

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANÁLISE DE ATIVIDADE DE ÁGUA EM ALIMENTOS ARMAZENADOS NO
INTERIOR DE GRANJAS DE INTEGRAÇÃO AVÍCOLA**

Dissertação de Mestrado

Denise Marques Garcia

PORTO ALEGRE

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ANÁLISE DE ATIVIDADE DE ÁGUA EM ALIMENTOS ARMAZENADOS NO
INTERIOR DE GRANJAS DE INTEGRAÇÃO AVÍCOLA**

AUTORA: Denise Marques Garcia

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na Área de Sanidade Avícola do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle

PORTO ALEGRE

2004

AUTORA: DENISE MARQUES GARCIA

**TITULO DO TRABALHO: ANÁLISE DE ATIVIDADE DE ÁGUA EM
ALIMENTOS ARMAZENADOS NO INTERIOR DE GRANJAS DE
INTEGRAÇÃO AVÍCOLA**

APROVADA EM 22/03/2004.

APROVADA POR
CARLOS TADEU PIPPI SALLE

Orientador e membro da Comissão

CACIANO ZAPATA

Prof. Dr. Membro da Comissão

LUCIANA RUSCHEL

Prof. Dr. Membro da Comissão

ANTÔNIO MÁRIO PENZ JÚNIOR

Prof. Dr. Membro da Comissão

A Deus, aos meus pais, irmã, avó e
meu namorado Henrique
pelo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade e incentivo à pesquisa.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao professor Carlos Tadeu Pippi Salle, pela amizade, orientação e confiança depositada, desde o período de graduação e que foram imprescindíveis para auxiliar na escolha pela área profissional e pelo Mestrado.

Ao professor Ari Bernardes in memoriam, pelo exemplo de profissional e conduta humana.

Aos professores do CDPA, Hamilton Luiz de Souza Moraes, Cláudio Wageck Canal e Vladimir Pinheiro do Nascimento pela convivência e aprendizado.

À professora Dra. Vera Beatriz Wald, pela amizade, paciência e orientação.

Aos colegas do CDPA, em especial a Rosecler Alves Pereira, Lucas Brunelli de Moraes, Mariangela Algayer e Obiratã Rodrigues pela amizade, maravilhosas rodas de mate e auxílio na concretização desta etapa profissional.

Aos demais colegas do CDPA, funcionários, estagiários, mestrandos e doutorandos que me auxiliaram em alguma tarefa do experimento e amizade durante o período de trabalho.

E a todos que de alguma forma auxiliaram para a realização desta etapa profissional, meus agradecimentos.

“Se os senhores da Guerra mateassem
ao pé do fogo deixando o ódio pra trás,
antes de lavar a erva
o mundo estaria em paz.”

Silvio Genro

RESUMO

Na avicultura algumas integrações têm a prática de estocar as dietas por vários dias dentro da granja e muitas vezes, essas são submetidas a condições inadequadas de armazenamento. Os dados relacionados aos fatores ambientais, especialmente temperatura e umidade relativa do ambiente, tempo de estocagem e principalmente atividade de água (a_w) do alimento, são fatores importantes que influenciam o crescimento fúngico e produção de micotoxinas no substrato, tornando-se importantes para o estabelecimento de um programa de prevenção e controle deste agente (ORRIS, 1999). Este trabalho objetivou analisar a atividade de água em dietas animais para verificar o potencial de crescimento fúngico e a forma de armazenamento do produto. Desta forma, foi estudada a atividade de água da dieta comercial de empresa de integração avícola no Rio Grande do Sul, antes da entrega ao criador e no último dia de armazenamento, nas diferentes estações do ano. Assim, buscou-se contribuir para a verificação das condições de conservação do alimento e dos possíveis riscos de contaminação, contribuindo para a prevenção de fungos e toxinas de importância avícola e com reflexos na saúde pública, avaliando o potencial de crescimento de microrganismos no alimento, com a possibilidade de se fornecer uma ferramenta de monitoramento das rações armazenadas, dentro de um programa com critérios fundamentados de prevenção e controle. Também foi determinada a umidade e a isoterma de adsorção destes alimentos, para auxiliar na compreensão sobre a forma de armazenamento. Pelos resultados encontrados ficou confirmado o aumento da atividade de água após o período de armazenamento da dieta, correspondendo ao valor de 0.681 de a_w na fábrica e 0.693 de a_w na granja. No entanto, os valores de atividade de água não estavam inseridos nos limites mínimos de crescimento fúngico (0.78 de a_w) e produção de aflatoxinas (0.86 de a_w). Houve correlação linear positiva entre atividade de água e umidade da ração, tanto na fábrica quanto na granja. A isoterma de adsorção apresentou aumento da umidade com o aumento da atividade de água. Não houve correlação entre atividade de água e ppb de aflatoxina encontrados nas dietas.

ABSTRACT

In some poultry industry, diets remain stored for days in the farm and, many times, it is subjected to inappropriate storage conditions. The information related to the environmental conditions, especially temperature and environment relative humidity, storage time and, mainly, food water activity (a_w) are important agents that influence fungal growth and mycotoxins production on the substratum, becoming important to the establishment of a program to prevent and control this agent (ORRIS, 1999). This research work had as its principal objective to analyze the water activity to verify the potential of fungal growth and the way that the product is stored. In this way, it was studied the water activity of commercial diet in a company of the poultry integration in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, before the delivery at the farm and the last day of storage, in different seasons. For this reason, this assignment sought to verify the conditions of food preserving and possible risks of contaminations, serving as preservation of fungi and toxins of avian importance and with reflexes in public health, evaluating the potential of microorganisms growth on it, with the possibility of supplying a toll to monitor the stored diet, inserted in a wide program, with criteria of prevention and control. It was determined the humidity and the adsorption isotherm of this feed to assist in the comprehension about the way this feed is stored. For the results it was confirmed the increase on water activity after the period of feed storage, corresponding at 0,681 a_w before the delivery at the farm and 0,693 a_w the last day of storage at the farm. However, the values of water activity were not inserted on the minimum limits of fungal growth (0,780 a_w) and aflatoxins production (0,86 a_w). There was a positive linear correlation between the water activity and the humidity of the diet, both at the fact view and at the farm. The adsorption isotherm presented an increase in humidity, with the increase in water activity. There wasn't correlation between the water activity and ppb of aflatoxin meet in diets.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Taxas generalizadas de reações de deterioração em alimentos em função da atividade de água em temperatura ambiente. (VAN DEN BERG; BRUIN, 1981).....	18
FIGURA 2 - Higrômetro Eletrônico Novasina Thermoconstant Humitat	22
FIGURA 3 - Silos de madeira e comedouros tubulares no interior dos aviários ..	27
FIGURA 4 - Coleta da ração na fábrica, durante o carregamento do caminhão ...	28
FIGURA 5 - Coleta da ração na granja retirada dos comedouros.....	28
FIGURA 6 - Valores de atividade de água da ração, encontrados na fábrica (a_wFA) e na granja (a_wGR), evidenciando na linha vermelha, o valor mínimo de crescimento de <i>A. flavus</i> e na linha tracejada, o valor mínimo para a produção de aflatoxina	33
FIGURA 7 - Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água (%URH) em relação à umidade na fábrica sem considerar a estação	36
FIGURA 8 - Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água (%URH) em relação à umidade na granja sem considerar a estação	36
FIGURA 9 - Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água em relação à umidade no verão, incluindo os valores obtidos na fábrica e granja	37
FIGURA 10 - Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água em relação à umidade no outono, incluindo os valores da fábrica e granja	37
FIGURA 11 - Gráfico da isoterma de adsorção da ração inicial de frango de corte a 25 °C, representado por curva sigmóide	39
FIGURA 12 - Gráfico da isoterma de adsorção da ração inicial de frango de corte a 25°C e 30°C, medindo a atividade de água das amostras	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores mínimos de atividade de água (a_w) para o crescimento e produção de toxina de patógenos de importância alimentar	20
TABELA 2 - Atividade de água dos sais saturados utilizados, à temperatura de 25 e 30 °C	31
TABELA 3 - Atividade de água (a_w) nas rações de integração avícola do Rio Grande do Sul, antes (fábrica) e após o armazenamento (granja), em três diferentes estações	33
TABELA 4 - Dados das diferentes variáveis estudadas utilizando análise de variância em delineamento de blocos casualizados com arranjo fatorial	34
TABELA 5 - Médias e desvios padrões da umidade da ração conforme o local e estação	35
TABELA 6 - Média e desvio padrão dos dados de temperatura e umidade do ambiente, atividade de água e umidade da cama do aviário nas diferentes estações no ano	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Atividade de água	16
2.2 Micotoxinas	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Integração e criadores	26
3.2 Armazenagem do alimento.....	26
3.3 Composição da ração	26
3.4 Periodicidade das análises	27
3.4.1 Sistema de amostragem	29
3.4.2 Medição de temperatura e umidade relativa do ambiente	29
3.4.3 Acondicionamento das amostras de ração	29
3.5 Análise de atividade de água	30
3.6 Coleta da cama do aviário	30
3.7 Umidade da ração	30
3.7 Isoterma de adsorção	31
3.8 Detecção de aflatoxinas	32
3.9 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Atividade de água	33
4.2 Detecção de Aflatoxina	38
4.3 Isoterma de adsorção	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	44

REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO	50

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é o sistema de produção animal que mais cresceu no país nas últimas décadas. O grande avanço nesta área está sustentado por uma estrutura de agregação tecnológica, nas áreas de sanidade, genética, nutrição e manejo. Além disso, a avicultura assume uma importância social, pela capacidade de viabilizar as pequenas propriedades agrícolas, fixando o pequeno produtor no campo. Outra grande importância é o fornecimento de proteína animal de excelente qualidade e de baixo custo. Alguns dados fornecidos pela Associação Gaúcha de Avicultura (ASGAV) referentes aos dados dos anos de 2002 e 2003 demonstram a importância deste setor para o Estado do Rio Grande do Sul, sendo o segundo maior exportador de carne de frango desde 2002 e o terceiro maior produtor do país, dispondo de uma estrutura que atualmente tem 16 frigoríficos com Inspeção Federal, 05 frigoríficos com Inspeção Estadual, 28 produtores de ovos associados, 120 mini e pequenos produtores de ovos, 09 incubatórios independentes e 11 associados fornecedores para a avicultura. Toda a estrutura que envolve a avicultura é responsável por 45.000 empregos diretos e 800.000 empregos indiretos. A produção avícola é feita por 8500 produtores integrados, com média de 10 hectares por propriedade, tendo um plantel permanente de 60.000.000 de pintos de corte. Também dispõe de 25.000.000 de avós/matrizes e poedeiras comerciais, sendo abatidas 602.000.000 de aves por ano, gerando uma produção anual de 1.000.000 toneladas de carne.

