovendo êmese e posteriormente perda do apetite, gerando perda de peso pelo animal, diminuindo sua capacidade produtiva, esta toxina é

principalmente produzida pelo *F. graminearum*. A literatura cita que os bovinos de corte e ovinos são mais tolerantes a FB₁ e DON do que os bovinos leiteiros, tendo como efeitos associados mais comuns: redução do consumo de alimentos, ganho de peso, produção de leite, promovendo diarreia, êmese e em casos mais graves chegando a gastroenterites e lesões intestinais. (SASSAHARA; YANAKA; NETTO, 2003; MANSFIELD et al., 2005).

2.8.3- Ocratoxinas

As ocratoxinas são importantes toxinas de armazenamento. Presentes em regiões de clima temperado bem como tropical. A OTA é a mais importante das ocratoxinas sendo produzida por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, principalmente por *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. niger* agregados e *A. carbonarius* (MAGNOLI et al., 2005). O efeito primário da OTA em todas as espécies animais é a nefrotoxicidade, mas também relatam-se teratogênese, carcinogênese, imunossupressão. Tem sido demonstrado que a OTA afeta os ruminantes, porém ela pode ser rapidamente degradada em um rúmen com bom funcionamento, gerando consequências menos graves do que outras micotoxinas. Entretanto, níveis elevados de OTA podem prejudicar o funcionamento do rúmen pela degradação dos microrganismos presentes no suco ruminal (ROSA et al., 1985; CRUZ et al., 1985).

2.8.4 - Citrinina

É uma importante micotoxina nefrotóxica para o homem, bovinos, eqüinos, cães, e principalmente para suínos e aves. Produzida por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, destacando-se entre estes, o *A. niveus*, *A. terreus*, *P. citrinum*, *P. verrucosum* e *P. viridicatum*. (ROSA et al., 1985; CRUZ, 1997). De forma semelhante à OTA, temos que a citrinina tem degradação no rúmen dos bovinos, tendo um grande percentual de inativação desta toxina por esta espécie (ELLING; MOLLER, 1973).

2.9 - Métodos de detecção das micotoxinas

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método de análise cromatográfico utilizado para a detecção e quantificação de micotoxinas. Sendo especialmente empregado por ser um método econômico, rápido e prático para a análise de um número elevado de amostras, pois possibilita a multidetecção de toxinas. A desvantagem desta técnica é o seu limite de detecção, pois este método não permite demonstrar níveis baixos de toxinas (VAN EGMOND, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a metodologia adotada como oficial para análise de várias micotoxinas. Houve um incremento notável no grau de precisão das análises quando comparados aos resultados obtidos através de CCD, porém, com o aumento significativo dos custos e tempo das mesmas. Devendo-se isso as concentrações mínimas detectáveis, que em geral são bem baixas utilizando tal técnica cromatográfica (TRUCKSESS, 2006).

Métodos imunológicos também são comumente utilizados, devido à sua sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade e baixo custo. Estes se utilizam de anticorpos específicos para isolar e/ou detectar as micotoxinas nos alimentos (VAN EGMOND, 1991). A interação entre antígenos (toxinas fúngicas) e anticorpos específicos são a base destes métodos imunológicos. Entre os métodos imunológicos utilizados na dosagem das

micotoxinas os mais utilizados são o ELISA, sigla utilizada para denominar o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, aprovado como um método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para triagem de aflatoxinas, RIA (*Radio Imuno Assay*) ou radio-imunoensaio e IAC (*Imuno Assay Colum*) ou colunas de imunoafinidade.

O ELISA tornou-se um dos métodos oficiais de análises para micotoxinas, uma vez que permite a detecção com limites de quantificação mais baixos, é de mais fácil e rápida aplicação e, portanto mais econômico. A IAC tornou-se um método eficiente de triagem, já que as colunas contêm anticorpos seletivos imobilizados, assim o procedimento para o pré-tratamento da amostra total foi reduzido a uma única extração em fase sólida constituindo-se em método extremamente sensível e adequado a detecção de micotoxinas, principalmente em líquidos, fluidos e tecidos biológicos (MORTIMER et al., 1987).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Amostragem

Coletou-se um total de 232 amostras de silagens de milho, amostradas de um total de 58 silos de milho no período de junho 2007 a outubro 2007 e fevereiro 2008 a maio 2008. Estes silos estavam localizados em fazendas criadoras de gado de corte nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro; sendo avaliado o milho pré e pós-fermentado.

A coleta das amostras pré-fermentadas foi realizada após o a compactação, ou seja, logo após o material ser moído e compactado, antes do fechamento dos silos. Já as amostras de material pós-fermentado foram coletadas após o período de fermentação dos silos (± 90 dias); após a abertura dos silos, uma pá mecânica retira a porção oferecida aos bovinos, sendo nesse momento, em que a estrutura começa a ser rompida que foram retiradas as alíquotas.

As dimensões totais dos silos foram de aproximadamente 15 metros (m) de comprimento por 15 m de largura por 6 m de altura. Para garantir uma amostragem correta desse material, cada silo sofreu uma divisão linear imaginária em seu comprimento em 3 partes iguais; de cada uma destas partes foram coletadas alíquotas (500g) das camadas superior (CS), inferior (CI), laterais (CL) e central (CC), que estavam equidistantes cerca de 1,5 m uma das outras, em largura e altura (Figuras 3 e 4). Assim, foram coletados seis pontos por silo, totalizando três kilogramas de alíquotas por camada, as quais foram homogeneizadas e quarteadas sucessivamente para então ser retirada uma amostra única de cada camada, de cada silo. As camadas laterais (esquerda e direita) sofreram um único processo de homogeneização, sendo recolhida uma única amostra.

Todas as amostras foram acondicionadas em sacos tipo ziplock e imediatamente enviadas aos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As amostras foram imediatamente processadas para as análises físicas e micológicas e mantidas sob refrigeração a 4°C até o momento das análises micotoxicológicas.

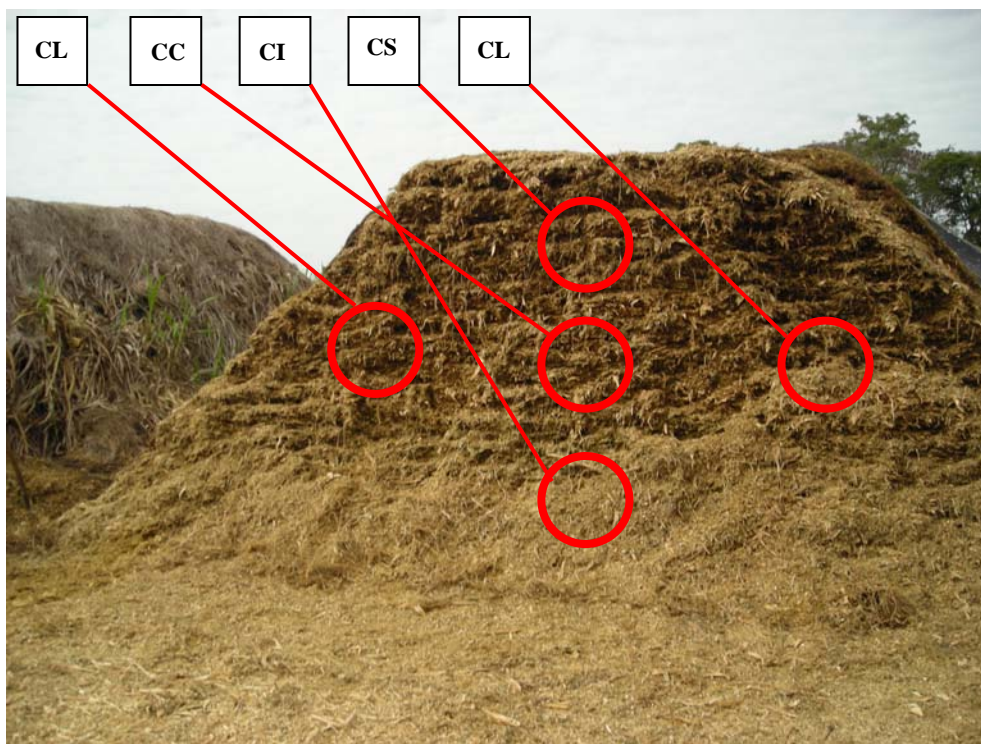


FIGURA 3: Vista frontal do silo, após período de fermentação de ± 90 dias. Esquema dos pontos de coleta nos silos.

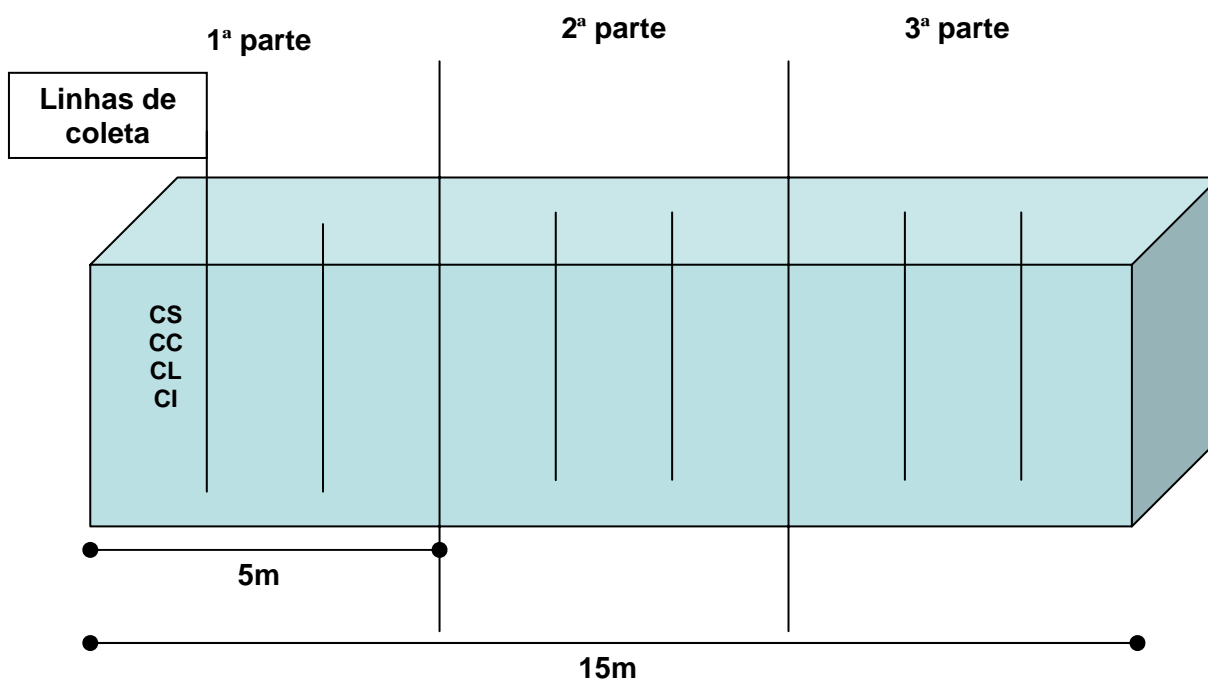


FIGURA 4: Esquema divisão linear dos silos com linhas de coletas.

