

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MANEJOS DE
SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE ARROZ NA
INCIDÊNCIA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E
MICOTOXINAS**

Andréia Bianchini

Eng^a. de Alimentos - FURG

Junho de 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MANEJOS DE
SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE ARROZ NA
INCIDÊNCIA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E
MICOTOXINAS**

Dissertação de Mestrado

Andréia Bianchini

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Microbiologia de Alimentos.

**Porto Alegre (RS)
Junho de 2003**

ANDRÉIA BIANCHINI
Engenheira de Alimentos - FURG

DISSERTAÇÃO

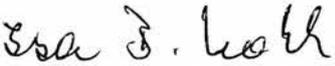
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

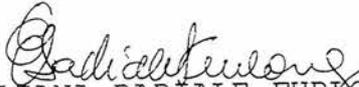
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

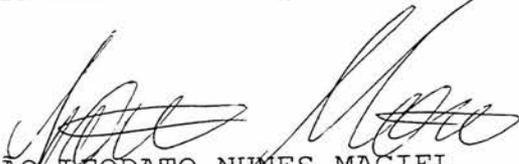
Aprovada em: 23.06.2003
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 27.06.2003
Por


ISA BEATRIZ NOLL
Orientadora-PPG-Microbiologia
Agrícola e do Ambiente


GERTRUDES CORÇÃO
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente


ELIANA BADIÁLE FURLONG
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - FURG


JOÃO TEODATO NUNES MACIEL
INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ - IRGA


PLINHO FRANCISCO HERTZ
DEP. DE CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS - UFRGS


GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Diretor da Faculdade de Agronomia

Ofereço essa conquista a **Deus**
por toda força e coragem.

Aos meus pais, **Orlando Bianchini**
e **Elza Pasqualini Bianchini**,
pelo amor e exemplo de vida.

Ao meu amor, **André Rubin dos Santos**,
por toda dedicação, amor e paciência.

A **Terezinha Rubin dos Santos** e
Adalberto José dos Santos
pelo carinho.

E a todos a quem amo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPG-MAA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio e infraestrutura.

À FAPERGS que, com seu auxílio financeiro para a compra de equipamentos e materiais de laboratório, permitiu a realização dos experimentos.

Ao Instituto Riograndense do Arroz (IRGA) pela oportunidade de aproximação entre a Universidade e esta Instituição, em especial ao **Msc. Carlos Alberto Fagundes**. Agradeço ainda ao estagiário **João** por toda o apoio na realização de coletas de amostras, dados e análises. Aos funcionários do ICTA **Roberval Bittencourt** e **Marli Pinheiro Peres** por toda a amizade e colaboração na realização das análises de acidez lipídica.

Ao **Prof. Dr. Celso Moro**, do Departamento de Química da UFRGS, pelo auxílio na determinação das concentrações dos padrões de micotoxinas.

Ao **Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias**, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da UFPEL, por sugestões importantes no início do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Tabajara Almeida**, do Departamento de Matemática da FURG, por toda a sua disponibilidade e amizade durante a modelagem do experimento e nas análises dos resultados.

À **Prof. Eliana Badiale Furlong**, do Departamento de Química da FURG, pela colaboração nas análises de micotoxinas e, principalmente, pelo carinho e amizade.

A todos os colegas do curso de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela amizade e companheirismo.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Isa Beatriz Noll** por todo o carinho, amizade, dedicação e apoio que foram transmitidos durante sua orientação e, principalmente, por ter acreditado nos meus ideais.

À bolsista de iniciação científica **Samira Emi Kitazawa** por toda a ajuda e, sobretudo, pela amizade durante a realização desse trabalho.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MANEJOS DE SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE ARROZ NA INCIDÊNCIA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E MICOTOXINAS¹

Andréia Bianchini
Isa Beatriz Noll (Orientadora)