Na parte de insumos, o setor avícola do Rio Grande do Sul apresenta o consumo de 2.350 milhões de toneladas de milho, 800 mil toneladas de farelo de soja e estes ingredientes constituem, respectivamente, as principais fontes de energia e proteína utilizadas como matéria prima na produção de dietas para a alimentação animal.

Com o grande desenvolvimento deste setor, é necessário um intenso controle sanitário nos plantéis avícolas, visando prevenir patógenos que comprometam a saúde animal e com importância na área de saúde pública, como no caso das micotoxinas.

A ocorrência de micotoxicose é um dos grandes problemas encontrados na avicultura mundial e, segundo o documento da 3ª Conferência Internacional sobre Micotoxina de 1999, pelo menos 25% dos cultivos alimentares em todo o mundo estão contaminados por micotoxinas. De acordo com os resultados de análises produzidas pelo Laboratório de Micotoxicologia, da Universidade Federal de Santa Maria do Rio

Grande do Sul, acima de 40% do milho produzido no Brasil possui contaminação por aflatoxina (SANTOS, 2002).

Além dos efeitos nocivos às aves, a aflatoxicose tem causado preocupação em termos de saúde pública, pelos efeitos provocados às dietas contaminadas sobre o organismo das aves e a possibilidade de transmissão de resíduos tóxicos na alimentação humana, resultando em potente risco à saúde, especialmente associado ao câncer humano (DALVI E MCGOWAN, 1984).

Enormes prejuízos econômicos são decorrentes da utilização de alimentos contaminados por estas substâncias tóxicas, em particular as aflatoxinas, sendo capazes de prejudicar praticamente todos os parâmetros de produção, ocasionar imunossupressão e alterar o mecanismo de coagulação sanguínea da ave (HOERR, 1991).

Em um mercado altamente competitivo, é uma questão de sobrevivência à avicultura brasileira, a minimização dos custos, o diagnóstico dos riscos e controle dos pontos críticos ao longo de todo o processo de fabricação das dietas, a fim de obter uma ótima eficiência das aves, que irão transformar estas dietas em um produto final. Para atingir este objetivo é necessário, além de uma formulação adequada, conhecer a qualidade da matéria prima, tendo o controle completo dos processos de fabricação e armazenagem na fábrica, embalagem, transporte para a granja até a dieta chegar ao comedouro e ser ingerida pela ave.

No Brasil, por apresentar um clima tropical úmido, especialmente na região sul, que apresenta um clima subtropical, há um favorecimento ao desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas nas matérias primas e dietas animais, especialmente o milho, que é um importante ingrediente utilizado na elaboração das dietas e que pode contaminar-se em diversas fases de produção, desde a lavoura até a granja.

Na avicultura em algumas integrações, as dietas permanecem estocadas por vários dias dentro da granja e, muitas vezes, essas são submetidas a condições inadequadas de armazenamento. Os dados relacionados aos fatores ambientais, especialmente temperatura e umidade relativa do ambiente, tempo de estocagem e principalmente, atividade de água do alimento, são fatores importantes que influenciam o crescimento fúngico e produção de micotoxinas no substrato, tornando-se importantes para o estabelecimento de um programa de prevenção e controle deste agente (ORRIS, 1999).

Na literatura não foram encontrados trabalhos científicos determinando o valor da atividade de água das dietas avícolas e se este valor encontra-se dentro do limite mínimo ao crescimento de fungos produtores de aflatoxina. Também não há citações que esclareçam se há aumento da atividade de água na dieta após o seu período de armazenamento. Por esta razão, este trabalho buscou analisar a atividade de água em dietas e as condições ambientais de temperatura e umidade relativa no interior dos aviários, para verificar o potencial de crescimento fúngico e a forma de armazenamento do produto. Assim, o trabalho teve por objetivo estudar a atividade de água da dieta comercial de empresa de integração, antes da entrega ao avicultor e no último dia de armazenamento, nas diferentes estações do ano, contribuindo para verificar as condições de conservação do alimento, tempo de estocagem e os possíveis riscos de contaminação. Desta forma, também foi o objetivo avaliar os pontos críticos de controle no armazenamento da dieta no interior da granja, servindo como prevenção e controle dos fungos e toxinas de importância avícola e com reflexos na saúde pública.

Também foi importante validar esta técnica como teste de triagem no laboratório, avaliando o possível potencial de crescimento de microrganismos no alimento, com a possibilidade de se fornecer uma ferramenta de monitoramento das dietas armazenadas, dentro de um programa com critérios fundamentados de prevenção e controle. Outra atividade inclusa nesta pesquisa observacional foi a determinação da isoterma de adsorção destes alimentos, para auxiliar na compreensão sobre a forma de armazenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Atividade de Água

A água presente nos alimentos pode apresentar-se na forma de molécula livre ou ligada ao substrato. A atividade de água (a_w) é um dos fatores intrínsecos dos alimentos e é uma medida qualitativa que possibilita avaliar a disponibilidade de água livre que é suscetível a diversas reações, ao passo que o teor de umidade é uma medida meramente quantitativa, medindo o percentual em peso, de toda água presente no alimento, tanto livre quanto ligada (SCOTT, 1957).

Nesses termos, a quantidade de água livre que não se encontra comprometida com as moléculas constituintes do produto, está disponível para as reações físicas, químicas e biológicas (WELTI e VERGARA, 1997), tornando-se o principal responsável pela deterioração dos alimentos. A água ligada interage diretamente com as moléculas constituintes do alimento, não podendo ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação. No caso de um substrato que apresente baixa atividade de água, há interrupção do metabolismo dos microrganismos presentes, inibindo o seu desenvolvimento ou reprodução.

O princípio da atividade de água consiste na a_w é a pressão parcial de água na amostra (P) ou a pressão de vapor da solução (soluto+solvente), sobre a pressão de vapor na água pura (solvente), em temperatura constante (P°), ambos à mesma temperatura. (SCOTT, 1957). Em temperatura constante, existe uma relação entre a_w de um alimento e a umidade relativa de equilíbrio (URE) do ar (expresso em porcentagem) no ambiente fechado em que se encontra e, portanto é sempre cem vezes maior que o valor de a_w ($a_w = ERH/100$).

A atividade de água ou URH é um dos parâmetros mais importantes na conservação de alimentos, tanto no aspecto biológico como nas transformações físicas. Dessa forma, podem ser previstas reações de oxidação lipídica, escurecimento não enzimático, atividade enzimática, desenvolvimento de microrganismos, assim como o comportamento de misturas de alimentos com diferentes valores de atividade de água e sistemas de embalagens (NETO, 1976).

Na literatura é utilizado tanto o termo umidade quanto atividade de água, para se

referir à quantidade de água presente no alimento (WELTI, 1997), sendo freqüente pensar que a maior estabilidade do alimento está no controle de umidade mínima. No entanto, segundo Rockland e Nishi apud Welti (1997), a questão citada anteriormente pode ser aplicável a uma grande quantidade de produtos. Entretanto, porém em outros, tem sido observado que há um intervalo ótimo de umidade, não sendo necessariamente associado com níveis mínimos.

O conteúdo de umidade pode ser utilizado com fator indicativo de propensão à deterioração ou contaminação do alimento. Entretanto, tem sido observado que diferentes alimentos com o mesmo conteúdo de umidade podem apresentar diferenças na estabilidade. Assim, o valor da umidade é insuficiente para indicar a perecibilidade do produto, já que não leva em conta a interação da água com outros componentes do alimento (WELTI, 1997).

Desde a introdução do conceito de atividade de água, há mais de 40 anos, este tem sido amplamente utilizado na preservação de alimentos, servindo para melhorar os processos e elaborar novos produtos (WELTI, 1997). Também tem sido utilizado em estudos da avaliação fisiológica dos principais microrganismos, correlacionando com o potencial de crescimento e a atividade metabólica destes (GOULD, 1985).

Segundo Troller e Scott (1992), a atividade de água afeta os atributos e as características dos alimentos e é utilizada no controle dos fatores estabilizantes, como as reações enzimáticas e não enzimáticas, a oxidação lipídica e como parâmetro de crescimento microbiológico, demonstrado na Figura 1 (VAN DEN BERG; BRUIN, 1981). Segundo estes autores, os microrganismos podem ser categorizados com respeito à sua capacidade de crescimento e produção de metabólitos, devido às condições limitadas de atividade de água.

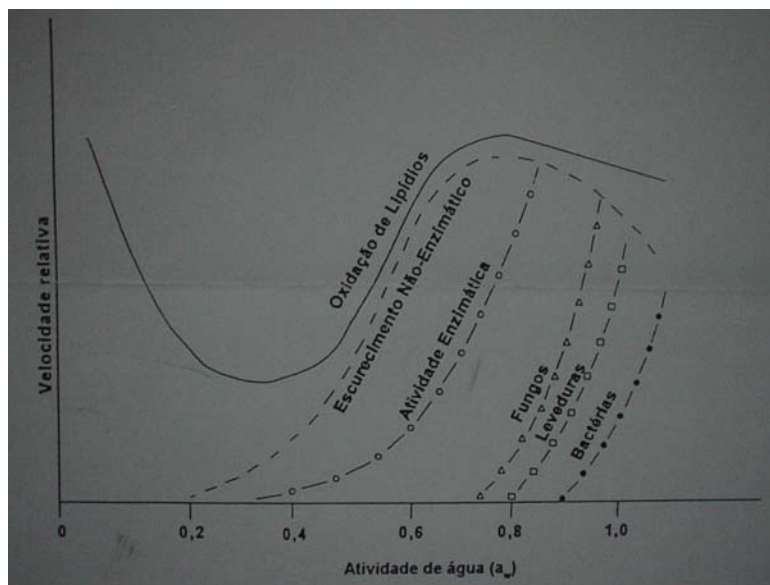


Figura 1 – Taxas generalizadas de reações de deterioração em alimentos em função da atividade de água em temperatura ambiente (VAN DEN BERG; BRUIN, 1981).