3.2- Avaliação física das amostras

Foi realizada uma avaliação física laboratorial das amostras: percentual de matéria seca, atividade de água (A_a), e pH.

3.2.1- Percentual de matéria seca

Foram levados 100 gramas de amostra para uma estufa com circulação de ar, onde este material passou por um processo de secagem por 72 hs a 65°C. Após esse período, com o resultado obtido, foi calculada a diferença entre os pesos, percentualmente (OHYAMA; MASAKI; HARA, 1975).

3.2.2- Atividade de água (A_a) e pH

Para a determinação da atividade de água (A_a) foi utilizado o equipamento AquaLab® modelo CX 2 (*Decagon, Devices, Inc. USA*), com o procedimento descrito a seguir. Primeiramente o aparelho foi ligado por cerca de 1 hora, para a estabilização da temperatura. A calibração foi feita através da utilização de uma solução de NaCl 6M, de atividade de água 0,760 e água destilada, cuja a atividade de água é igual a 1. Cada amostra foi colocada em um recipiente próprio, preenchendo cerca de 1/3 de sua capacidade, sendo efetuadas duas leituras. Calculando-se a média aritmética das leituras, foi obtida a atividade de água das amostras.

A avaliação do pH foi realizada adicionando água destilada em um Becker até que toda amostra de milho pré e pós-fermentado presente fosse coberta. Foram adicionados em torno de 30 gramas de amostra em cada Becker, deixando-os em contato com a água por 30 minutos. Após esse período foi realizada a aferição com fitas de teste de pH modelo Merck^{co} (*Merck KGa, Germany*) (OHYAMA; MASAKI; HARA, 1975).

3.3- Dados climatológicos e localização geográfica

Foram obtidos os seguintes dados climatológicos: temperaturas médias, umidade relativa média (%) e pluviosidade média (mm), através de boletins mensais do Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos / Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE). As cidades escolhidas para amostragem são importantes pólos da bovinocultura brasileira. No Estado de São Paulo temos as cidades de Marília (-22° 12' 50"; 49° 56' 45"), Vera Cruz (-22° 13' 11"; 49° 49' 10") e Ourinhos (-22° 58' 44"; 49° 52' 14"), e no Estado do Rio de Janeiro, a cidade de Miguel Pereira (-20° 12' 11"; 47° 47' 10").

3.4- Determinação da Micobiota

A enumeração quantitativa de fungos filamentosos em unidades formadoras de colônias por grama de alimento (ufc g⁻¹) foi realizada segundo a metodologia de diluição decimal seriada em placas descrita por Pitt; Hocking (1997), conforme a seguir: Agitou-se 10 gramas da amostra em 90 mL de água peptonada 0,1% estéril. A partir desta diluição inicial (10⁻¹) prepararam-se diluições decimais seriadas até 10⁻⁴. Inoculou-se (em triplicata) alíquotas de 0,1 mL de cada uma das diluições em três meios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (PITT; HOCKING, 1997); agar dicloran glicerol a 18% (DG18)

(HOCKING; PITT, 1980) e o Nash Snyder agar (NSA) (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983) (Figura 3). As placas foram incubadas a 25° C por cinco a sete dias em estufas microbiológicas com controle eletrônico de temperatura. Todas as placas foram observadas diariamente, selecionando-se para enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 ufc g⁻¹.

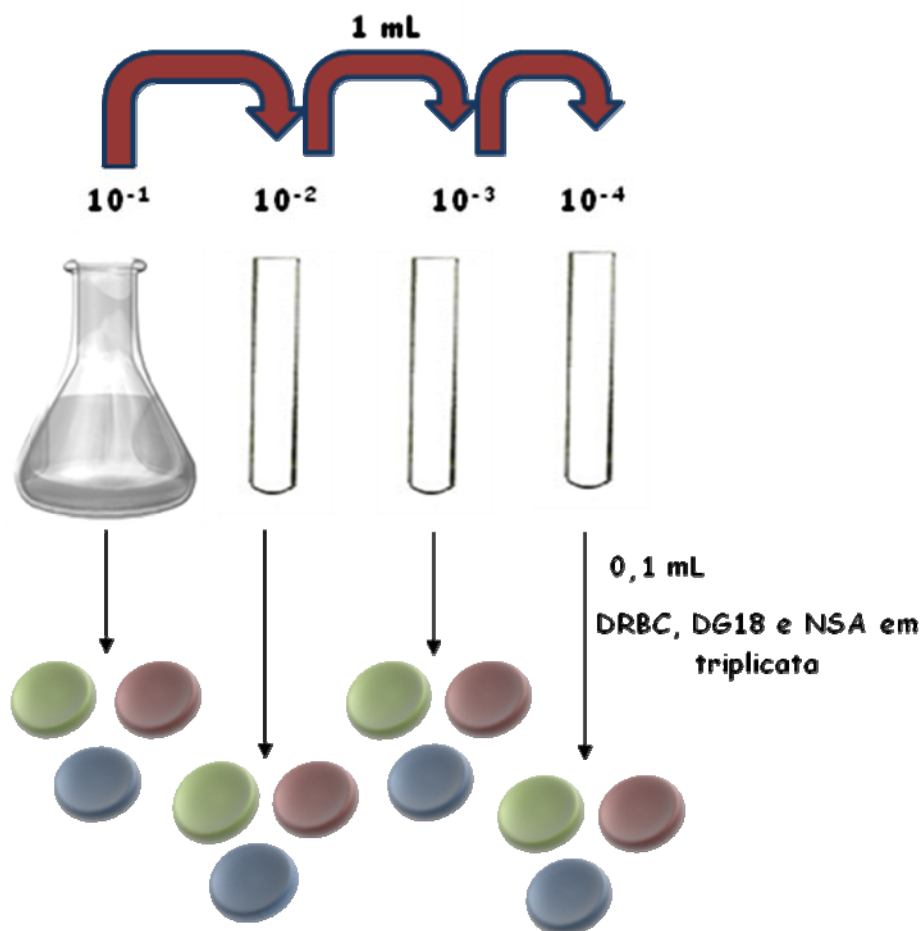


FIGURA 5: Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (ufc g⁻¹). **Fonte:** Adaptado de Rosa (2002).

3.5 Isolamento e identificação fúngica

A identificação, em nível de gênero, de todas as colônias consideradas como diferentes foram realizadas segundo Samson et al. (2000), de acordo com suas características macro e microscópicas. As colônias fúngicas identificadas como *Aspergillus* e *Penicillium* foram sub-cultivadas em tubos inclinados MEA e as de *Fusarium* utilizaram agar folha de bananeira (BLA) para a posterior identificação em espécies.

As cepas de fungos isoladas foram então identificadas segundo as chaves taxonômicas apropriadas de cada grupo particular: Klich (2002) para o gênero *Aspergillus*, Pitt (1988) para o gênero *Penicillium* e Nelson; Toussoun; Marasas (1983), com modificações, para espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.

A classificação de *Aspergillus* spp. foi baseada na semeadura padrão em três meios básicos (Figura 6): CYA; CY20S e MEA. Foi preparada uma suspensão de conídios a partir de cada cepa, em 0,5 mL de meio agar semi-sólido (0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em microtubos, esterilização por autoclavagem a 120°C por 15 minutos). A seguir, introduziu-se uma alça de platina em forma de agulha na suspensão de conídios inoculando-a nos meios de cultivo.

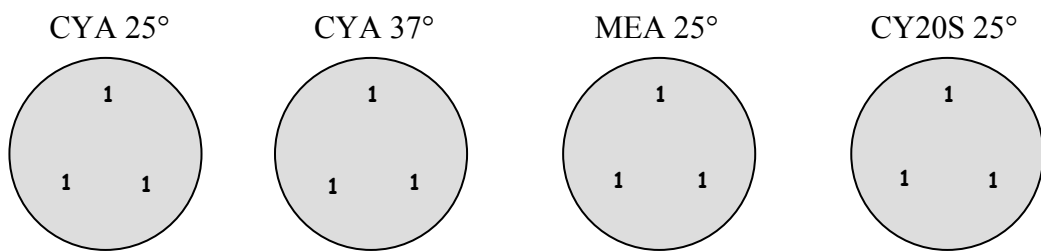


FIGURA 6: Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas. **Fonte:** Adaptado de Klich (2002)

A chave proposta para *Penicillium* spp., foi baseada na semeadura em três meios básicos como: CYA; MEA e G25N (Figura 7); para maior eficiência e aproveitamento do sistema, inoculou-se as placas de Petri com duas cepas diferentes a serem testadas; a preparação do inóculo e inoculação nos meios de cultivo foi igual a utilizada para *Aspergillus* spp..

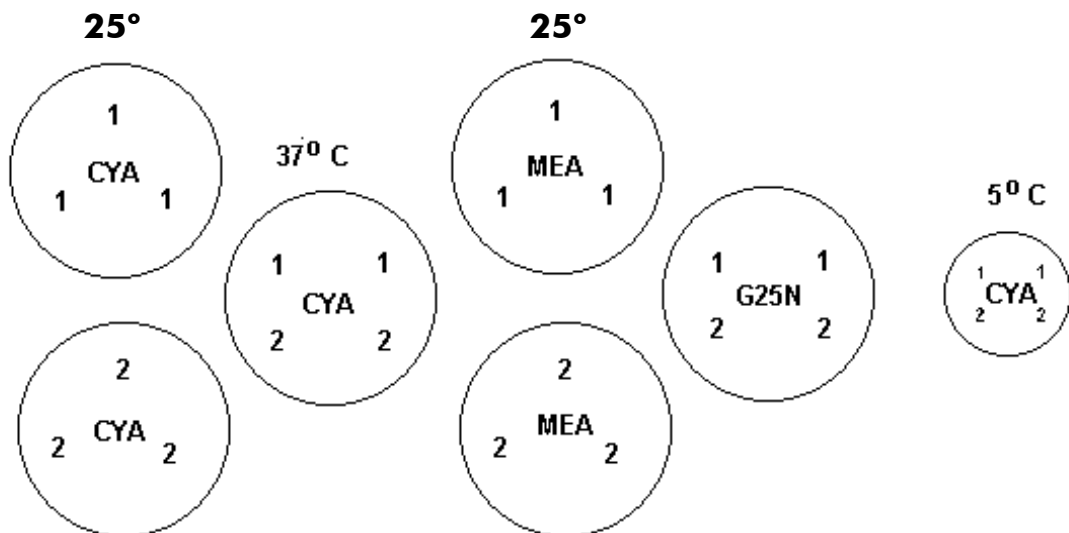


FIGURA 7: Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C). **Fonte:** PITT (1988).