RESUMO

No Brasil o arroz tem um consumo alto e regular, o que exige sistemas de armazenamento que ofereçam produto de qualidade durante todo o ano. Sabe-se que a presença de fungos durante a estocagem de cereais reduz a qualidade desses produtos, além de uma possível produção de micotoxinas. Assim, torna-se clara a importância da elucidação do papel de algumas das variáveis que têm influência sobre a contaminação fúngica e por micotoxinas na estocagem, permitindo que essas possam ser posteriormente controladas. Nesse contexto está o objetivo desse estudo que compara três manejos de secagem e armazenamento de arroz, buscando o mais eficiente na redução da contaminação fúngica e por micotoxinas e elucida o comportamento das variáveis de influência no processo. Para isso foram utilizados três silos pilotos, onde o Silo 1 possuía aquecimento do ar de entrada pela queima de GLP, o Silo 2 um sistema de acionamento vinculado às condições do ar ambiente e o Silo 3 era operado manualmente. Durante o experimento foram feitas medidas diárias de temperatura, umidade e umidade relativa (UR) da massa de grãos no silo. As análises de micotoxinas, acidez e enumeração fúngica foram realizadas quinzenalmente nos primeiros 75 dias (secagem) e mensalmente após esse período até que se completasse 255 dias. Foram ainda isolados e identificados fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* para verificar o seu potencial toxigênico. As análises estatísticas dos resultados demonstraram que durante a operação de secagem integrada ao armazenamento os melhores resultados para a enumeração fúngica foram obtidos para os Silos 1 e 3, independentemente da altura. Já para a operação de exclusivo armazenamento, o Silo 3 apresentou o melhor resultado para a Altura 1 e o Silo 1 para a Altura 2. Quanto à presença de micotoxinas foi detectada zearalenona em níveis de até 5.850µg/Kg e 1.840µg/Kg nos Silos 1 e 2, respectivamente. As espécies fúngicas de maior frequência foram *Penicillium crustosum*, *P. canescens* e *P. implicatum*. Dentre as espécies testadas foram identificados dois isolados de *Aspergillus flavus* produtores de aflatoxina B₁ e B₂. As variáveis que influenciaram a contaminação fúngica foram umidade, tempo, temperatura e UR, em ordem decrescente de influência. A avaliação da acidez lipídica nos silos demonstrou que cada sistema foi influenciado por um grupo particular de variáveis. As variáveis que influenciaram a frequência das espécies fúngicas isoladas foram a UR e a umidade, de modo regular.

Palavras chave: arroz, armazenamento, contagem fúngica, micotoxinas e acidez lipídica.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (103p.) Junho, 2003.

A COMPARATIVE STUDY AMONG RICE DRYING AND STORAGE METHODS IN THE INCIDENCE OF TOXIGENIC FUNGI AND MICOTOXINS¹

Andréia Bianchini
Isa Beatriz Noll (Orientadora)

ABSTRACT

In Brazil, rice is widely and regularly consumed, what requires storage systems that maintain products with quality, including between harvest period. Besides producing mycotoxins, molds are known to decrease cereals' nutritional and commercial value during storage period. Thus, it becomes clear that knowing the role of some influential variables in this process is very important. This way, it will permit a future control of these variables, maintaining rice quality during storage. Inside this context is the aim of this work, that compares three rice drying and storage handling, elucidating influence variables behaviour in each handling technique. For this purpose, three pilot silos were used. One of the silos had a heating system which ran on petroleum liquid gas (Silo 1), the second one had an activating system linked to the room air conditions (Silo 2) and the last was manually handled (Silo 3). During all the observation period, daily measures of temperature, moisture and relative humidity (RH) were taken from the silo's grain mass. Micotoxin, acidity and fungi total count analysis were performed every fifteen days during the first 75 drying days and monthly afterwards, until it reached the 255th day. At the same time were isolated and identified *Aspergillus* and *Penicillium* fungi genera to evaluate their toxigenic potential. Result statistics analysis showed in a drying step (0-75 days), that the most efficient silos, concerning fungi count, were Silo 1 and 3, regardless of silo height sampling. For the second process stage, Silo 3 was the one that showed the best results for the highest sampling and Silo 1 for the lowest sampling. In Silo 1 and 2 the highest mycotoxin levels detected were 5.850 µg/Kg and 1.840 µg/Kg, respectively. The most frequently isolated molds were *Penicillium crustosum*, *Penicillium canescens* and *Penicillium implicatum*. Among the tested potentially toxigenic species, two isolated producing aflatoxins B₁ and B₂ were identified as *Aspergillus flavus*. During the experiment, the variables that influenced on the fungi contamination were moisture, time, temperature, and RH, in a decreasing order of influence. The evaluation lipidic acidity in each of the silos showed that each system influenced by a specific group of variables, among the evaluated ones. The analysis allowed verifying the interaction among the variables is relevant for the evaluation of the system as a whole. The evaluation of abiotic factors influence over isolated species frequency showed that there is a regular correlation between species and RH and moisture.