A diminuição da a_w nos alimentos é utilizada nas indústrias, para a manutenção da qualidade do produto, promovendo o melhor aproveitamento das matérias primas e como parâmetro de controle microbiano (TROLLER, 1987). Realiza-se esta diminuição ao baixar a temperatura, ao adicionar solutos e utilizar os métodos de vaporização, cristalização, extração com solventes e sublimação. Segundo Chirife e Bueira apud Welte (1997), a indústria de alimentos está utilizando a atividade de água para prever a estabilidade de alimentos que contenham uma quantidade apreciável de água, visando o controle microbiológico dos alimentos concentrados e semi-úmidos.

O valor de a_w tem grande importância na área de tecnologia de alimentos, permitindo avaliar a suscetibilidade de deterioração dos alimentos e, conseqüentemente, a vida de prateleira do produto. A atividade de água está relacionada com o conteúdo de umidade do alimento, à temperatura constante, por meio de isoterma de sorção (LABUZA apud WELTI, 1997). O conhecimento preciso dos valores de atividade de água e das isotermas de sorção dos alimentos é de grande importância, por estar relacionado com a estabilidade dos alimentos. Este conhecimento indica as condições nas quais os produtos alimentícios devem estar armazenados para aumentar a vida útil e servir como parâmetro de controle, durante o processamento dos alimentos, já que cada alimento tem um valor ótimo de atividade de água onde as reações de deterioração, sejam do tipo microbiológico, enzimático ou químico, são minimizadas.

As isotermas de sorção são representações gráficas ou analíticas de pressão

parcial de um componente, em equilíbrio com a sua concentração em um sólido, à temperatura constante, representando a umidade em função da atividade de água (SCOTT, 1957). Em geral, o método mais simples para ser obtida a isoterma de sorção de umidade de um alimento é submetê-lo a ambientes com umidade relativa controlada, à temperatura constante. Periodicamente, a medida do aumento ou a diminuição do peso é feita até atingir o equilíbrio. As características da isoterma de sorção são aplicadas nos alimentos, influenciando todos os aspectos do processo de secagem e estabilidade durante a estocagem dos produtos (LABUZA *et al.*, 1970). No caso das dietas de origem animal, elas são classificadas como alimentos semi-úmidos (atividade de água acima de 0,6) e apresentam curvas de isoterma do tipo sigmoidal ou tipo II (LABUZA e BELL, 2000).

Outra possibilidade da análise de atividade de água é permitir uma avaliação do crescimento de microorganismos. A análise de atividade de água já vem sendo aplicada na avicultura, no controle de patógenos como *Salmonella* sp. (OPARA *et al.*, 1992), (MATTICCK *et al.*, 2001), (HAYES *et al.*, 2000), *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (HIMATHONGKHAM *et al.*, 1999), *Campylobacter* sp. e *E.coli* (Industry Summary, 2002). Recentes trabalhos vêm sendo elaborados no controle de *Aspergillus flavus* através da atividade antifúngica (trans-2-hexagonal), considerando a atividade de água como importante fator (GARDINI *et al.*, 2001). Também tem sido investigado o potencial de formação de toxinas como fumonisinas, em diferentes valores de atividade de água, determinados pelo aparelho Thermoconstanter Novasina TH 200 (MARIN *et al.*, 1999), sendo este o mesmo equipamento que foi utilizado na dissertação.

Beauchat (1981) comenta sobre a influência da atividade de água na estabilidade microbiana. Segundo Bell e Labuza (1992), para muitos alimentos o crescimento microbiano é prevenido com atividade de água entre 0,6-0,7. A Tabela 1, demonstra a a_w mínima para o crescimento de diversos microrganismos e produção de toxinas.

Tabela 1 - Valores mínimos de atividade de água (a_w) para o crescimento e produção de toxina de patógenos de importância alimentar.

Microrganismos	a_w para crescimento	a_w para produção de toxinas
<i>Clostridium botulinum</i> (tipo E)	0,95-0,97	0,97
<i>Clostridium botulinum</i> (tipo A)	0,93-0,95	0,94-0,95
<i>Clostridium perfringens</i>	0,93-0,95	
<i>Salmonella sp.</i>	0,92-0,95	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	0,87-0,90 (enterotoxina A)
<i>P. veridicatum</i>	0,83	0,83-0,86 (ocratoxina A)
<i>A. parasiticus</i>	0,82	0,87
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,81- 0,85	0,87-0,90(ocratoxina)
<i>A. flavus</i>	0,78-0,80	0,83-0,87 (aflatoxina)
<i>A. ochraceus</i>	0,77-0,83	0,83-0,87 (ocratoxina A)
Bactérias halofílicas	0,75	
Bolores xerofílicos	0,65	
Fungos osmofílicos	0,60	

Fonte: adaptado por Beauchat, 1981.

A análise de atividade de água fornece valores que permitem maior controle de microrganismos na matéria-prima e produtos industrializados de origem animal, especialmente os agentes que assumem importância em termos de saúde pública como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, fungos toxigênicos, dentre outros. Cada microrganismo tem um valor ótimo de a_w onde se verificará o crescimento e a produção de toxinas.

O comportamento microbiano frente à a_w quanto à disponibilidade de água livre é extremamente variável, sendo as bactérias mais exigentes, em relação aos fungos e as leveduras. Os substratos com teor de atividade de água inferior a 0,6 estão dificilmente propícios ao crescimento microbiano e, a partir de 0,65, inicia a proliferação de microrganismos específicos, sendo que até 0,75, somente algumas bactérias halófitas, leveduras e fungos xerofílicos podem se desenvolver. Segundo Gock *et al.* (2003), que estudaram o efeito da a_w , do pH e da temperatura de germinação e crescimento de alguns fungos xerofílicos, o valor mínimo de a_w para a germinação é de 0,7.

Diante dos valores apresentados na Tabela 1, é possível generalizar que a a_w menor que 0,90 inibe usualmente o crescimento da maioria das bactérias patogênicas, com exceção do *S. aureus* que pode crescer a 0,86 a_w , em condições de aerobiose. A

contaminação por fungos ocorre em ampla faixa de crescimento, sendo capazes de tolerar níveis de a_w mais reduzidos, se comparados aos das bactérias. Para os microrganismos a a_w mínima para o seu crescimento é menor ou igual que a a_w mínima para a produção de toxina, sendo que na maioria dos agentes, a produção de toxinas ocorre dentro de valores de a_w consideravelmente maiores que os requeridos para o crescimento, especialmente no caso dos fungos promotores de micotoxinas. (ALZAMORA, 1984).

Existem diversas técnicas de determinação da a_w . Entretanto, todos os métodos empregados requerem fontes padrões de referência de pressão de vapor na faixa de interesse, para a calibração dos equipamentos. Utilizam-se soluções saturadas de sais, com a_w na faixa de 0,1 até 1,0 e o método pode ser direto ou indireto. O método indireto utiliza o Higrômetro Eletrônico de fibra e fundamenta-se na capacidade que a lâmina higroscópica de cloreto de lítio tem de alterar sua resistência elétrica ou condutância, pela mudança de umidade relativa, no espaço porta-amostra. Essa mudança de resistência é medida em termos de corrente elétrica, que atravessa o sensor, conectado ao potenciômetro, com uma escala calibrada em função da a_w (LEISTNER e RODEL, 1975). Dentre estes medidores destaca-se o equipamento Novasina Thermoconstanter Humitat, de fabricação suíça (FIGURA 2). Este aparelho, quando convenientemente calibrado com sais, proporciona medidas precisas, respondendo rapidamente às mudanças de umidade relativa (TROLLER e CHRISTIAN, 1978). O tempo de equilíbrio é em torno de 30 minutos e tem sido recomendado para medições da atividade de água em alimentos (PRIOR, 1979).



Figura 2 – Higrômetro eletrônico Novasina Thermoconstant Humitat

2.2 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por algumas espécies de fungos e capazes de produzir efeitos tóxicos em animais e no homem, dependendo dos níveis de consumo (GOZÁLEZ apud BULLERMANN, 1979). A formação do metabólito está sujeita ao controle fisiológico, que responde a fatores ambientais. Há muitas evidências que afirmam que na regulação fúngica, o metabolismo secundário tem menor prioridade que o crescimento (VINING, 1990). Este autor citou que quando um meio de cultura é rico em nutrientes balanceados, os microrganismos não realizam o metabolismo secundário ou têm o potencial reduzido.

Atualmente, cerca de 300 micotoxinas já foram isoladas. Contudo, as toxinas mais estudadas, e que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas, estando largamente distribuídas nos alimentos são as toxinas do ergot, aflatoxinas, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulinas, rubrotoxinas, esporodesminas e ácido ciclopiazônico (SCUSSEL, 1998). O autor comenta que em um Workshop realizado na Itália, em 1996, (Mycotoxins and Ficotoxins), foram citadas as cinco principais

micotoxinas e, dentre elas, destacava-se a aflatoxina.

As principais condições que favorecem o desenvolvimento dos fungos no armazenamento são os fatores intrínsecos e extrínsecos, que influenciam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas no substrato (ORRIS, 1999). Segundo este autor em documento da FAO, os fatores intrínsecos incluem atividade de água (acima de 0,7 a_w), pH, potencial redox, umidade do grão (acima de 13%), período de armazenamento, grau de contaminação, etc. Os fatores extrínsecos envolvem umidade relativa do ambiente, temperatura (ótima 25-30⁰ C) e disponibilidade de oxigênio. Alguns autores acrescentam outros fatores que podem influenciar na produção de micotoxinas, como composição do substrato, competição microbiana, danos causados por insetos e linhagem do fungo contaminante da planta (BULLERMAN *et al.*, 1984) (FRISVAD e SANSON, 1992).