As colônias de *Fusarium* spp. foram semeadas após cultivo monospórico nos meios BLA, modificando a metodologia original que utiliza o meio agar folhas de cravo (CLA) e no meio, em tubo inclinado, agar batata dextrose (BDA). As colônias foram incubadas por 7 dias a 24°C obedecendo foto período de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra (Figura 8), segundo metodologia descrita por Nelson; Toussoun; Marasas, (1983).

O cultivo monospórico consiste em recolher pequena quantidade de micélio da colônia sub-cultivada e agitá-lo em tubo com cerca de 10 mL de água destilada estéril. O conteúdo é então vertido sobre placa contendo agar água a 2% e homogeneizado em movimentos em forma de “8” sobre a bancada. O sobrenadante é descartado e a placa é incubada a temperatura ambiente inclinada em ângulo aproximado de 45°. Após período aproximado de 12 horas, as placas são examinadas através de lupa em busca de conídios germinados isolados. Um único conídio por vez é então recortado e transferido para os meios indicados (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983).

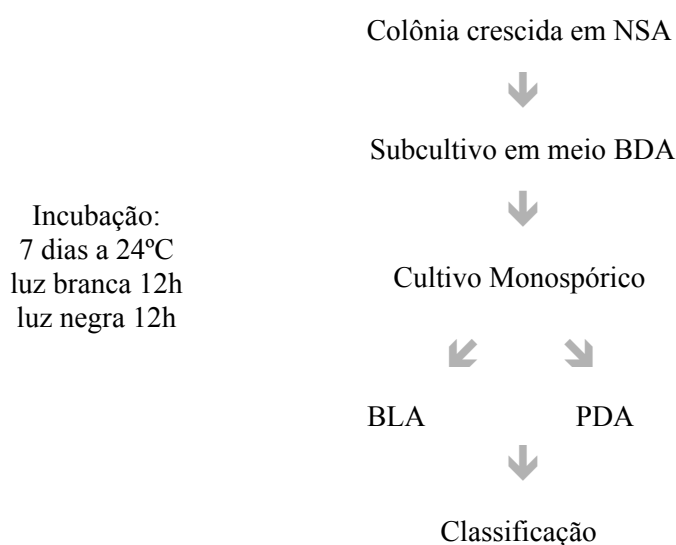


FIGURA 8: Esquema de incubação das cepas do gênero *Fusarium* nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final. **Fonte:** Adaptado de Nelson; Toussoun; Marasas (1983).

3.6- Caracterização do perfil toxígeno das espécies

As cepas fúngicas identificadas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CYA, agar extrato de levedura sacarose (YES) e agar leite de coco (CAM).

3.6.1- Perfil toxígeno de fungos produtores de OTA

As cepas de fungos produtores de OTA (*A. carbonarius*, *A. niger* agregados e *A. ochraceus*) foram primeiramente analisadas quanto à presença de fluorescência em YES, em placas de Petri de 90 mm. As placas foram examinadas no sexto e sétimo dias em Cromatovisor Prodicil^{MR} equipado com lâmpada de radiação ultravioleta de 30 watts com comprimento de onda de 365 nm, quando foi verificada ou não a presença de halo de fluorescência característica no meio, ao redor da colônia (LIN; DIANESE, 1976). No décimo dia foram retirados 3 plugs de 5 mm de diâmetro de cada colônia e acondicionados em

microtubos com 1 mL de clorofórmio previamente filtrado, os quais foram centrifugados a 4000 rpm. A fase clorofórmica foi então recolhida e evaporada para posterior análise quantitativa por CLAE, tendo sido estes então, ressuspensos na fase móvel acetonitrila: água: ácido acético (57: 41: 2 v/v).

3.6.2- Perfil toxígeno de fungos produtores de citrinina

As cepas de *P. citrinum* isoladas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CAM, em placas de Petri de 90 mm (ROSA, 1985, CRUZ, 1992). Da mesma forma as placas foram incubadas à temperatura de 25°C por sete dias, sendo examinadas no sexto e sétimo dias de incubação, em Cromatovisor Prodicil^{MR}, quanto a presença ou não de halo de fluorescência no meio. Após a verificação de fluorescência, todas as placas, tanto as de colônias positivas bem como as negativas, tiveram seu conteúdo completamente coletado e triturado em gral e pistilo juntamente com 30 mL de clorofórmio para a extração da toxina. O macerado foi filtrado obtendo-se o extrato clorofórmico que a seguir foi concentrado, a um volume final de aproximadamente 1 mL, em rotavapor (PEMEM BM-102-ER) acoplado com banho-maria a 40°C. Os extratos foram testados qualitativamente através de CCD para confirmação dos resultados obtidos por CAM. Foram empregadas placas de 20x20 cm de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura (G60 Merck, sem indicador de fluorescência). Estas placas foram previamente ativadas por 60 minutos em temperatura de 130°C. Foram aplicados 5 µL de cada extrato e dos padrões em pontos equidistantes. Após o desenvolvimento por 50 minutos em cuba cromatográfica saturada, contendo fase móvel tolueno: clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (70: 50: 50: 10 v/v). A cromatoplaça foi observada em cromatovisor sob radiação UV de $\lambda=365\text{nm}$, para evidenciação das manchas fluorescentes características.

3.6.3- Perfil toxígeno de fungos produtores de AFs

Para provar a capacidade de produzir aflatoxinas (AFs) pelas espécies de *Aspergillus* da seção Flavi foi utilizada a metodologia descrita por Geisen (1996). Primeiramente estas cepas foram analisadas quanto à presença de fluorescência por cultivo em CAM, em placas de Petri de 90 mm. As placas foram examinadas no sexto e sétimo dias em Cromatovisor Prodicil^{MR} equipado com lâmpada de radiação ultravioleta de 30 watts com comprimento de onda de 365 nm, quando foi verificada ou não a presença de halo de fluorescência característica no meio, ao redor da colônia (LIN; DIANESE, 1976). Cada cepa foi também inoculada sobre MEA a 28 °C durante 7 dias. O micélio foi transferido para um microtubo, pesado previamente e a extração das AFs foi realizada com 500µL de clorofórmio. Sendo o extrato clorofórmico evaporado, posteriormente resuspenso em clorofórmio e analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) (G60 Merck, sem indicador de fluorescência). Como fase móvel se utilizou clorofórmio: acetona (9:1). A detecção das aflatoxinas foi realizada por comparação visual com soluções padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em luz UV de comprimento de onda de 365 nm.

3.6.4- Perfil toxígeno de fungos produtores de gliotoxina

Para provar a capacidade das cepas de *A. fumigatus* inoculou-se em dois meios de cultivo. Em CAM, para observação de fluorescência com metodologia no item anterior (LIN; DIANESE, 1976) e a técnica descrita por Santos et al. (2002), que foi utilizada para

quantificação; onde um plug de uma colônia de *A. fumigatus* previamente desenvolvida em MEA durante 7 dias foi incubado em caldo YES por 2 dias a 37°C com movimento de 1400 rpm. Após esse período o caldo foi filtrado em papel filtro tipo Whatman N° 1. O filtrado ficou em agitação com 50 mL de clorofórmio por 10 minutos e a fração clorofórmica separada e evaporada. O extrato foi ressuscitado em 200 µL de metanol e acondicionado em freezer até o uso. Os extratos foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F254 (20 x 20 cm, 250 µm, (Merck, Germany). A fase móvel utilizada foi clorofórmio:metanol (98:2 v/v).

3.7- Detecção e quantificação de micotoxinas

3.7.1- Detecção e quantificação de AFs e OTA

Para AFs e OTA, utilizou-se a metodologia de extração de micotoxinas proposta por Soares; Rodriguez-Amaya (1989). O extrato clorofórmico obtido foi evaporado até secura, sendo acondicionado em frasco âmbar, e armazenado em freezer até a etapa de purificação. Para avaliação qualitativa foram realizadas cromatografias em camada delgada (CCD) e para quantificação cromatografia líquida de alta eficiência. (CLAE).

Para purificação dos extratos foram utilizadas colunas de imunoafinidade desenvolvidas e produzidas pela *Beacon Analytical Systems Inc.* (Portland, Maine – EUA). O extratos secos foram ressuscitados em 1 mL de clorofórmio e seu volume foi totalmente passado pelas colunas em uma taxa de 1 gota por segundo. A seguir, as colunas foram lavadas com 2 mL de água e eluídas com 1 mL de metanol. O extrato eluído foi recolhido, evaporado e acondicionado em novo frasco e posteriormente submetido à CLAE. Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters Associates®, Inc., Miliford, M.A. - EUA) equipado com uma bomba Waters (modelo 510) de sistema isocrático, injetor Rheodyne (Rheodyne®, Cotati, California – EUA) com *loop* de 20 µl, detector Merck-Hitachi UV-VIS L-4250 ajustado para comprimento de onda de 350 nm e integrador Merck Hitachi D-2500. As separações foram desenvolvidas em coluna de sílica (VARIAM™, Walnut Creek, CA – EUA) de 150 x 4,6 mm i.d., de partícula com 5 µ de diâmetro. Os padrões de AFs (Sigma Co, St. Louis - EUA), foram calibrados segundo a metodologia descrita no manual de métodos oficiais de análises da HELRICH (1990a, 1990b, 1995a, 1995b). Depois de diluídos e quantificados por espectrofotômetro Shimadzu mod. 2001 (Shimadzu Co.®, Kyoto, Japão), os padrões foram armazenados em frascos âmbar e mantidos em freezer a -18°C. Foram feitas diluições seriadas dos padrões e análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência para se obter a curva de calibração, de onde foram extraídos os limites de detecção e de quantificação da técnica.

Para detecção de OTA foi utilizado um cromatógrafo com detector por fluorescência, Hewlett Packard Serie 1100, equipado com uma bomba Waters (modelo 510) de sistema isocrático, injetor Rheodyne (Rheodyne®, Cotati, California – EUA) com *loop* de 20 µL seguindo a metodologia proposta por Scudamore et al. (1998).

3.7.2- Detecção e quantificação de fumonisina B₁ e deoxinivalenol

Foram utilizados *kits* comerciais desenvolvidos e produzidos pela *Beacon Analytical Systems Inc.* (Portland, Maine – EUA). Os *kits* Beacon em placa e tubos utilizam o método de ELISA competitivo indireto para análise quantitativa das micotoxinas.

A toxina foi extraída da amostra conforme as instruções do fabricante para cada tipo de micotoxina (BEACON, 2003a; BEACON, 2003b). O extrato obtido foi filtrado e depois testado através do imunoenensaio. O conjugado micotoxina-HRP-enzima foi pipetado nos poços ou tubos, seguido dos calibradores ou extratos de amostras. Em seguida, pipetou-se a solução de anticorpo anti-micotoxina para iniciar a reação. Durante um período de incubação de 10 minutos a toxina na amostra compete com o conjugado micotoxina-HRP-enzima por um número limitado de anticorpos antitoxina que por sua vez se ligarão aos anticorpos secundários que estão imobilizados no interior dos poços ou tubos.