Os cereais podem se contaminar por micotoxinas antes e durante o período de colheita, secagem e estocagem (CAST, 1989) e a ocorrência de aflatoxinas é alta em *comodities* como no caso do milho.

Lillehoj (1973) verificou que os níveis de umidade encontrados nas dietas dos animais são propícios para o crescimento de fungos e produção de micotoxinas. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram classificados pelo autor, como fungos que crescem na estocagem dos grãos. Ele também indicou que a produção máxima de aflatoxina desenvolve-se em temperaturas de 24 – 25 °C e umidade do alimento acima de 15%.

De acordo com Pollio *et al.* (1984), é mais seguro analisar o valor de a_w do grão ao ser armazenado do que o seu teor de umidade, sob o ponto de vista do controle ao desenvolvimento fúngico.

Os fungos toxigênicos são relativamente comuns e podem germinar, crescer e elaborar suas toxinas em uma grande quantidade de substratos, quando a umidade relativa, a temperatura e a aeração são favoráveis (PIER, 1973). Quando os fatores ambientais como a temperatura, se desviam dos pontos ótimos, diminui a resistência do organismo frente à a_w , aumentando o valor da a_w mínima para o crescimento (ALZAMORA, 1984).

Nos alimentos que oferecem adequado substrato aos fungos, o crescimento do micélio e a produção de aflatoxinas são controlados, primariamente, pela temperatura e pela atividade de água (MOLINA e GIANNUZZI, 2002). Nas três fases de crescimento fúngico, envolvendo germinação, crescimento e esporulação, a determinação de a_w e a

temperatura tornam-se de grande importância no estudo destes fungos e na habilidade de formação de micotoxinas (VUJANOVIC *et al.*, 2001). Estes mesmos autores citaram que os *Aspergillus nidulans*, *A. niger* e *A. ochraceus* dependem mais da temperatura do que da atividade de água para a esporulação. No caso do *A. flavus* e do *A. versicolor*, a ocorrência da esporulação é dependente das variações de temperatura e de a_w . Tsai *et al.* (1999) afirmaram que a a_w , além de influenciar o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas, também é responsável pela sua degradação. Também relatam que a maior produção de aflatoxinas no milho ocorreu em 0,92 a_w , comparando com a_w maiores que foram testadas.

Segundo a FAO (1997), os fatores primários que influenciam o crescimento fúngico em produtos alimentares estocados são a temperatura e a atividade de água. Na prática, em países tropicais, a temperatura é adequada ao crescimento fúngico, então a atividade de água torna-se o fator primário determinante à invasão e ao crescimento fúngico. Esta mesma organização preconiza a prevenção e controle de micotoxinas em grãos armazenados através da atividade de água e, por isso, a manutenção do valor de 0,7 a_w no grão é uma técnica efetivamente utilizada no mundo para o controle fúngico e produção de micotoxinas e preconizada pelo *Codex alimentarius* (2000).

Em trabalho realizado sobre a produção de aflatoxinas em dietas armazenadas no interior de aviários no Rio Grande do Sul, os resultados demonstraram que há forte tendência de produção de aflatoxinas após o armazenamento. A produção de aflatoxinas varia de 16 a 143%, dependendo do tempo de armazenamento das dietas e da estação do ano (SALLE *et al.*, 1995).

Nos aviários, a dieta com maior incidência de aflatoxinas é a do tipo inicial, pelo maior período de estocagem (LORENZINI, 1997). Este mesmo autor sugeriu que a monitoria dos programas de prevenção e controle de aflatoxina inicie pela detecção da toxina no organismo das aves e nas fontes potenciais de ingestão.

Em vista dos riscos que as condições inadequadas de armazenamento dos alimentos representam à saúde dos animais, e dos danos que elas acarretam, principalmente pelo crescimento fúngico e pela produção de micotoxinas, vários países se viram obrigados a empreender atividades de prevenção e controle. Devido a grande importância na área de saúde pública (IARC, 1993), pelos efeitos carcinogênicos, o controle das micotoxinas possivelmente constará nas exigências internacionais, incluídas nas barreiras sanitárias impostas pelos países importadores de produtos de origem animal, especialmente no setor avícola.

FAO (1999) implementou um programa de controle de micotoxinas baseado no sistema de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC). Este é um instrumento preventivo, tendo o controle verdadeiro sobre a segurança dos alimentos. É um sistema de controle de inocuidade dos alimentos, baseado na determinação e na evolução sistemática dos perigos e na definição dos meios de controlá-los. Dentre os princípios básicos, há o estabelecimento dos limites críticos para todos os pontos de controle. Segundo Benitez (2002), com o desenvolvimento efetivo do conceito APPCC no manejo integrado das micotoxinas, é prioritário considerar os fatores como clima, sistema agrônomo, técnicas de pré e pós-secagem. Além disso, o programa de controle de micotoxinas que utiliza o conceito de APPCC deve minimizar os níveis de micotoxinas em cada fase da produção. Exemplos de técnicas de controle incluem a mensuração da temperatura, do pH, da umidade e da atividade de água.

Dentro do conceito de APPCC, comentado por Benitez (2002), uma das etapas de maior controle deve ocorrer no campo, em que ocorre a contaminação primária por micotoxinas e que está determinada pelas seguintes condições: temperatura do ambiente, níveis de precipitação, umidade relativa, níveis de água livre disponível do produto (atividade de água), dentre outras.

Desta forma, pretende-se utilizar a análise de atividade de água, como o fator primário ao crescimento fúngico em alimentos armazenados. Esta análise será aplicada em amostras de dietas armazenadas em granjas avícolas, associada à medida da temperatura e da umidade relativa do ambiente onde o alimento estará exposto. Com os resultados serão determinados valores que serão utilizados como parâmetros para determinar as condições do sistema de armazenamento e para verificar o potencial de crescimento fúngico.

Esta técnica poderá ser incluída na avaliação de pontos críticos de controle no armazenamento do alimento, servindo como prevenção e controle dos fungos e toxinas de importância avícola e com reflexos na saúde pública.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Integração e criadores

Uma integração avícola do Estado do Rio Grande do Sul participou deste experimento, envolvendo 20 integrados. Foram coletadas amostras de dietas comerciais, da fase inicial, farelada, de frango de corte, procedentes da fábrica e do último dia de estocagem do alimento nas granjas.

3.2 Armazenagem do alimento

A integração avícola possui um sistema de armazenamento diferenciado das dietas, conforme o tipo de alimento. A dieta inicial foi escolhida para o experimento devido ao seu maior tempo de permanência no interior do aviário, representando o alimento mais propício à contaminação. Ela permanece em torno de 10 dias estocada. A dieta nestas 20 granjas selecionadas dentro de um município, é armazenada em silos de madeira e, posteriormente distribuída em comedouros tubulares (FIGURA 3).

3.3 Composição da dieta inicial

As diferentes amostras de dieta inicial foram provenientes de uma mesma fábrica e as especificações dos níveis nutricionais foram de 21,5 % de proteína bruta, 5,8 % de extrato etéreo, 12% de umidade, 3,3% de fibra bruta, 5,9% de cinzas e sem adição de adsorvente.



Figura 3 – Silos de madeira e comedouros tubulares no interior dos aviários.

3.4 Periodicidade das análises

As análises foram realizadas durante três estações do ano, iniciando as coletas na primavera de 2002 e, posteriormente no verão e no outono de 2003. No outono, a análise das dietas coincidiu com a transição da estação outono e inverno.

As amostras de dieta inicial foram coletadas na saída do alimento da fábrica, ao longo do carregamento do caminhão (FIGURA 4) e no décimo dia de permanência na granja, que corresponde ao último dia de armazenamento deste produto, onde as amostras foram retiradas de todos os comedouros do galpão, representando a qualidade do alimento consumido pelo animal (FIGURA 5).



Figura 4 – Coleta da ração na fábrica, durante o carregamento do caminhão.



Figura 5 – Coleta da ração na granja, retirada dos comedouros.

3.4.1 Sistema de amostragem

O método de coleta das amostras foi o proposto por Fonseca (1991), de acordo com a fórmula $N=8\sqrt{n}$, para dietas à granel, sendo:

N=número de pontos de onde devem ser retirados 400g da dieta;

n=número de toneladas do alimento.

Durante o carregamento dos caminhões foi tomada amostra de 400g. Essa quantidade foi homogeneizada, sendo dela coletada amostra de 200g.

No último dia de estocagem do alimento nas granjas, foram retiradas amostras de dieta de todos os comedouros, de forma a totalizar 4 Kg. Dessa quantidade após homogeneização, foi coletada uma amostra de 200g.

3.4.2 Medição de temperatura e da umidade relativa do ambiente

Em todos os procedimentos de coleta das amostras das dietas, tanto na fábrica quanto na granja, foram aferidas a temperatura ambiental e a umidade relativa, com auxílio de termohigrômetro. Os dados meteorológicos dos meses de coletas foram obtidos através da Estação Agroclimatológica da Embrapa Uva e Vinho, de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul (ANEXO 1).

3.4.3 Acondicionamento das amostras das dietas

As amostras foram acondicionadas em embalagens apropriadas e colocadas em isopor, para que não propiciassem trocas de umidade e não modificassem a atividade de água do alimento. Os materiais foram encaminhados ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, para a realização das técnicas laboratoriais.

3.5 Análise de atividade de água

Foi realizada a análise de atividade de água, em cada uma das amostras das dietas, em duplicatas, utilizando o aparelho Novasina Thermoconstant TH200. O aparelho dispõe de lâmina higroscópica de cloreto de lítio, que tem de alterar sua resistência elétrica ou condutância, fornecendo a umidade relativa (a_w), conforme Mossel *et al.* (1955). A acurácia do instrumento depende da calibração com soluções de sais saturados, para estabelecer curva de calibração padrão (LEINSTNER e RODEL., 1975). As amostras de camas dos aviários também foram coletadas e foi verificada a atividade de água.

3.6 Coleta da cama do aviário

Amostras de camas foram coletadas aleatoriamente ao longo do aviário. Foi verificada a umidade e a atividade de água deste material.

3.7 Umidade das dietas

Em todas as amostras foi realizada a determinação da umidade. Foram utilizados 30 gramas e colocadas em envelopes de papel pardo. Este material foi colocado em estufa a 110 °C, durante 12 horas. Após este procedimento, as amostras foram novamente pesadas. O cálculo de umidade é $\% \text{ água} = 100 \cdot (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}$ (AOAC, 1984). Também foi realizado o mesmo procedimento para as amostras de camas dos aviários.

3.8 Isoterma de adsorção

As amostras das dietas coletadas em cada estação foram submetidas à técnica de isoterma de sorção, descrita por Bell e Labuza (2000), para análise das condições de armazenamento. Este procedimento fundamenta-se em colocar o alimento, com prévia extração da umidade, em ambientes com diferentes umidades relativas à temperatura constante, verificando-se o aumento de peso da amostra até atingir o equilíbrio. Primeiramente foi feita a secagem das amostras até obter umidade de 1,8%. Deste material foi pesado 3 g da dieta, em triplicata, acondicionada em dessecadores com sais saturados de diferentes umidades relativas e temperaturas de 25° C e 30° C. Para a obtenção dos diferentes valores de atividade de água (umidade relativa), conforme Tabela 2. Os sais foram selecionados pelo valor de atividade de água de interesse no trabalho, no intervalo de 0,45 a 0,98, sendo mais propícios ao desenvolvimento de microrganismos. As amostras foram pesadas no intervalo de 7 dias até obter estabilidade (não aumentar mais que 2 mg/g de peso). A umidade final foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ água} = 100 \cdot (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial} \text{ (BELL e LABUZZA, 2000).}$$

Para todos os procedimentos de medição do ganho de umidade, também foi realizada a atividade de água das amostras.

Tabela 2 - Atividade de água dos sais saturados utilizados, à temperatura de 25 e 30 °C.

Sais, a_w	Temperatura	
	25 °C	30°C
Carbonato de potássio	0,432	0,432
Iodeto de potássio	0,689	0,679
Cloreto de sódio	0,753	0,751
Cloreto de potássio	0,843	0,836
Nitrato de potássio	0,925	0,920
Cloreto de cálcio	0,987	0,987

3.9 Detecção de aflatoxinas

As concentrações de aflatoxinas nas rações foram determinadas através do ensaio imuno-enzimático (ELISA) rápido para análise quantitativa de aflatoxina, da empresa Biopharm®. 24 amostras das dietas foram selecionadas para a realização das análises.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados e interpretados por métodos estatísticos, utilizando os softwares Statistics® versão 6.0, Minitab® e SAS (versão 6.1, SAS Institute Inc. ®). A análise estatística deste experimento foi feita através de Análise de Variância, complementado com o teste Tukey. Na análise de variância, foram considerados os locais (fábrica e granja) como variável independente e a_w total como variável dependente. Para elucidar os valores encontrados de atividade de água em relação a outras variáveis estudadas, como estação do ano, locais (fábrica e granja), propriedade e umidade extraída da dieta, foi empregado um modelo matemático utilizando o experimento fatorial, tendo como bloco a propriedade e como fatores o local (fábrica e granja) (locfg) e a estação (estac). A umidade (Umrac) ficou como variável contínua.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade de Água

Pelos resultados encontrados, ficou confirmada a hipótese de aumento da atividade de água após o período de armazenamento da dieta. No entanto, os valores de atividade de água não estavam inseridos nos limites mínimos de crescimento fúngico e produção de aflatoxinas, como mostra a Figura 6.

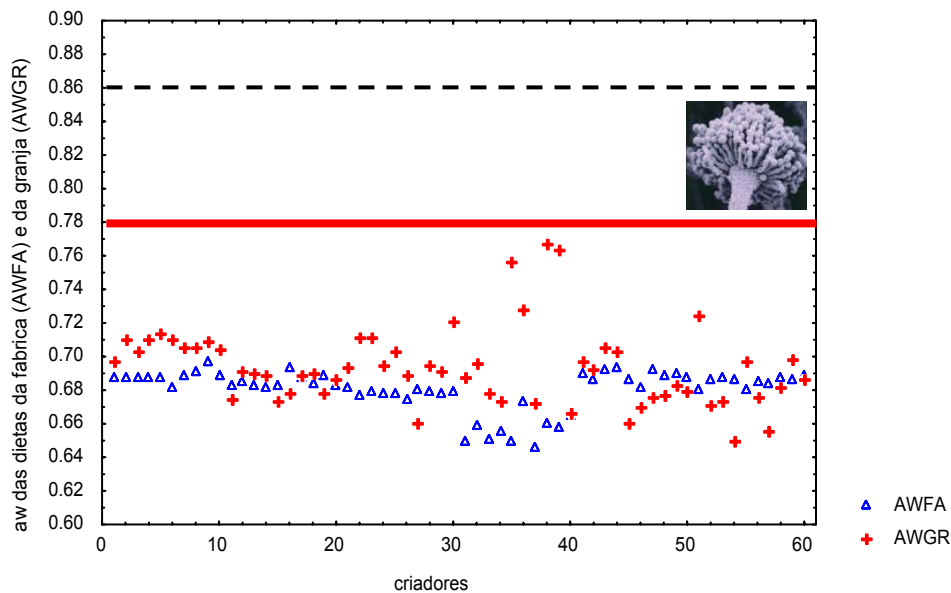


Figura 6 - Valores de atividade de água da dieta, encontrados na fábrica (a_w FA) e na granja (a_w GR), evidenciando na linha contínua, o valor mínimo de crescimento do *A. flavus* e na linha tracejada, o valor mínimo para a produção de aflatoxina.

Os valores de atividade de água das dietas coletadas na granja, após o armazenamento, apresentaram aumento médio significativo ($p < 0.001$) em relação à atividade de água verificada na fábrica, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade de água (a_w) nas rações de integração avícola do Rio Grande do Sul, antes (fábrica) e após o armazenamento (granja), em três diferentes estações.

a_w	ESTAÇÕES			
	PRIMAVERA	VERÃO	OUTONO	TOTAL
	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)
FÁBRICA	0,686 ^{aA} (0,03)	0,668 ^{aA} (0,13)	0,687 ^{aA} (0,35)	0,681 ^a (0,12)
GRANJA	0,695 ^{aA} (0,13)	0,703 ^{bB} (0,31)	0,681 ^{aC} (0,21)	0,693 ^b (0,24)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$). Letras diferentes maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Todos os resultados apresentaram pequeno desvio padrão. Pode ser verificado que apenas no outono não houve aumento de atividade de água após o período de armazenamento se comparado com a granja, ao contrário das estações primavera e verão.

A Tabela 4 demonstra o modelo matemático utilizando os valores encontrados de atividade de água em relação a outras variáveis estudadas, como estação do ano, locais (fábrica e granja), propriedade e umidade extraída da dieta, tendo como bloco a propriedade e como fatores o local fabrica e granja (locfg) e a estação (estac). A umidade (Umrac) ficou como variável contínua.

Tabela 4 – Dados das diferentes variáveis estudadas, utilizando análise de variância, em delineamento de blocos casualizados com arranjo fatorial.

Variáveis	GL	SQ	QM	F	p
propriedade	19	25.4	1.3	0.74	0.77
Locfg	1	8.5	8.5	4.68	0.03
Estac	2	12.1	6.0	3.33	0.04
Umrac	1	13.7	13.7	7.57	0.01
Umrac . locfg	1	11.2	11.2	6.19	0.01
estac . locfg	2	28.4	28.4	7.83	0.01
Umrac. estac	2	14.4	14.4	3.98	0.02
Erro	91	164.9	1.81		

Observando os dados da Tabela 4, é possível verificar que não houve diferença significativa entre as propriedades.

Analisando o modelo, houve diferença entre locais (fábrica e granja), conforme a estação do ano e esta diferença entre locais ocorreu na segunda estação, isto é, a a_w no verão aumentou significativamente na granja em relação à fábrica. Nas outras duas estações não houve diferença significativa. Na fábrica, não há diferença entre as estações e na granja. As diferenças significativas estiveram presentes nas estações 1 e 2 e 2 e 3.

Houve interação entre a estação do ano e umidade da dieta. A atividade de água na fábrica esteve relacionada com umidade da fábrica em uma ou mais estações.

A umidade da dieta está relacionada com a_w , conforme estação e local. Esta relação ocorre na fábrica e na granja, sendo a estação verão e o local granja, mais relacionado com atividade de água.

A umidade extraída das dietas apresentou resultado descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Médias e desvios padrões da umidade da ração conforme o local e estação.

	ESTAÇÕES			
	PRIMAVERA	VERÃO	OUTONO	TOTAL
Umidade (%material seca)	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)
FÁBRICA	13.1 ^{aA} (0.5)	10.4 ^{bA} (1.3)	12.9 ^{aA} (0.4)	12.1 (1.5)
GRANJA	12.8 ^a (0.5)	11.2 ^{bB} (1.1)	12.0 ^{cB} (0.7)	12.0 (1.3)
TOTAL	13.0 (0.5)	10.8 (1.3)	12.4 (0.7)	12.1 (1.3)

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa ($p < 0.05$).

Foi determinada a equação de regressão, tendo como modelo: $a_w = \text{local} + \text{umidade} + \text{local} * \text{umidade}$ (covariável), independente da estação, obtendo os gráficos para a fábrica (FIGURA 7) e para a granja (FIGURA 8).