Passado o período de incubação, o conteúdo dos poços ou tubos, foram descartados e os mesmos foram lavados para remoção de qualquer conjugado ou toxina que não tenha se ligado ao anticorpo. Um substrato foi adicionado nos poços e qualquer conjugado micotoxina-HRP-enzima ligado aos anticorpos converteu a solução à cor azul. Seguindo uma incubação de 10 minutos, a reação foi interrompida e a intensidade da cor de cada poço ou tubo foi lida. As amostras de cores desconhecidas foram comparadas com as cores dos calibradores e a concentração de toxina das amostras foi obtida.

Resultados semi-quantitativos foram obtidos por simples comparação das absorvâncias das amostras com a dos calibradores. Amostras que continham cores mais claras que a do calibrador tiveram uma concentração de toxina maior. Amostras que continham cores mais escuras tiveram uma concentração menor que a do calibrador. Uma interpretação quantitativa requereu um gráfico das absorvâncias dos calibradores (eixo X) vezes o logaritmo da concentração dos mesmos (eixo Y). Uma linha reta foi traçada através dos pontos dos calibradores e as absorvâncias das amostras foram inseridas nesta linha. O ponto correspondente do eixo Y foi à concentração da amostra em questão.

Os calibradores (padrões) de DON utilizados no *kit* corresponderam a 0, 0,2, 1, 2 e 8 $\mu\text{g/L}$ (ppm), e para FB_s foram 0, 0,3, 1, 3 e 6 $\mu\text{g/L}$ (ppm).

3.8- Análises Estatísticas

As análises dos dados foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Todos os dados foram transformados usando a função logarítmica $\log_{10}(x + 1)$ antes da ANOVA. O teste de Duncan foi utilizado na comparação dos dados de enumeração fúngica nos diferentes meios de cultivo, e o teste LSD de Fisher foi o escolhido para a comparação dos dados de quantificação das micotoxinas e avaliações físicas. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (*SAS Institute, Cary, NC*).

4- RESULTADOS

4.1- Avaliação física das amostras, dados climatológicos e localização geográfica

4.1.1- Avaliação física das amostras

Foram avaliados, à semelhança da bibliografia consultada, os parâmetros de pH, matéria seca das amostras e Aa. Os resultados estão expostos nas tabelas 4 e 5 separados por milho pré e pós-fermentado.

TABELA 4: Características físicas do milho pré-fermentado nas diferentes camadas de amostragem do silo.

Camada de Amostragem	pH	A _a	Matéria Seca (%)
	Média ± S	Média ± S	Média ± S
CS	5,0 ± 0,81	0,732 ± 0,21	38 ± 0,12
CC	6,0 ± 0,46	0,730 ± 0,09	40 ± 0,10
CI	5,0 ± 0,78	0,739 ± 0,19	38 ± 0,07
CL	5,0 ± 0,73	0,714 ± 0,09	42 ± 0,12

S: desvio padrão; a_a: atividade de água;

TABELA 5: Características físicas do milho pós-fermentado nas diferentes camadas de amostragem do silo.

Camada de Amostragem	pH	A _a	Matéria Seca (%)
	Média ± S	Média ± S	Média ± S
CS	4,5 ± 0,93	0,732 ± 0,21	38 ± 0,12
CC	4,0 ± 0,95	0,730 ± 0,09	40 ± 0,10
CI	4,0 ± 1,62	0,739 ± 0,19	38 ± 0,07
CL	4,0 ± 1,74	0,714 ± 0,09	42 ± 0,12

S: desvio padrão; a_a: atividade de água;

Os valores encontrados no estudo foram o de pH variando de 4,2 a 6,5, atividade aquosa variando de 0,624 a 0,929 e matéria seca entre 38 e 42%.

A figura 9 mostra as condições do material pré-fermentado, e as figuras 10 e 11 do pós-fermentado. Não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre as avaliações físicas do milho pré ou pós-fermentado, bem como entre as camadas dos silos amostrados.

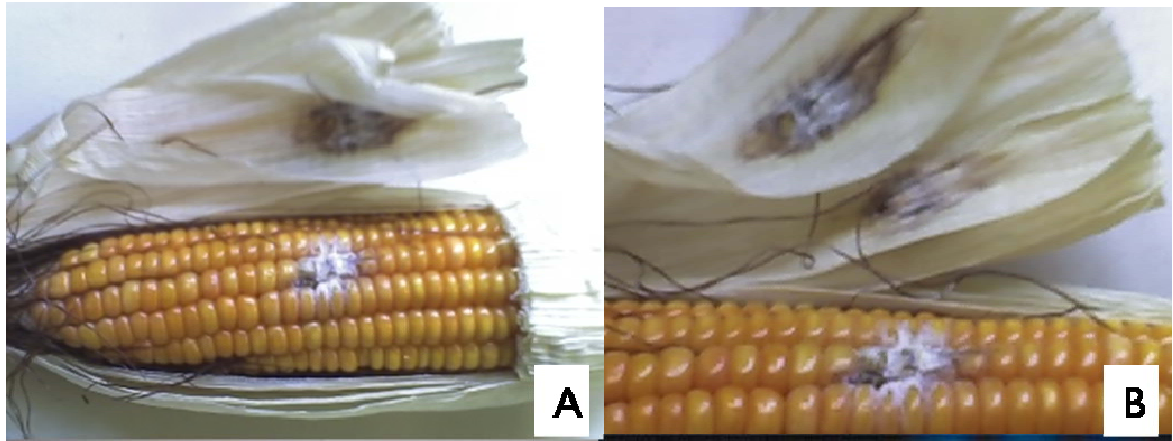


FIGURA 9: Avaliação das condições do milho pré-fermentado. A e B - crescimento de micélio fúngico na superfície da espiga.



FIGURA 10: Avaliação das condições do milho pós-fermentado. Crescimento de micélio em uma grande área do interior do silo.



FIGURA 11: Avaliação das condições do milho pós-fermentado. Acúmulo de umidade em vários pontos da superfície do silo, onde as setas indicam estes pontos.

4.1.2- Dados climatológicos e localização geográfica

A figura 12 abaixo mostra variação sazonal dos valores médios de temperatura, umidade relativa e pluviosidade aferidos durante o período de junho 2007 a outubro 2007 e fevereiro 2008 a maio 2008.

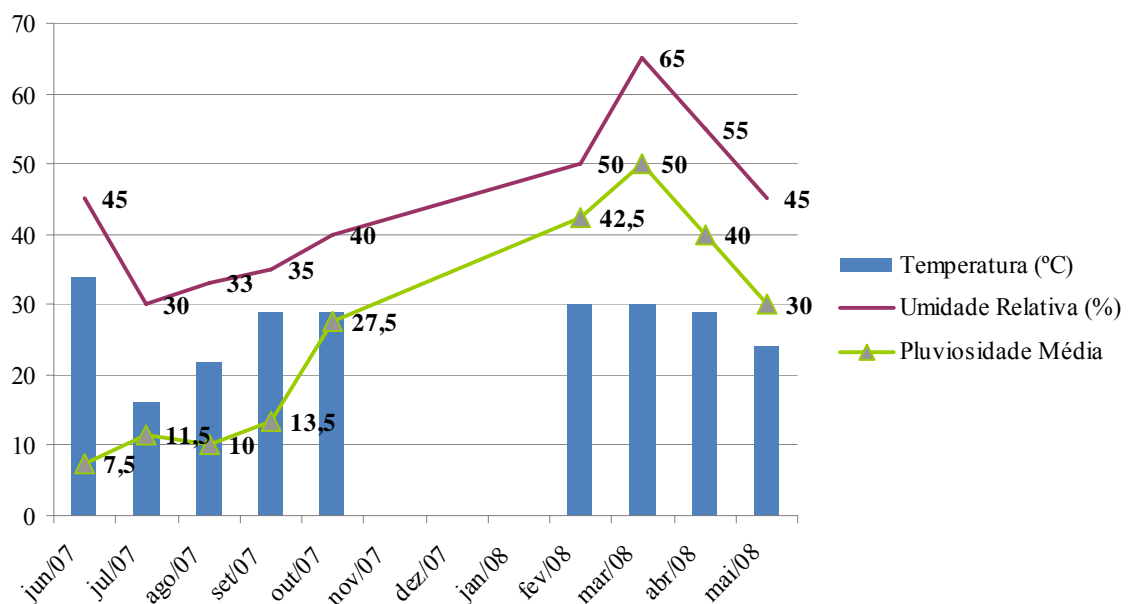


FIGURA 12: Temperaturas, umidades relativas e pluviosidades médias durante o período

4.2- Contaminação fúngica

A carga fúngica contaminante feita através da enumeração dos propágulos fúngicos e expressa por unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada (ufc g⁻¹) estão apresentadas na tabela 6, separadas segundo o tipo de substrato pré e pós-fermentado.

Como o limite de detecção da técnica é de 10² ufc.g⁻¹, não foi possível expressar nas tabelas as contagens no meio de cultivo NSA, pois diversas amostras estiveram abaixo deste limite. O meio NSA é seletivo para fungos do gênero *Fusarium* (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983). Percebeu-se neste estudo que contagens desse gênero fúngico foram reduzidas, principalmente no milho pós-fermentado, onde apenas 8% das amostras estiveram contaminadas e suas contagens ficaram entre ≤ 1.0 x 10² - 2.0 x 10² ufc.g⁻¹. No milho pré-fermentado tivemos 20% das amostras contaminadas, mas com pouca variabilidade de espécies. Os valores de contagem também ficaram entre ≤ 1.0 x 10² - 2.0 x 10² ufc.g⁻¹.

Foi observada diferença significativa entre as contagens do milho pré-fermentado e pós-fermentado, aumentando seus valores de acordo com o processo de fermentação.

TABELA 6: Contagem fúngica do milho pré e pós-fermentado em diferentes meios de cultivo.