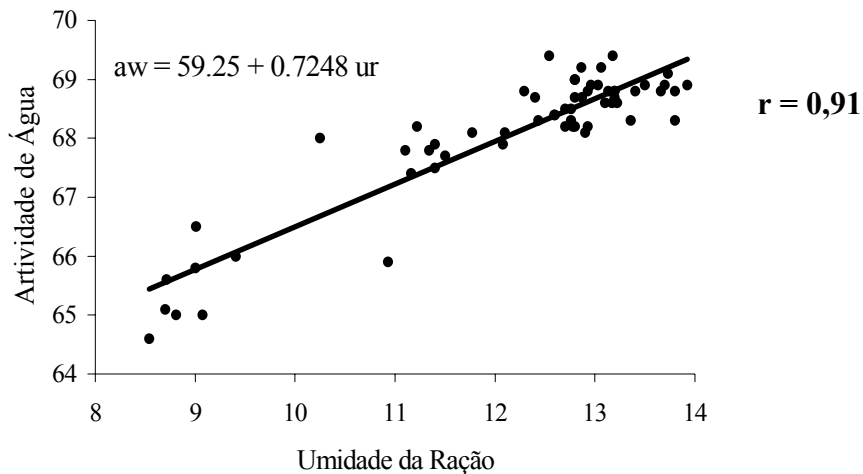


Figura 7 – Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água (%URH) em relação à umidade na fábrica sem considerar a estação.

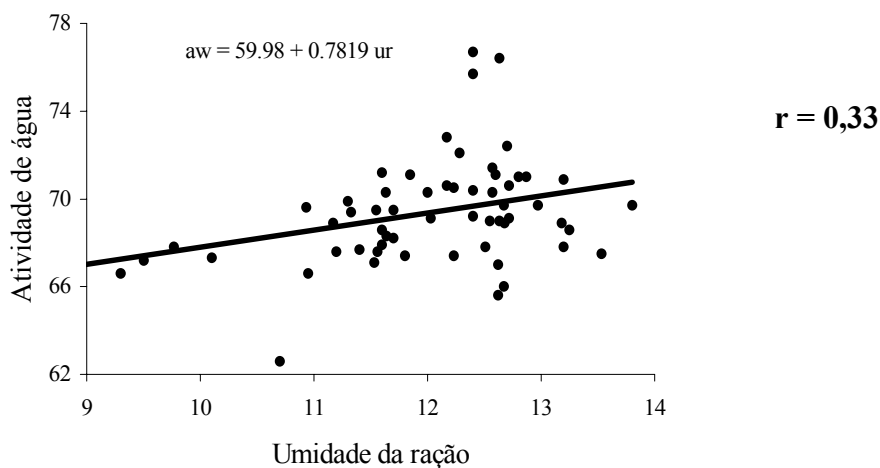


Figura 8 - Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água (%URH) em relação à umidade na granja sem considerar a estação.

Observando a Figura 7, sem considerar a estação, pode ser estimado que a a_w aumenta 0,72 unidades para cada percentual de umidade da dieta na fábrica. Na Figura 8, a a_w aumenta 0,78 unidades para cada valor em percentual de dieta da ração na granja.

Outra equação de regressão determinada foi utilizando o modelo empregado anteriormente, porém incluindo a estação do ano. Foram obtidos os gráficos para a estação verão (FIGURA 9) e outono (FIGURA 10). Na primavera o resultado não foi significativo, isto é, a a_w não esteve relacionada com a umidade da dieta, tendo a equação $a_w = 75,95 - 0,528$ umidade da dieta.

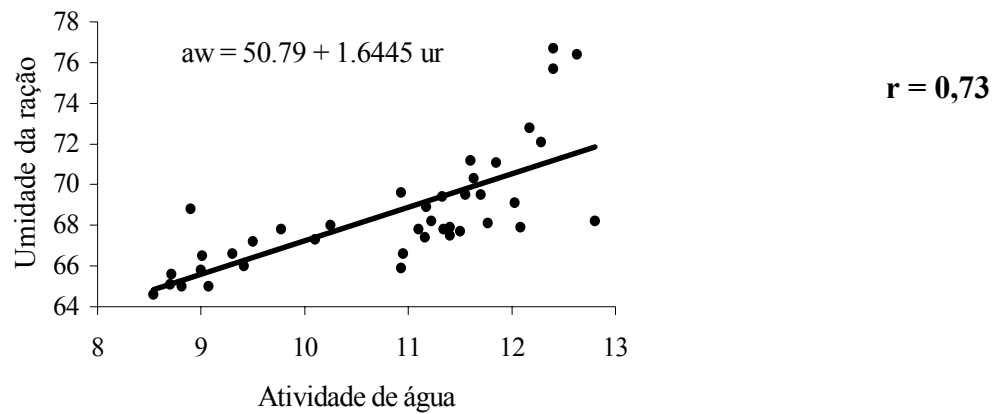


Figura 9 - Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água em relação à umidade no verão, incluindo os valores obtidos na fábrica e granja.

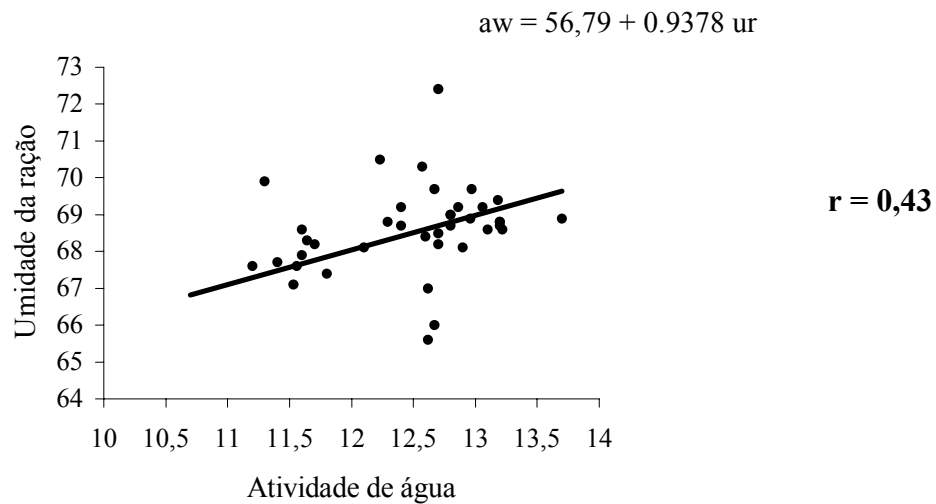


Figura 10 - Gráfico e equação de regressão mostrando o aumento da atividade de água em relação à umidade no outono, incluindo os valores da fábrica e granja.

Alguns dados coletados no experimento, contidos na Tabela 6, foram testados no modelo matemático, na condição de covariáveis e não apresentaram resultados com diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 6 – Média e desvio padrão dos dados de temperatura e umidade do ambiente, atividade de água e umidade da cama do aviário nas diferentes estações no ano.

VARIAVEIS	PRIMAVERA	VERÃO	OUTONO	TOTAL
	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)	\bar{y} (S)
TEMPERATURA	29.5 ^a (3.4)	31.3 ^a (2.1)	20.4 ^b (3.5)	27.0 (5.7)
UMIDADE	58.0 ^a (8.6)	55.7 ^a (6.1)	51.3 ^a (7.9)	55.0 (8.0)
a _w CAMA	95.6 ^a (4.0)	90.8 ^b (4.3)	97.6 ^a (2.7)	94.6 (4.7)
UM CAMA	30.5 ^a (5.9)	26.1 ^b (3.0)	33.4 ^a (5.2)	30.0 (5.7)

Letras minúsculas diferente na mesma linha indicam diferença significativa (p<0.05).

4.2 Detecção de aflatoxinas

O método de ELISA para aflatoxina foi utilizado em 24 amostras de dietas coletadas na fábrica e na granja.

A quantidade de aflatoxina encontrada nas amostras da fábrica obteve média de 1,32 ppb de aflatoxinas e desvio padrão de 0.6. A média de aflatoxinas encontrada na granja foi de 10,4 ppb e desvio padrão de 12,9.

Não houve correlação entre atividade de água e quantidade de aflatoxinas encontradas nas amostras testadas.

4.3 Isoterma de Adsorção

A Figura 11 representa graficamente a isoterma de adsorção, demonstrando os teores de umidade da dieta nas diferentes condições de umidades relativas (atividades de água). Foram necessários 14 dias para estabilizar as amostras, isto é, sem alteração no peso das dietas.

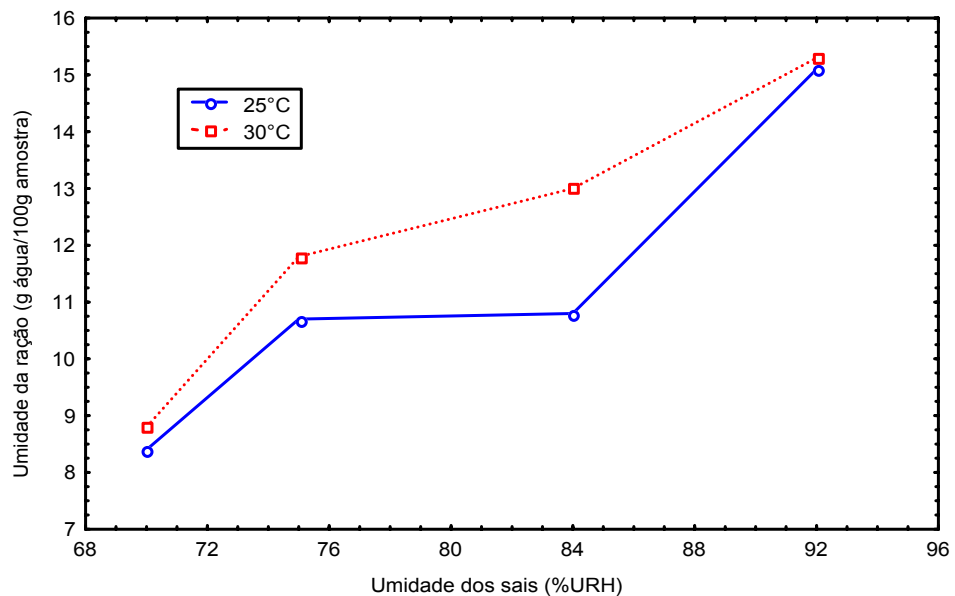


Figura 11 – Gráfico da isoterma de adsorção das dietas inicial de frango de corte, a 25 °C e 30°C.

Com os resultados obtidos pode ser verificado que houve ganho de umidade por adsorção em todos os casos, com a formação de curva sigmóide, correspondendo ao grupo dos alimentos do tipo II.