Tipo de Alimento	Contagem de propágulos fúngicos (ufc g ⁻¹) ^{AB}	
	Meios de Cultivo	
	DRBC	DG18
Pré-fermentado - CS	3,8 x 10 ³ ± 4,0 x 10 ³ ac (1,3 x 10 ² a 1,5 x 10 ⁴)	2,5 x 10 ³ ± 2,9 x 10 ³ (1,0 x 10 ² a 1,4 x 10 ⁴)
Pré-fermentado - CI	3,3 x 10 ³ ± 6,6 x 10 ³ ad (1,3 x 10 ² a 3,2 x 10 ⁴)	4,2 x 10 ⁴ ± 1,0 x 10 ⁵ (1,2 x 10 ² a 4,3 x 10 ⁵)
Pré-fermentado - CL	4,1 x 10 ³ ± 5,5 x 10 ³ acd (1,3 x 10 ² a 3,1 x 10 ⁴)	2,1 x 10 ³ ± 4,1 x 10 ³ (1,0 x 10 ² a 2,1 x 10 ⁴)
Pré-fermentado - CC	5,7 x 10 ³ ± 8,5 x 10 ³ ac (1,0 x 10 ² a 3,0 x 10 ⁴)	3,9 x 10 ³ ± 7,0 x 10 ³ (1,2 x 10 ² a 3,0 x 10 ⁴)
Pós-fermentado - CS	1,3 x 10 ⁵ ± 2,8 x 10 ⁵ bc (1,2 x 10 ³ a 1,4 x 10 ⁶)	2,4 x 10 ⁴ ± 3,9 x 10 ⁴ (1,0 x 10 ³ a 3,1 x 10 ⁴)
Pós-fermentado - CI	5,2 x 10 ⁴ ± 9,1 x 10 ⁴ bd (1,2 x 10 ³ a 3,0 x 10 ⁵)	4,3 x 10 ⁴ ± 1,0 x 10 ⁵ (1,2 x 10 ³ a 3,1 x 10 ⁴)
Pós-fermentado - CL	3,3 x 10 ⁴ ± 1,0 x 10 ⁵ bcd (1,0 x 10 ³ a 7,2 x 10 ⁵)	1,4 x 10 ⁴ ± 2,5 x 10 ⁴ (7,2 x 10 ³ a 3,1 x 10 ⁴)
Pós-fermentado - CC	1,3 x 10 ³ ± 8,5 x 10 ³ bc (1,0 x 10 ² a 1,3 x 10 ⁵)	1,8 x 10 ⁴ ± 3,1 x 10 ⁴ (1,0 x 10 ³ a 3,1 x 10 ⁴)

^A valores das médias ± desvio padrão.

^B intervalo dos valores máximos e mínimos.

ND não detectado. Limite de detecção da técnica: 10² UFC g⁻¹.

^a médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de Duncan (P < 0,0001).

O limite máximo recomendado para assegurar a qualidade higiênica dos produtos é de 1,0 x 10⁴ ufc.g⁻¹ (GMP, 2008). A tabela 7 expressa em valores percentuais a quantidade de amostras que tiveram suas contagens de carga fúngica no meio DRBC acima do limite proposto. Sendo o meio DRBC utilizado como referência por conferir todas as características necessárias para desenvolvimento da micobiota presente nas amostras.

TABELA 7: Percentual de amostras de milho contaminadas acima dos limites recomendados.

Milho	DRBC
Pré-fermentado	25%
Pós-fermentado	70%

4.3- Determinação da micobiota

A distribuição dos gêneros isolados das amostras de milho pode ser observada na figura 13. Foram isoladas 384 cepas fúngicas pertencentes a sete gêneros filamentosos além de leveduras.

No milho pré-fermentado foi encontrado um menor número de isolados, sendo selecionadas 134 cepas. Podemos observar que no milho pré-fermentado encontrou-se uma contaminação variada, porém semelhante à encontrada no silo após o período de fermentação. Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Eurotium*, *Fusarium* e *Curvularia* tiveram grande alteração em sua frequência após o processo de fermentação.

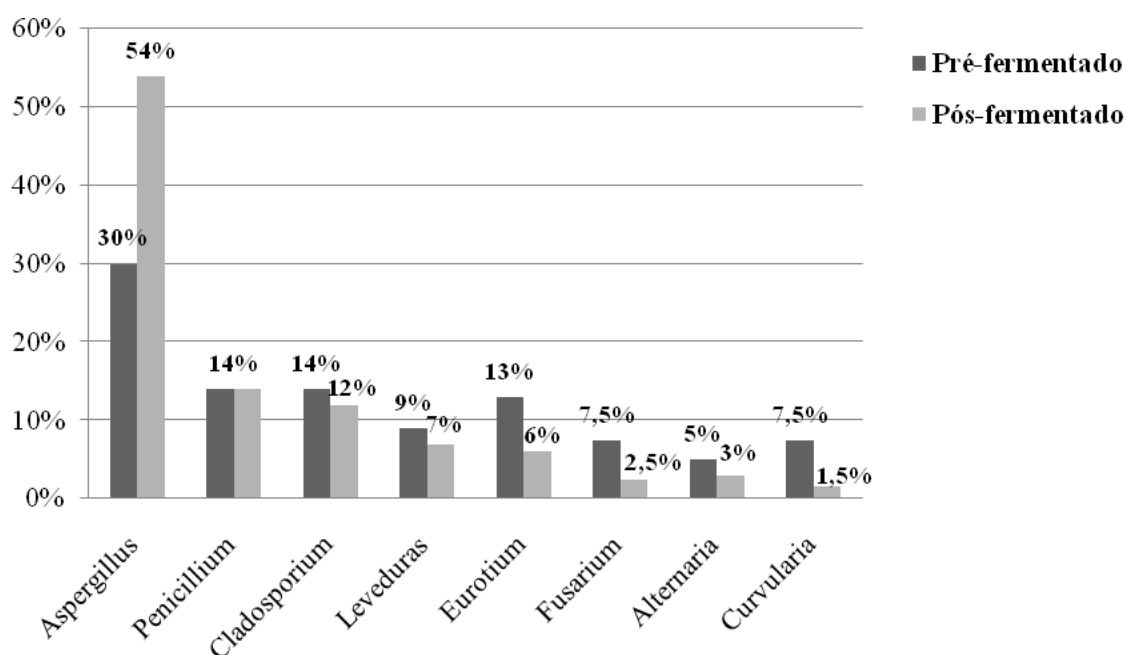


FIGURA 13: Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados no milho pré e pós-fermentado.

Foram isoladas um total de 97 cepas do gênero *Aspergillus* no milho pré-fermentado e 219 no milho pós-fermentado. Na figura 14 observou-se a ocorrência de algumas espécies tanto no milho pré como o pós-fermentado: *A. flavus*, *A. niger* agregados, *A. fumigatus* e *A. parasiticus*, ocorrendo variação nas suas frequências de uma fase para outra; sendo que o *A. candidus* ocorreu apenas no milho pós-fermentado.

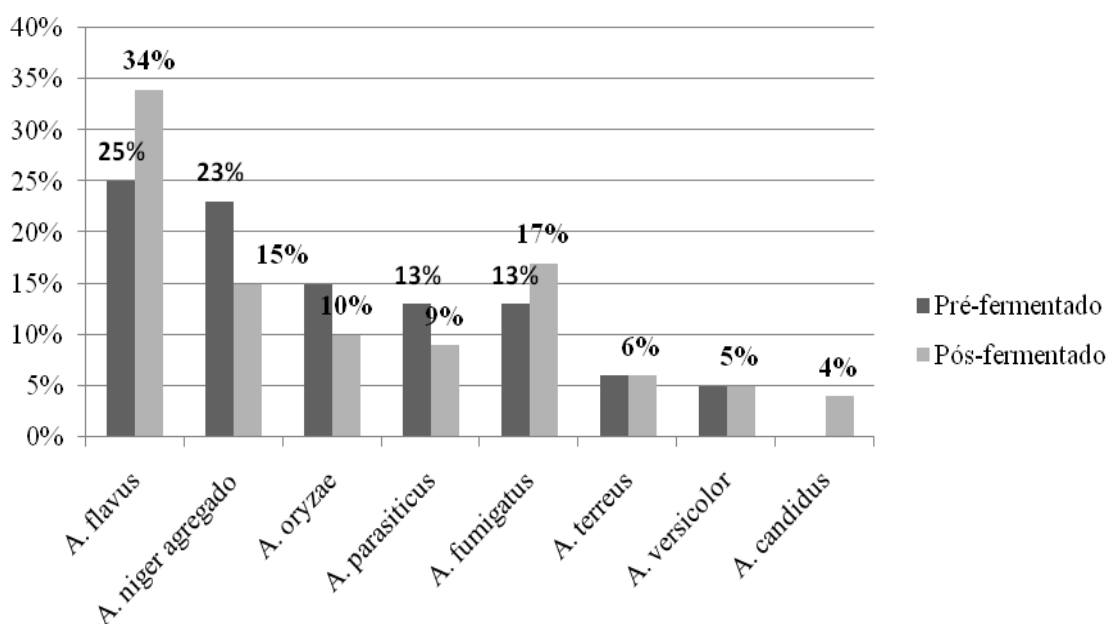


FIGURA 14: Densidade relativa (%) de espécies de *Aspergillus* no milho pré e pós-fermentado.

Também foram isoladas 19 cepas de *Penicillium* sp. na fase pré-fermentativa e 82 isoladas na fase pós-fermentativa. Cinco espécies do gênero foram identificadas como: *P. glabrum*, *P. funiculosum*, *P. griseofulvum*, *P. islandicum* e *P. citrinum* (Figura 15). No milho pré-fermentado foi encontrada a ocorrência de apenas três destas espécies: *P. citrinum*, *P. islandicum* e *P. glabrum*.

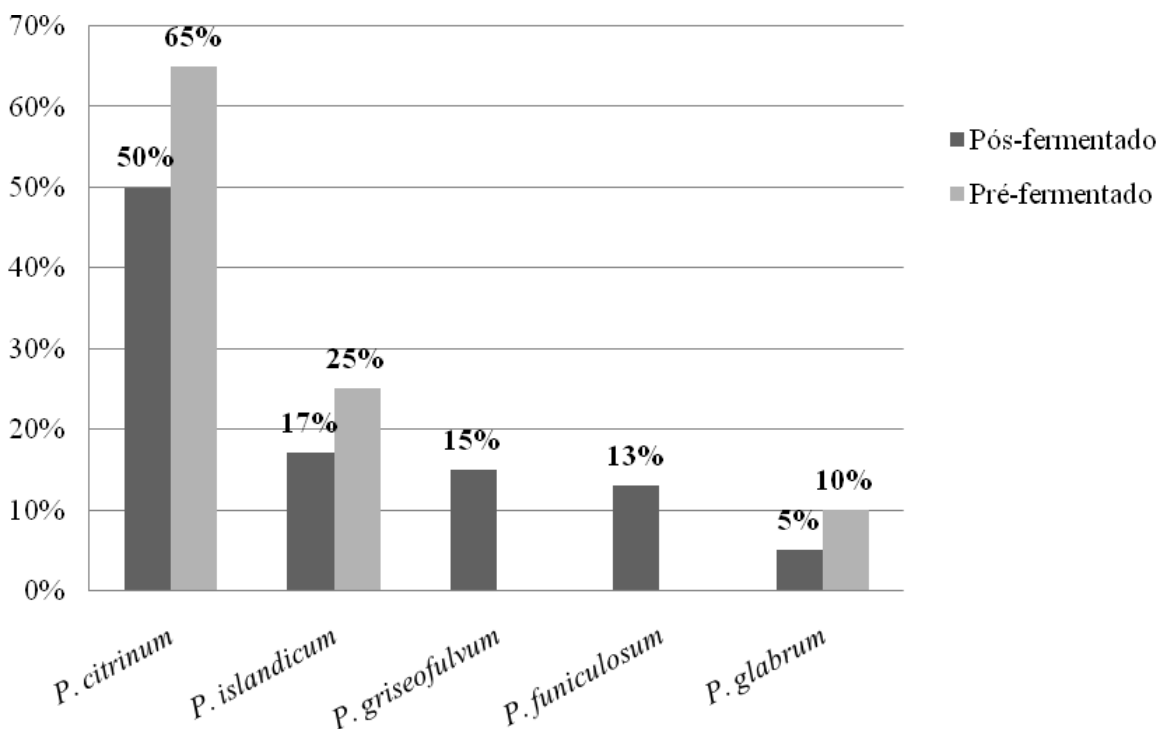


FIGURA 15: Densidade relativa (%) de espécies de *Penicillium* sp. no milho pré e pós-fermentado.

As espécies de *Fusarium* isoladas foram *F. verticillioides* (80%) e *F. graminearum* (20%) num total de 12 cepas no milho pré-fermentado e 14 cepas de *F. verticillioides* (100%) no milho pós-fermentado.

4.4- Perfil toxígeno: habilidade como produtora

Dentre as cepas de *P. citrinum* isoladas (41 cepas), 75% destas foram capazes de produzir citrinina quando cultivadas em CAM e confirmadas por CCD.

Quanto às cepas de *A. niger* agregados (49 cepas), 18% se mostraram fluorescentes, de coloração esverdeada no CAM e 23% foram ocratoxígenas (OTA) quando confirmadas por CLAE, com índices de produção em torno de 2-10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Com relação à seção Flavi foram alcançadas as seguintes observações: 60% das cepas de *A. flavus* produziram uma fluorescência azulada no CAM e foram aflatoxígenas (AFB₁ e AFB₂), quando testadas pela metodologia proposta, com índices variando de 1-5 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Já as cepas de *A. parasiticus* tiveram pouca correspondência no CAM, pois em torno de 40% das cepas demonstraram fluorescência, mas tivemos durante a confirmação das mesmas um índice de 75% de produtividade, porém com índices semelhantes aos da espécie *A. flavus*: 1-5 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

Já as cepas de *A. fumigatus* que foram testadas quanto a sua capacidade, tivemos 65% de fluorescência correspondente no CAM e todas as cepas que foram positivas nesta técnica foram positivas quando testados pela técnica de CCD descrita e os índices variaram de 2-15 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

4.5- Análises micotoxicológicas

4.5.1- Aflatoxinas

Ao serem realizadas as análises das amostras, foi detectada a presença de aflatoxinas. Os resultados podem ser observados na tabela 8, onde foi demonstrada uma positividade média de 31% para milho pré-fermentado, com níveis de contaminação que variavam de 2-45 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Porém quando se avalia o substrato após o processo de fermentação esta frequência sofreu acréscimos. É possível perceber que a positividade no milho pós-fermentado chegou a 40%, com níveis que variavam de 2-100 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

Após análise estatística dos dados, observa-se, porém, que não ocorreu uma diferença estatística significativa entre substratos ou setores do silo. O limite de detecção da técnica foi de $\leq 0,1\ \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $\leq 3\ \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

TABELA 8: Frequência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de AFs em milho quantificados através de CLAE.

Tipo de Alimento	Milho		AFs ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	
	Frequência	Mínimo	Máximo	Média \pm desvio padrão
Pré-fermentado - CS	17 %	1,04	30,34	11,90 \pm 12,91 ^a
Pré-fermentado - CI	17 %	2,03	40,34	26,30 \pm 28,41 ^a
Pré-fermentado - CL	31 %	2,35	40,23	21,23 \pm 26,34 ^a
Pré-fermentado - CC	21 %	3,10	45,10	18,42 \pm 14,08 ^a
Pós-fermentado - CS	17 %	2,02	55,78	18,34 \pm 17,49 ^b
Pós-fermentado - CI	19 %	2,05	100,05	18,63 \pm 28,96 ^b
Pós-fermentado - CL	40 %	1,10	99,78	20,21 \pm 30,10 ^b
Pós-fermentado - CC	25 %	1,54	34,45	18,64 \pm 13,07 ^b

^a Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ($P \leq 0,0001$).

4.5.2- Ocratoxina A

A OTA foi observada em níveis baixos. Foi detectada principalmente nas amostras de milho pré-fermentado, onde cerca de 9,5% se mostraram positivas, com níveis de 2-30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Tabela 9). No milho pós-fermentado, observou-se um percentual de positividade semelhante ao milho pré-fermentado (9,3%), variando os índices de concentração dentre 5-20 $\mu\text{g.g}^{-1}$. O limite de detecção da técnica foi de $\leq 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ e o limite de quantificação de $\leq 1 \mu\text{g.g}^{-1}$.

TABELA 9: Frequência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de OTA em milho quantificados através de CLAE.

Tipo de Alimento	Milho		OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	
	Frequência	Mínimo	Máximo	Média \pm desvio padrão
Pré-fermentado - CS	9 %	2,54	28,45	12,24 \pm 13,45 ^{ade}
Pré-fermentado - CI	10 %	2,12	27,45	16,27 \pm 17,79 ^{ae}
Pré-fermentado - CL	12 %	3,35	30,13	15,73 \pm 15,27 ^{ac}
Pré-fermentado - CC	7 %	3,47	25,10	12,53 \pm 12,34 ^{acd}
Pós-fermentado - CS	7 %	5,54	18,12	11,12 \pm 12,44 ^{bde}
Pós-fermentado - CI	8 %	5,47	20,39	10,23 \pm 11,04 ^{be}
Pós-fermentado - CL	10%	6,03	10,85	09,67 \pm 07,11 ^{bc}
Pós-fermentado - CC	12 %	6,71	20,10	11,04 \pm 10,27 ^{bcd}

^a Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ($P \leq 0,0001$).

4.5.3- Fumonisina B₁ e deoxinivalenol

Foram encontrados índices muito baixos de contaminação para as duas toxinas (tabelas 10 e 11). Para a ocorrência de FB₁ no milho pré-fermentado foi observado uma frequência de contaminação média de 20%, com níveis variando de 0,31-2 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Já no milho pós-fermentado foi obtida uma frequência média de 30%, com níveis variando de 0,32-1,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

No caso da ocorrência de deoxinivalenol, o milho pré-fermentado alcançou uma frequência de contaminação média de 26%, com níveis variando de 0,56-2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e no milho pós-fermentado a frequência média foi de 20%, com níveis variando de 0,32-1 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

A confiabilidade dos níveis de toxinas detectados no teste é demonstrada através do coeficiente de regressão linear (R^2) que existe entre a curva de calibração dos padrões e das amostras que sofreram detecção e quantificação. Para o teste de FB_1 o R^2 foi de 0,987 (sendo os limites de quantificação indicados pelo fabricante com níveis de $\leq 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ e $\geq 6 \mu\text{g g}^{-1}$) e para deoxinivalenol tiveram um $R^2 = 0,972$ (tendo o limite de quantificação indicado pelo fabricante com níveis de $\leq 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ e $\geq 2,5 \mu\text{g g}^{-1}$).

TABELA 10: Frequência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de FB_1 em milho quantificados através de ELISA.

Tipo de Alimento	Milho		$FB_1(\mu\text{g g}^{-1})$	
	Frequência	Mínimo	Máximo	Média \pm desvio padrão
Pré-fermentado - CS	17 %	0,37	1,94	$0,52 \pm 1,48$ ^{acd}
Pré-fermentado - CI	22 %	0,31	1,99	$0,90 \pm 1,06$ ^{acd}
Pré-fermentado - CL	21 %	0,39	0,89	$0,31 \pm 0,35$ ^{ad}
Pré-fermentado - CC	21 %	0,37	0,69	$0,34 \pm 0,26$ ^{ac}
Pós-fermentado - CS	27 %	0,33	1,01	$0,34 \pm 0,70$ ^{bcd}
Pós-fermentado - CI	29 %	0,32	1,46	$0,41 \pm 0,90$ ^{bcd}
Pós-fermentado - CL	30 %	0,32	1,44	$0,42 \pm 0,97$ ^{bd}
Pós-fermentado - CC	32 %	0,37	2,09	$0,35 \pm 1,67$ ^{bc}

^a Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ($P \leq 0,0001$).

TABELA 11: Frequência de contaminação; níveis máximos e mínimos; médias e desvios padrões dos níveis de DON em milho quantificados através de ELISA.

Tipo de Alimento	Milho		DON ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Frequência	Mínimo	Máximo	Média \pm desvio padrão
Pré-fermentado - CS	27 %	0,56	2,05	$0,51 \pm 1,52$ ^{acd}
Pré-fermentado - CI	27 %	0,52	1,99	$0,78 \pm 1,19$ ^{acd}
Pré-fermentado - CL	21 %	0,59	1,99	$0,98 \pm 1,02$ ^{ad}
Pré-fermentado - CC	28 %	0,57	0,69	$0,30 \pm 0,26$ ^{ac}
Pós-fermentado - CS	17 %	0,33	0,95	$0,45 \pm 0,50$ ^{bcd}
Pós-fermentado - CI	19 %	0,32	1,00	$0,11 \pm 0,91$ ^{bcd}
Pós-fermentado - CL	22 %	0,32	1,04	$0,71 \pm 0,32$ ^{bd}
Pós-fermentado - CC	22 %	0,37	0,97	$0,50 \pm 0,45$ ^{bc}

^a Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ($P \leq 0,0001$).

5- DISCUSSÃO

Os valores encontrados no estudo para as características físicas das amostras foram adequados segundo padrões propostos por Almeida (2000), isto é, pH variando de 3,0 a 6,5, atividade aquosa variando de 0,584 a 0,800 e matéria seca variando de 20 a 48%. Isso reflete um produto de qualidade esperada na bovinocultura brasileira. Porém, se atribuirmos o desvio padrão às médias de atividade aquosa, o valor supera 0,92, o que pode representar um risco maior de contaminação destes alimentos por microorganismos.

Observou-se que os substratos estiveram com as características físicas de acordo com aquelas relatadas na literatura por González Pereyra et al. (2007) e Whitlow et al. (1999). As avaliações estatísticas dos dados obtidos não mostraram diferença significativa entre as fazendas, camadas do silo e tipos de substratos avaliados. Correlaciona-se esta não diferença estatística às condições climáticas muito semelhantes entre os locais de coleta (CPTEC/INPE) e devido as fazendas estarem próximas, localizadas na macro região do sudeste brasileiro. Existe uma diferença visual na comparação das médias quando avaliamos os substratos pré e pós-fermentados, porém isso não se confirmou quando aplicado o teste estatístico. Contudo a literatura cita (RICHARD et al., 2008) que existe diferença estatística significativa nessa comparação.