No dessecador com sal que apresentava umidade relativa de 97%, houve dificuldade para as amostras atingirem o equilíbrio com o ambiente, sem que sofresse deterioração (contaminação fúngica) no processo. Por esta razão, abandonou-se esta umidade. As dietas contaminadas apresentaram 47% de umidade e atividade de água de 0,94.

A Figura 12 mostra os valores obtidos de atividade de água em dessecadores de diferentes valores de umidade relativa (atividade de água). Os resultados obtidos pelos valores de atividade de água e umidade (Figura 11) das dietas apresentaram um gráfico com o mesmo comportamento linear.

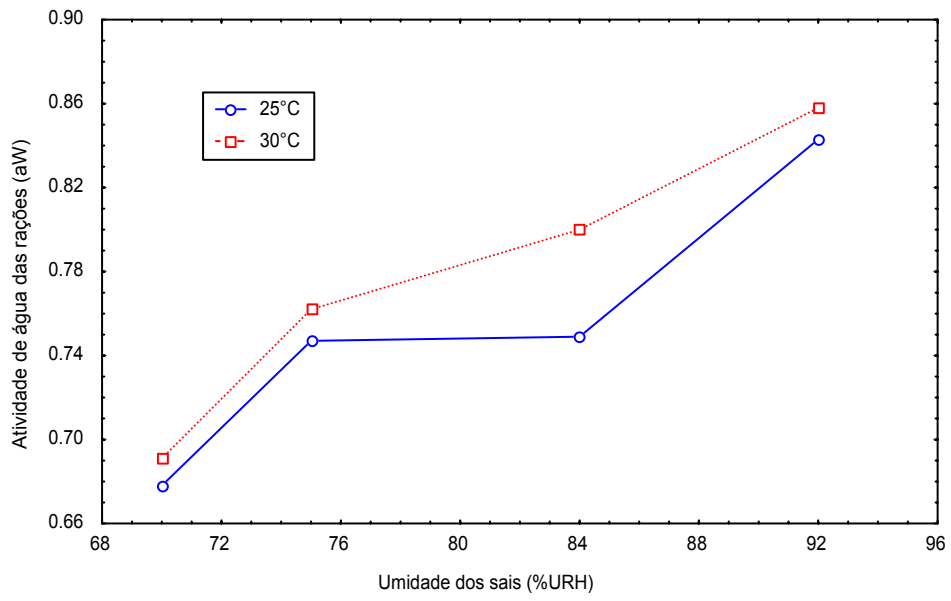


Figura 12 – Gráfico da isoterma de adsorção das dietas, a 25 °C e 30 °C, medindo a atividade de água das amostras.

5 DISCUSSÃO

Ao serem analisados os dados de atividade de água do presente estudo, houve aumento médio significativo da atividade de água da dieta após o período de armazenamento, sendo um importante fator que contribui ao desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas. De acordo com Smith e Hamilton (1970), o maior período de estocagem da dieta contribui para o aumento da contaminação por micotoxinas, possivelmente influenciado pelo aumento da atividade de água deste produto. Salle *et al.*, (1995). Também observaram que houve tendência de produção de aflatoxina após o armazenamento. Apesar de não utilizar a técnica de atividade de água durante o seu experimento os autores suspeitaram que os valores de atividade de água das dietas analisadas após o armazenamento, também estariam maiores, se comparados com as dietas na fábrica.

Os dados de atividade de água obtidos pelas amostras das dietas não estiveram dentro do valor considerado mínimo ao crescimento fúngico e a produção de aflatoxina, tendo o valor mínimo de atividade de água das dietas analisadas em 0,62 a_w e máximo 0,76 a_w . Estes resultados estiveram dentro do intervalo de 0,65 a 0,75 a_w , em que inicia a proliferação de bactérias halófitas, leveduras e fungos xerofílicos (BEAUCHAT, 1983).

As amostras de dietas foram testadas no método de ELISA para detecção de aflatoxina, sendo positivas para a toxina e apresentando aumento no valor médio e desvio padrão após o armazenamento. Este aumento de aflatoxina não é justificado já que os valores de atividade de água das amostras de dietas, não estavam dentro dos valores mínimos ao crescimento fúngico e à produção da toxina. No entanto, não há como afirmar se a aflatoxina encontrada já tinha sido produzida no milho, antes deste grão ser processado na fábrica de ração (colheita e secagem) e durante o intervalo de estocagem da ração ou problema na metodologia da amostragem das dietas.

No período de coleta das dietas, as temperaturas estavam dentro dos valores de 24 e 25 °C (Anexo 1), considerados ótimos ao fungo e tendo grandes oscilações.

O aumento significativo da a_w em locais (fábrica e granja) durante o verão de 2002, ao analisar o modelo, pode ser explicado pelo maior índice pluviométrico no período estudado, conforme dados da EMBRAPA, 2003 (ANEXO 1). Este resultado coincidiu com o proposto por Benitez (2002) que relatou que os níveis de precipitação

são um dos fatores que influenciam a contaminação primária por micotoxinas. Desta forma, é possível afirmar que a estação do ano foi influenciada pela umidade relativa e atividade de água. Portanto, o período de maior risco ao aumento da atividade de água da dieta e ocorrência de micotoxinas e, que merece maior controle preventivo, ocorre em períodos de aumento da umidade relativa do ambiente e, esta umidade está associada também à temperatura do ambiente e umidade do alimento.

Houve uma relação positiva entre a a_w e umidade da ração, tanto na fábrica quanto na granja. Na fábrica, em virtude da maior homogeneidade da ração, houve relação linear positiva de a_w e umidade, em relação à granja, que apresentou maior dispersão de pontos. A relação de a_w e umidade da ração foi mais evidente na estação verão.

Segundo Pollio (1984), é mais interessante o valor de a_w em relação à umidade, em termos de controle. Entretanto os modelos gerados no experimento discordam desta afirmativa, já que houve correlação de a_w e umidade e esta umidade pode ser parâmetro em relação à atividade de água.

Os dados que foram obtidos no experimento e que não foram significativos no modelo, podem ter sido afetados pelas variações de temperatura e umidade ao longo do intervalo de 10 dias e pela forma de coleta destes dados (no primeiro e no último dia de estocagem).

A cama analisada para a a_w e umidade, que hipoteticamente poderia ter alguma influência sobre o ambiente e interferir nos valores encontrados na dieta, não tiveram correlação. Este fato pode ser devido à uniformidade das granjas no manejo das camas.

Com este trecho de isoterma traçado, foi estabelecida a relação entre o teor de umidade da dieta e umidade relativa (atividade de água). Por outro lado, apesar das descrições na literatura de diminuir a atividade de água com o aumento da temperatura, nas umidades relativas estudadas, acima de 70%, houve inversão do efeito da temperatura. Este fenômeno também foi observado por Brandelli *et al.* (2000) que atribui estes resultados ao fato do alimento ter altos teores de açúcar e carboidratos. No entanto, para confirmar o ponto da inversão do efeito da temperatura, seria necessária a inclusão de outros sais de atividade de água menor.

Molina e Giannuzzi (2002), relataram que modelos matemáticos podem ser usados para prever o crescimento fúngico, mas para formação de toxina torna-se difícil, devido à dificuldade de compreender a regulação do metabolismo secundário.

Desta forma, os resultados encontrados de atividade de água foram importantes para a melhor compreensão das condições de armazenamento da dieta e os possíveis riscos de aflatoxinas. Portanto, a atividade de água é apenas uma ferramenta de monitoria dos alimentos e que pode ser inserida dentro de um programa amplo, envolvendo diversos fatores, com critérios fundamentados de prevenção e controle.

6 CONCLUSÕES

1. Houve aumento no valor de atividade de água da ração analisada, após o período de armazenamento, comparando a ração coletada na fábrica e a ração coletada na granja, correspondendo ao seu último dia de estocagem.
2. Os valores de atividade de água das rações não estiveram inseridos dentro do limite mínimo ao crescimento fúngico e produção de aflatoxinas.
3. Foi verificada a produção de aflatoxina (ppb) nas rações que apresentaram maior valores de atividade de água da ração.
4. Houve correlação linear positiva entre atividade de água e umidade da ração, tanto na fábrica como na granja.
5. A isoterma de adsorção da ração apresentou aumento da umidade com aumento da temperatura em atividade de água maior do que 0,60.
6. Não foi possível caracterizar a correlação entre a_w e níveis de aflatoxina encontrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZAMORA, S. M. **Preconservação de frutas por métodos combinados**. Apresentado no Congresso Mundial de Tecnologia de Alimentos, Buenos Aires-Argentina, 1984.

AOAC – Official Methods of Analyse 17 th edition . Washington Association of Official Analytical Chemists, 1984.

ASGAV – Associação Gaúcha de Avicultura. Disponível em: <<http://www.asgav.com.br>> Acesso em: 20 jul. 2003.

BEAUCHAT, L. R. Influence of a_w on growth, methabolic activities and survival of yeasts and molds. **J. Food Protect.**, Ames, 46:135-41, 1983.

BEAUCHAT, L. R. Microbial stability as affected by water activity. **Cereal Food World**. n.26, p. 345-349, 1981.

BELL, L. N.; LABUZA, T. P. Composition influence on the pH of reduced-moisture solutions. **Journal Food Science**. 57: 732-734, 1992

BELL, L. N.; LABUZA, T. P. **Moisture sorption Pratical Aspects of Isotherm Measurement and Use**. Second edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. 122p., 2000.

BENÍTEZ, J. Manejo Integrado de Micotoxinas utilizando el concepto análisis de peligros y puntos de control críticos. **Industria Avicola**, Noviembre, p. 24-30, 2002.

BRANDELLI, A.; ZAPATA, C. P.; CARDENAS, M. L. Sorption Isotherm equation of potato flakes and sweet flakes. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.3, p. 53-57, 2000.

BULLERMAN, L. B.; SCHROLDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protect**. v. 47, n.8, p-637-646, 1984.

CODEX ALIMENTARIUS. FAO. Proposed draft code of practice for the prevention contamination by Ochratoxin A in cereals. 2000.