É importante avaliar as condições climáticas que silos estão expostos nas localidades em que eles são armazenados. A avaliação física das amostras, juntamente com os dados climatológicos e a observação, durante o procedimento de coleta, de pontos de acúmulo de umidade, juntamente com crescimento de micélio fúngico, geravam a suspeita de que esse material poderia apresentar uma qualidade higiênica insatisfatória. As condições de altas temperaturas e pluviosidade, além de baixa de umidade são características favoráveis para o desenvolvimento e crescimento de fungos xerofílicos (MOSS, 1991). Tais dados insinuavam uma microbiota variável e de gêneros adaptados às baixas atividades de água e altas temperaturas.

Tal suspeita foi confirmada através do meio DG18, que é seletivo para fungos xerofílicos, ou seja, aqueles que suportam crescimento em baixas Aa (PITT; HOCKING, 1997). As contagens nesse meio de cultivo superaram o limite de 10^4 ufc.g⁻¹. Havendo grande contaminação pelos dois principais gêneros desta categoria de fungos: *Aspergillus* e *Penicillium*. Outras bibliografias consultadas também mostravam este panorama de contaminação (GOURAMA et al., 1995; COLE et al., 1977; BOUDRA; MORGAVI, 2005; PEREYRA et al., 2008).

Nota-se que os locais de coleta apresentaram nos períodos avaliados um aumento de 2°C em relação à temperatura média brasileira (28°C); uma diminuição de 4 mm³ diários de chuva em relação a pluviosidade média do Brasil neste mesmo período (40 mm³/dia) e menos 2% de umidade relativa em relação a média do país (48%) no período. Os alimentos ensilados na bovinocultura, de modo geral, têm especial importância durante determinados períodos do ano (estiagem). Muitos estudos no Brasil demonstraram que estas condições são bastante favoráveis para o desenvolvimento destes tipos de fungos, principalmente o gênero *Aspergillus* (KELLER et al., 2008; CAMPOS et al., 2008).

Percebeu-se que as contagens do gênero *Fusarium* foram reduzidas, principalmente no milho após ser ensilado. Acredita-se que isso possa ser influência das condições climáticas não adequadas para as exigências deste fungo (milho pré-fermentado), além também, das condições de pH e pressão de oxigênio baixas às quais o fungo estava exposto no silo (MANSFIELD et al., 2005).

Ocorreram aumentos de pelo menos 10 vezes da carga fúngica contaminante (médias) dos alimentos pré-fermentados para os pós-fermentados. Estes aumentos foram descritos de forma semelhante na literatura por González Pereyra et al., (2007) e Amigot et al. (2006), porém os níveis de contaminação no país do estudo (Argentina) foram maiores, onde os valores máximos para milho estavam na faixa de $1,0 \times 10^5$ até $5,0 \times 10^7$ ufc.g⁻¹.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura onde foram observadas diferenças, no que diz respeito à contaminação fúngica entre as camadas amostradas do silo e seu estado fermentativo. Amigot et al. (2006) descreveu que a maior contaminação ocorreu em camadas da superfície do silo, descritas como as mais expostas e que sofreram menor compactação. Richard et al. (2007) fez observações na Europa semelhantes, onde apenas descreveu que a maior contaminação está relacionada com um menor grau de compactação e possivelmente com o tipo de substrato ensilado, visto que este autor avaliou além de milho outras bases vegetais. Mansfield et al. (2005) nos Estados Unidos, também avaliaram que ocorreu um aumento proporcional entre porções e fase fermentativa do substrato, principalmente relacionada com a compactação. E, além disso, correlacionou fatores climáticos como maior pluviosidade e conseqüentemente um maior grau de Aa no material ensilado como sendo também responsáveis pelo aumento da carga fúngica em porções do silo.

Na análise laboratorial foi observada uma grande carga fúngica e variabilidade no milho pós-fermentado. O processo de compactação e anaerobiose não sendo bem realizados colabora para a contaminação e micobiota variada (VAN SOEST et al., 1994).

Nossos resultados concordam com a literatura e confirmam que o gênero *Aspergillus* é o mais freqüente isolado de amostras de silagens para alimentação de bovinos na América do Sul (PEREYRA et al. 2008). Não apenas em silagens bovinas, mas em diferentes substratos para alimentação de animais, onde o milho seja um ingrediente principal, temos a ocorrência dos três principais gêneros toxígenos: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MAGNOLI et al. 2005; ROSA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; FRAGA et al., 2007; KELLER et al., 2007; CAMPOS et al., 2008).

Segundo a literatura, o *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são as espécies comumente associadas com a contaminação do milho e seus produtos derivados (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MAGNOLI et al. 1998; RIBEIRO et al. 2007). Em nosso estudo, o *F. verticillioides* foi a espécie mais isolada.

A determinação da micoflora foi de grande importância, bem como a capacidade toxigênica das cepas isoladas, por poder prover informações sobre as micotoxinas que potencialmente estariam presentes na amostra.

Nossos resultados, à semelhança da bibliografia, demonstraram que ocorreu um grau de contaminação de micotoxinas por todo o silo, porém existem porções do silo que podem sofrer uma maior contaminação, variando com as condições do local onde é armazenado e mantido (GOURAMA et al., 1995). No Brasil, temos autores como Hennigen; Dick (1995) que no Rio Grande do Sul demonstrou a contaminação de pelo menos 30% das amostras de milho avaliadas com níveis acima de $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Pereira et al. (2005) num estudo realizado na região de Minas Gerais também detectou níveis de AFB₁ nas amostras de silagens, chegando a $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Sassahara; Yanaka; Netto (2003) realizaram uma avaliação das porções de silos para alimentação de bovinos de leite, encontrando níveis de até $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$ não apenas no milho, mas em vários outros substratos, coletados no norte do Estado do Paraná. Na Argentina, González Pereyra et al. (2007) encontraram níveis que variavam de $10-80 \mu\text{g Kg}^{-1}$ no material pós-fermentado e níveis menores de $30 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de AFs totais no material pré-fermentado; estes não conseguiram determinar uma porção mais contaminada do silo, mas conseguiram destacar que apesar do processo fermentativo os níveis de toxina subiam.

Assim como em nosso estudo, outros autores evidenciaram baixos níveis de OTA tanto no milho pré como no pós-fermentado (AMIGOT et al., 2006; RICHARD et al. 2006,

2007). A OTA para os bovinos poderá prejudicar a digestão, tendo sua ocorrência mesmo em níveis baixos, como uma preocupação para a espécie (WHITLOW et al., 1999).

Encontramos baixos níveis e ocorrência das toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, mesmo no milho pré-fermentado; fato que difere da literatura consultada onde Sassahara; Yanaka; Netto (2003), no Brasil por CCD, detectou níveis de ZEA de até $5 \mu\text{g g}^{-1}$ em milho pré-fermentado. Outros estudos que avaliaram a presença de FB₁ em milho *in-natura* ou rações a base de milho, mostraram que essa toxina é uma preocupação. Keller et al. (2007) mostraram uma incidência preocupante de mais de 50% de amostras contaminadas com níveis de pelo menos $1 \mu\text{g g}^{-1}$. Em nosso estudo, os níveis de FB₁ foram menores do que os expostos na literatura, porém os efeitos crônicos e a ingestão continuada de toxina, bem como seus efeitos aditivos são foco de preocupação de diversos estudos (LOGRIECO et al., 2002; GIMENO et al., 2008).

Mansfield et al. (2005), Doko et al. (1996) e Scudamore; Nawas; Hetmanski (1998) correlacionaram que há diminuição dos níveis de toxina após processo fermentativo ou tratamentos térmicos, devido a degradação das moléculas de toxina presente. Tal efeito também foi observado neste estudo quando ocorreu a diminuição das médias do material pré para o pós-fermentado, no entanto esta diferença não se mostrou significativa, bem como a diferença entre as camadas amostradas do silo. Possivelmente atribuem-se essas diferenças dos níveis de toxina às condições climáticas impostas as culturas de milho nas regiões avaliadas e as condições inadequadas de desenvolvimento do fungo durante o processo de fermentação.

6- CONCLUSÕES

As características físicas avaliadas dos silos demonstraram condições adequadas para o crescimento fúngico. Os valores de pH variaram de 4,2 a 6,5, os de atividade aquosa variaram de 0,624 a 0,929 e os valores de matéria seca estiveram entre 38 e 42%.

A microbiota encontrada foi variada e com carga fúngica de $3,5 \times 10^4$ a $7,0 \times 10^6$, demonstrando condições higiênicas sanitárias desfavoráveis.

As condições adversas do processo de ensilagem não foram satisfatórias para inibir o desenvolvimento fúngico.

As condições climáticas das regiões do estudo demonstraram serem favoráveis para o desenvolvimento de fungos xerofílicos.

A contaminação fúngica esteve acima do limite proposto pela GMP (2008) nos substratos avaliados.

No material pós-fermentado ocorreu uma carga fúngica 10 vezes maior em relação ao material pré-fermentado.

As camadas superiores/centrais tiveram contagens fúngicas e níveis de toxina quando comparadas as camadas laterais/inferiores.

O gênero *Aspergillus* foi o mais freqüente nas várias amostras avaliadas e a espécie *A. flavus* foi a mais freqüente no milho pré como o pós-fermentado.

Penicillium citrinum foi à espécie do gênero com a maior freqüência nas amostras, principalmente no milho pós-fermentado, chegando a 50% das cepas isoladas deste gênero e 75% destas tiveram a capacidade de produzir citrinina quando estimuladas.

Os maiores níveis de contaminação foram de $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de aflatoxinas nas amostras de milho pós-fermentado.

Ocorreu contaminação acima da legislação permitida para consumo animal para AFs nos silos avaliados (MAPA, 1988).

A co-ocorrência de OTA, FB_1 e DON, no milho pré como pós-fermentado, oferece risco ao rebanho que consome este material.

A metodologia ELISA utilizada para detecção e quantificação foi adequada, pois permitiu uma rápida avaliação de um número grande de amostras, com uma grande segurança nos resultados obtidos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.C.C. **Avaliação das características agrônomicas e das silagens de milho e de sorgo cultivados em quatro densidades de semeadura**. UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2000. Tese de Doutorado em Zootecnia. 82 p.
- AMIGOT, S.L.; FULGUEIRA, C.L.; BOTTAIB, H.; BASÍLICO, J.C. New parameters to evaluate forage quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 41, n. 12, p. 215-224, 2006.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 de outubro de 2002. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm>. Acesso em: 13 mar 2008.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023** - Informação e documentação - Referências - Elaboração. ABNT, 2002. 24 p.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10522** - Informação e documentação - Citações em documentos - Apresentação. ABNT, 2002. 7 p.
- BHATNAGAR, D.; TAKAHASHI, T.; CHANG, P.K.; MATUSHIYAMA, K.; YU, J.; ABE, K.; CLEVELAND, T.E.; KOYAMA, Y. Mycotoxins: Current issues in U.S.A. **Meeting the Mycotoxin Menace Book**, 2003. 603 p.
- BEACON ANALYTICAL SYSTEMS, INC. **Deoxynivalenol Tube Kit**. USA, 2003a. Disponível em: <http://www.beaconkits.com/product_detail.cfm?ID=57>. Acesso em: 19 abr 2008.
- BEACON ANALYTICAL SYSTEMS, INC. **Fumonisin Plate Kit**. USA, 2003b. Disponível em: <http://www.beaconkits.com/product_detail.cfm?ID=58>. Acesso em: 19 abr 2008.
- BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 120, n. 1, p. 113-131, 2005.
- CAMPOS, S.G.; CAVAGLIERI, L.R.; KELLER, L.A.M. ; JURI, M.G.F.; DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; ROSA, C.A.R. Mycoflora and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 1, p. 377-383, 2008.
- CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Micotoxins: risks in plant, animal and humans systems**. Task Force Report nº 139, 2003. 199 p.

- CPTEC / INPE - CENTRO DE PREVISÃO DO TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS / INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Boletins Climatológicos**, n. 350 - 355. Disponível em: < http://www.agritempo.gov.br/boletins/boletim_RSE.html>. Acesso em: 20 dez 2007 e 27 jun 2008.
- COLE, R.J.; KIRKSEY, J.W.; DORNER J.W.; WILSON, D.M.; JOHNSON, J.C.JR.; JOHNSON, A.N.; BEDELL, D.M.; SPRINGER, J.P.; CHEXAL, K.K. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. **Journal of agriculture of food and chemistry**, v. 25, n. 4, p. 826-830, 1977.
- COLE, R.J.; COX, R.H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. Academic Press Inc., U. S, New York, 1981. 937 p.
- CRUZ, L.C.H.; ROSA, C.A.R.; CAMPOS, S.G. **Aflatoxicose aguda em suínos no Estado do Rio de Janeiro**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v. 7, n. 5, p. 127-128, 1985.
- CRUZ, L.C.H.; CAMPOS, S.G.; ROSA, C.A.R. **Aplicação do Ágar-Coco como Meio Diferencial para o isolamento de Fungos Citrinogênicos**. UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 39-60, 1992.
- CRUZ, L. C. H. **Citrinina – uma micotoxina produzida por *Penicillium citrinum* Thom: aspectos microbiológicos, bioquímicos e toxicológicos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1997. Tese de Doutorado em Sanidade Animal. 267p.
- DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. Piracicaba, SP. **Anais do XI Encontro Nacional de Micotoxinas**, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. p. 32-35.
- D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.
- DOKO, M.B.; BROWN, N.; SYDENHAM, E.W. MPUCHANE, S.; SIAME, B.A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, n. 10, p. 3240-3243, 1996.
- ELLING, F.; MOLLER, T. Mycotoxic nephropaty in animals. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 49, n. 1, p. 411-418, 1973

- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 81. 2005. 145p.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Pan-European Conference on Food Safety and Quality 2003. **A compendium: FAO Veterinary Public Health and Food and Feed Safety Programme: the Safety of Animal Products from Farm to Fork**, 2007. Disponível em: <http://www.fao.org/livestock/AGAP/FRG/FEEDSAFETY/feedsafety.htm>. Acesso em: 27 jun 2008.
- FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.A.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier. 1991. p. 441-476.
- GARON, D.; RICHARD, E.; SAGE, L.; BOUCHART, V.; POTTIER, D.; LEBAILLY, P. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3479-3484, 2006.
- GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 388-392, 1996.
- GIMENO, A.J.V.; MATEO, F.; JIMENEZ, M.; MEDINA, A.; VALLE, A.F.M.; MATEO, R. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 196-203, 2008.
- GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; ALONSO, V.A.; SAGER, R.; MORLACO, M.B.; MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034-1041, 2007.
- GMP⁺ **Certification Scheme Animal Feed Sector 2006. Appendix 1: Product standards (including residue standards)**. The Hague, the Netherlands: Productschap Diervoeder, 2008. p. 1-39.
- GOURAMA, N.; BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 12, p. 1395-1404, 1995.
- HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**. v. 95, n. 1, p. 641-655, 1991.

- HELDRICH, K. (Ed.). **Official Methods of Analysis**. AOAC - Association of Official Analytical Chemists, s. 935.76, 1990a.
- HELDRICH, K. (Ed.). **Official Methods of Analysis**. AOAC - Association of Official Analytical Chemists, s. 936.20, 1990b.
- HELDRICH, K. (Ed.). **Official Methods of Analysis**. AOAC - Association of Official Analytical Chemists, s. 975.35, 1995a.
- HELDRICH, K. (Ed.). **Official Methods of Analysis**. AOAC - Association of Official Analytical Chemists, s. 976.22, 1995b.
- HENNIGEN, M.R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 677-681, 1995.
- HOCKING, A.D.; PITT, J. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 488-492, 1980.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 31, p. 1-31, 2003.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Produção da pecuária municipal**, 2005. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 1 fev 2007.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-521, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- KELLER, K.M.; KELLER, L.A.M.; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X.; GARCIA, R.S.; ROSA, C.A.R. Avaliação micotoxicológica em produtos destinados à alimentação de caprinos leiteiros em Teresópolis, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v. 30, n. 2, p. 91-96, 2008.
- KELLER, K.M.; QUEIROZ, B.D.; KELLER, L.A.M.; RIBEIRO, J.M.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, p. 1037-1045, 2007.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I., **Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1988. 116p.
- KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 122 p.

- LIN, M.T.; DIANESE, J.C.A. Coconut – agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, n. 12, p. 1466-1469, 1976.
- LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 597–609, 2002.
- MADHYASTHA, S.M.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; PLATFORD, G.; ABRAMSON, D. Effects of different cereals and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *A. alutaceus* and *P. verrucosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 1506-1510, 1990.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, n. 1, p. 27-32, 1998.
- MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A. The mycobiota and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, n. 2, p. 7-22, 2002.
- MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIOS, G.; DALCERO, A. Surveillance of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in Feedstuffs from Córdoba Province, Argentina. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 5, p. 431-445, 2005.
- MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 249-260, 2007.
- MANSFIELD, M. A.; DE WOLF, E. D.; KULDAU, G. A. Relationships between weather conditions, agronomic practices, and fermentation characteristics with deoxynivalenol content in fresh and ensiled maize. **Plant Disease**, v. 89, n. 11, p. 1151-1157, 2005.
- MILLER, J.D. Global Significance of Mycotoxins and Phycotoxins. In: Rome, 1996 **Proceedings of IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. Instituto Superiore di Sanità, Rome, 1996. 31p.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO Portaria nº 07 de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, s. 1, p. 21968, 1988.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO **Projeções de Agronegócio Mundial e Brasil 2006/2007 a 2017/2018**. AGE - Agência de Acesso Estratégica. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2909DCC5111A4D7BE040A8C0750251C9>>. Acesso em: 21 out 2008.
- MORGAVI, D.P; RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 201–212, 2007.

- MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**, 1991. p. 23-51.
- MORTIMER, D.N.; GILBERT, J., SHEPHERD, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxins M₁ in liquid and powdered milk using affinity column cleanup. **Journal of Chromatography**, v. 407, n. 1, p. 393-398, 1987.
- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence? **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. (Eds.). **Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification**, Pennsylvania, EUA. The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 355-362, 2006.
- OHYAMA, Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 26, n. 8, p. 1137-1147, 1975.
- PASTER, N., BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 257-265, 1988.
- PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; RIBEIRO, J.M.M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciências e agrotecnologia de Lavras**, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
- PEREYRA, M.L.G.; ALONSO, V.; MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, n. 1, p. 1034-1041, 2008.
- PIMENTEL, D. World resources and food losses to pests. In: GORHAM, J. R. (Ed.). **Ecology and Management of Food Industry Pests**, in: USA. FDA Technical Bulletin n. 4, Association of Official Analytical Chemists. 1991. p. 5-11.
- PITT, J. I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2nd ed. 2nd ed. Sydney, Australia: CSIRO, Division of Food Processing, 1988. 186p.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Sydney, Australia, Chapman & Hall, 1997. 593 p.
- RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; FRAGA, M.E.; GATTI, M.J.A.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M., ROSA, C.A.R. Influence of water activity, temperature and time on

- mycotoxins production on barley rootlets. **Letters in Applied Microbiology**. v. 113, n. 12, p. 89-96, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 3479–3484, 2006.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 2420-2425, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 6, n. 50, p. 728–731, 2008.
- RINALDI, M.G. Invasive aspergillosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1061-1077, 1983.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de Nefropatia Micotóxica Suína causada pela ingestão de cevada contaminada por citrinina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 7, p. 87-90, 1985.
- ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Seropédica, Rio de Janeiro: UFRRJ- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002, 147p. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias.
- ROSA, C.A.R; RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.E.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 12, p. 89–96, 2006.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.
- SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 63-72, 2003.
- SANTOS, V.M.; DORNER, J.W.; CARREIRA, F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. **Mycopathologia**. v. 156, p. 133 - 138, 2003.
- SAMSON, R.A. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its telemorphs. In: BENNETT, J.W; KLICH, M.A.. (Eds.). **Aspergillus: the biology and industrial applications**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 1995, p. 353-388.
- SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands:

- Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. 2000. 388 p.
- SCUDAMORE, K.A., LIVESEY, T.C. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage : a review. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.77, n. 1, p.1-17, 1997.
- SCUDAMORE, K.A., NAWAS, S., HETMANSKI, M.T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addition Contaminate**, v. 15, n. 1, p. 30-55, 1998.
- SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some Brazilian Foods by using Multi-toxin Thin-Layer Chromatographic Method. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
- TRUCKSESS, M.W. Mycotoxins. **Journal of AOAC Internacional**, v. 89, n. 1, p. 270–284, 2006.
- TURNER, W.B. **Fungal metabolites**. London: Academic Press, 1978. 632p.
- TURNER, W.B.; ALDERIDGE, D.C. **Fungal metabolites II**. London: Academic Press, 1983. 632p.
- VAN EGMOND, H.P. Methods for determining ochratoxin A. and other nephrotoxic mycotoxins. In: VAN EGMOND, H.P. (Eds) **Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours**. IARC Scientific Publications, Ryon, France v.115, p. 57-70, 1991.
- VAN EGMOND, H.P. Mycotoxins: Detection, reference material and regulation. In: SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. (Eds) **Introduction to Food-borne Fungi** 6 ed., Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, 2000, p.332-338.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- WHITLOW, L. W.; HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos. São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p. 151-181.