DALVI, R. R.; MCGOWAN, C. Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chicken by purified aflatoxin B1 and its reversal by activated charcoal, phenobarbital, and reduction glutathione. **Poultry Science**, v.63, p.485-491, 1984.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Dados meteorológicos. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/dmettab.html> > Acesso em: 08 jul. 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Recommended practices for the prevention of mycotoxins in food, feed and their products**. Roma, 1979, p.29-32 (FAO Food and Nutrition paper n. 10).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Reduccion al minimo de los riesgos que plantean las micotoxinas mediante la utilización del concepto de HACCP**. Terceira Conferencia Internacional FAO/OMC/PMA sobre micotoxinas. Food, Nutrition and Agriculture, Rome. Disponível em: < <http://www.fao.org> > Acesso em 15 jun.2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Wordwide regulations for mycotoxins 1995 – A compedium**, Junho de 1997. Disponível em: < <http://www.fao.org/infho.vlibrirv/x0008e/x0008e01.htm> > Acesso em: 20 abr. 2002.

FONSECA, H. **Sistema de Amostragem para Análise de Aflatoxinas**. Rev. Microbiol., São Paulo, Brasil, v. 21, n.2, p. 66 – 70, 1991.

FRISVAD, J. C.; SANSON, R. A. Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. In: **Handbook of Applied Mycology: “Mycotoxins in Ecological Systems”**. New York: Marcel Dekker, v. 5, p.32-57, 1992.

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E. Effect of trans-2-hexenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature and water activity. **Lett. Appl. Microbiology**. July, v.33, p. 50-55, 2001.

GOCK, M. A.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; POULOS, P. G. Influence of temperature, water activity and pH growth of some xerophilic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 11-19, 2003.

GOULD, G. W. Osmoregulation is the cell just a simple osmometer? The microbiological experience. In: **A Discussion Conference: Water Activity: A credible measure of technological performance and physiological viability**. Faraday Division, Royal Society of Chemistry, Girton College, Cambridge, England, July 1-3, 1985.

HAYES, J. R.; CARR, L. E.; MALLINSON, E. T.; DOUGLASS, L. W.; JOSEPH, S. W. Characterization of the contribution of water activity and moisture content to the population distribution of *Salmonella* spp. In commercial poultry houses. **Poultry Science**. n.79, p. 1557-1561, 2000.

HIMATHONGKHAM, S.; NUANUALSUWAN, S.; RIEMANN, H. Survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in chicken manure at different levels of water activity. **Microbiology Lett.** n. 172, p. 159-163, 1999.

HOERR, F. J. Mycotoxicosis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, J. H.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, Jr., H. W. (Eds.) **Diseases of Poultry**, Iowa: Iowa State University Press, p. 884-915, 1991.

IARC. **Monographs** on the evolution of carcinogenic risks to humans. Lyon. v.56: Some naturally occurring substances: foods items and constituents heterocyclic aromatic

amines and mycotoxins, p.245-524, 1993.

INDUSTRY SUMMARY. Disponível em:

< <http://www.vmtc.ucdavis.edu/poultry/industry.html> > Acesso em: 01 abr. 2002.

LABUZA, T. P.; BELL, L. N. **Moisture Sorption: Pratical Aspects of Isotherm Measurement and Use.** 2^a ed. 122p., 2000.

LABUZA, T. P.; TANNENBAUM, S. R.; KAREL, M. Water content and stability of low-moisture and intermediate-moisture foods. **Food Technology.** p. 543-550, 1970.

LEINSTNER, L., RODEL. W. **The significance of water activity for micro-organisms** in meat. In: R. B. Duckworth (ed.). Water relation of foods. Academic Press, London. p.309-333, 1975.

LILLEHOJ, E. B. Feed sources and condition conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, fusarion toxins, and zearalenone. **J.A.V.M.A.**, v.163, n.11, p.1281-1284, 1973.

LORENZINI, Gustavo. **Presença de aflatoxinas no alimento, cama e fígados de frangos de corte e sua correlação com parâmetros de produção.** Porto Alegre: UFRGS, 1997. p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MARIN, S.; MAGAN, N.; SERRA, J.; RAMOS, A. J.; CANELA, R.; SANCHES, V. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat and barley grain. **Food Microbiology and Safety.** V.64, n.5, p. 921-924, 1999.

MATTICK, K. L.; JORGENSEN, F.; WANG, P.; POUND, J.; VANDEVEN, M. H.; WARD, L. R.; LEGAN, J. D.; SCOTT, H. M.; HUMPHREY, T.J. Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of salmonella at low water activity. **Appl. Envirom. Microbiology**, September, p. 4128-4131, 2001.

MOLINA, M.; GIANNUZZI, L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. **Food Research International**, v. 35, p. 585-594, 2002.

MOSSEL, D.A.A.; KUIJK, H.J.L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. **Food Research International**, v. 20, p. 415 – 423, 1955.

NETO, R. A. T.; DENIZO, N.; QUAST, D. G. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos.** V.7, p. 191-206, 1976.

OPARA, O. O.; CARR, L. E.; RUSSEKCOHEN, E.; TATE, C. R.; MALLINSON, E. T.; MILLER, R. G.; ETEWART, L. E.; JOHNSTON, R. W.; JOSEPH, S. W. Correlation of water activity and other environmental condicions with repeated detection of *Salmonella* contamination on poultry farm. **Avian Disease**, v.635, Apr-Jun,

37, 1992.

ORRIS, G. D. Animal Diseases of Public Health Importance. Food and Agriculture **Organization of the United Nation (FAO)**, Rome, Italy, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/incid/eid/vol3no4/orris.htm>> Acesso em: 20 marc. 2002.

PIER, A. C. An Overview of the Micotoxicosis of Domestic Animals. **J. A. V. M. A.**, v. 163, n.11, 1973.

POLLIO, M. L.; CHIRIFE, J.; RESNIK, S. L. Adsorption isotherm argentinischer sorten von Sonnenblumensamen. **Z. FL.** 6/: 480-483, 1984.

PRIOR, B. A. Measurement of water activity in food: a review. **Jornal of Food Protection**, v.42, p.668-674, 1979.

SALLE, C. T. P.; RODRIGUES, O.; LORENZINI, G.; WENDELSTEIN, A. C.; MORAES, H. L. S.; SILVA, A. B.; GUAHYBA, A. Diagnósticos de aflatoxicose em frangos de corte do sul do Brasil e sua associação com outras enfermidades das aves, durante os anos de 1992 a 1994. In: **CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA. 1., ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS**, 8., 1994, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Centro de Micologia e Micotoxicologia – UFRRJ, 1994 . p.32 – 35.

SANTOS, I. Experiências no uso de adsorventes de micotoxinas no Brasil. **Pork World**, n. 8, p. 34-37, 2002.

SCOTT, W. J. Water relation of food spoilage microorganisms. **Adv. Food Res.** 7: 83-127, 1957.

SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em alimentos. p. 19 – 22, 1998.

SMITH, J.W.; HAMILTON, P.B. Aflatoxicosis in the broiler chicken. **Poultry Science**, v. 49, p.207-215, 1970.

TROLLER, J. A.; CHRISTIAN, J. H. B. Water Activity and Food - **Food Science and Technology** - A series of monographs. Academic Press. London, 1978.

TROLLER, J. A.; Trend in research related to the influence of “water activity” on microorganisms in food. **Appl. Environ. Microbiology**, May; 53: 1142-1146, 1987.

TSAI, G. J.; YU, S. C. Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by an enzyme-linked immunosorbent assay. **International Journal of Food Microbiology**. n.50, p.181-189, 1999.

VINING, L. C. Function of secondary metabolites. **Rev. Microbiology**, v.44, p.395-427, 1990.

VUJANOVIC, V.; SMORAGIEWICZ, W.; KRZYSZTYNIAK, K. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. **Environ. Toxicol.** Institite de recherche en biologie vegetable

et Departament de sciences biologiques. v.16, p. 1-8, Universite de Montreal, Quebec, Canada, 2001.

WELTI, J. ; VERGARA, F. Atividade de água / Conceito y aplicación em alimentos com alto contenido de humedad. In: AGUILERA, J. M. **Temas en Tecnologia de Alimentos**. Santiago – Chile, v.1, p.11-26, 1997.

ANEXO

Dados meteorológicos da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brasil no ano de 2002 e 2003.

Coordenadas Geográficas da Estação: Latitude: 29°09'44" S
Longitude: 51°31'50" W
Altitude: 640m

Mês	Temperatura do ar (°C)			Precipitação Pluviométrica (mm)	Dias de precipitação (número)	Umidade relativa do ar (%)
	Média	Máxima	Mínima			
Setembro 2002	14,0	19,7	9,4	171,6	13	72
Outubro 2002	19,1	23,6	15,1	417,8	19	81
Novembro 2002	19,9	25,1	15,4	185,1	13	74
Dezembro 2002	21,1	26,1	16,9	209,9	14	78
Janeiro 2003	22,1	27,6	17,6	166,1	10	76
Fevereiro 2003	22,6	27,9	18,6	305,8	18	80
Março 2003	20,8	26,1	17,0	184,7	15	80
Abril 2003	17,5	22,5	13,6	130,8	10	78
Mai 2003	14,8	19,8	10,7	92,2	7	77
Junho 2003	15,2	19,4	11,7	152,5	13	85

Normais Meteorológicas Dados médios do período de 1961 a 1990 (30 anos)

Mês	Temperatura do ar (°C)			Precipitação Pluviométrica (mm)	Dias de precipitação (número)	Umidade relativa do ar (%)
	Média	Máxima	Mínima			
Setembro	14.9	20.4	10.6	185	12	76
Outubro	17.0	22.8	12.3	156	11	74
Novembro	18.9	24.8	14.2	140	10	73
Dezembro	20.7	26.7	16.0	144	10	72
Janeiro	21.8	27.8	17.3	140	12	75
Fevereiro	21.7	27.5	17.3	139	11	77
Março	20.3	26	16.1	128	10	78
Abril	17.5	22.9	13.3	114	9	78
Mai	14.5	20.0	10.4	107	9	79
Junho	12.8	17.9	8.6	157	10	79