Keywords: rice, storage, mold count, mycotoxins and lipidic acidity.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural Microbiology – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (103p.) June, 2003.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Arroz.....	6
3.2 Secagem e Armazenamento de Grãos.....	7
3.3 Qualidade dos Grãos Armazenados.....	11
3.4 Contaminação de Grãos por Fungos.....	13
3.5 Fungos Toxigênicos.....	15
3.6 Micotoxinas.....	17
3.6.1 Aflatoxinas.....	19
3.6.2 Ocratoxina A.....	23
3.6.3 Zearalenona.....	25
3.7 Ocorrência de Micotoxinas.....	27
3.7.1 Ocorrência de Micotoxinas em Arroz.....	28
3.8 Determinação de Micotoxinas.....	30
3.9 Legislação.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Delineamento experimental.....	35
4.2 Amostragem.....	37
4.3 Determinações Físicas.....	38
4.4 Determinações Químicas.....	39
4.4.1 Determinação de Acidez.....	39
4.4.2 Determinação de Micotoxinas.....	40
4.5 Determinações Microbiológicas.....	46
4.5.1 Incidência de Fungos.....	46
4.5.2 Identificação das Espécies Isoladas.....	46
4.5.3 Avaliação do Potencial Toxigênico.....	47
4.6 Análise Estatística.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Determinações Físicas.....	50
5.2 Determinações Químicas.....	53
5.2.1 Determinação de Acidez.....	53
5.2.2 Determinação de Micotoxinas.....	54
5.3 Determinações Microbiológicas.....	589
5.3.1 Incidência de Fungos.....	589
5.3.2 Identificação das Espécies Isoladas e Potencial Toxigênico.....	61
5.3.3 Avaliação do Potencial Toxigênico.....	66

5.4 Análise Estatística.....	67
5.4.1 Comparação entre os Silos com relação à Enumeração Fúngica	67
5.4.2 Influência dos Fatores Abióticos sobre a Contaminação Fúngica.....	70
5.4.3 Influência dos Fatores Bióticos e Abióticos na Acidez Lipídica.....	73
5.4.4 Influência dos Fatores Abióticos sobre as Espécies Isoladas.....	77
8 CONCLUSÕES	80
10 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química das principais aflatoxinas.....	22
FIGURA 2: Estrutura das ocratoxinas.....	24
FIGURA 3: Estrutura da zearalenona.....	26
FIGURA 4: Silo metálico utilizado nos experimentos.....	36
FIGURA 5: Amostrador manual pneumático.....	38
FIGURA 6: Fluxograma do método de extração de micotoxinas.....	45
FIGURA 7: Umidade dos grãos em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de ur (ar quente – silo 1 e ar ambiente – silo 2) e controle manual (ar ambiente – silo 3).....	50
FIGURA 8: Umidade relativa dos grãos em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de ur (ar quente – silo 1 e ar ambiente – silo 2) e controle manual (ar ambiente – silo 3).....	51
FIGURA 9: Temperatura dos grãos em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de ur (ar quente – silo 1 e ar ambiente – silo 2) e controle manual (ar ambiente – silo 3).....	51
FIGURA 10: Acidez lipídica dos grãos, para a altura 1, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de ur (ar quente – silo 1 e ar ambiente – silo 2) e controle manual (ar ambiente – silo 3).....	53
FIGURA 11: Acidez lipídica dos grãos, para a altura 2, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de ur (ar quente – silo 1 e ar ambiente – silo 2) e controle manual (ar ambiente – silo 3).....	54
FIGURA 12:: Enumeração fúngica dos grãos, para a altura 1, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de ur (ar quente – silo 1 e ar ambiente – silo 2) e controle manual (ar ambiente – silo 3).....	60
FIGURA 13: Enumeração fúngica dos grãos, para a altura 2, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de ur (ar quente – silo 1 e ar ambiente – silo 2) e controle manual (ar ambiente – silo 3).....	60
FIGURA 14: Frequência média de aparecimento das espécies isoladas ao longo do experimento, desconsiderando o silo ou a altura as quais pertenciam.....	63
FIGURA 15: Espécies fúngicas identificadas de maior frequência no silo 1, ao longo do experimento.....	64
FIGURA 16: Espécies fúngicas identificadas de maior frequência no silo 2, ao longo do experimento.....	65
FIGURA 17: Espécies fúngicas identificadas de maior frequência no silo 3, ao longo do experimento.....	65
FIGURA 18: Médias de Log(enumeração) para análise de variância para experimento fatorial 3 x 2 x 2 (silo x operação x altura).....	69
FIGURA 19: Efeito isolado da temperatura sobre a enumeração fúngica.....	72
FIGURA 20: Efeito isolado da UR sobre a enumeração fúngica.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Composição centesimal do arroz descascado pertencente a variedade IRGA-410	7
TABELA 2: Principais fungos toxigênicos e suas micotoxinas.	16
TABELA 3: Peso molecular, absorvidade molar e comprimento de onda máximo de absorção das micotoxinas.	42
TABELA 4: Amostras suspeitas de contaminação por micotoxinas.	56
TABELA 5: Nível de contaminação das amostras confirmadas para zearalenona.....	56
TABELA 6: Fungos potencialmente toxigênicos isolados das amostras e suas toxinas.	64
TABELA 7: Teste de potencial toxigênico em isolados de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>parasiticus</i>	66
TABELA 8: Resultados da análise de variância para experimento fatorial 3 x 2 x 2 (silos x operação x altura).	68
TABELA 9: Resultados da análise de regressão linear múltipla para a enumeração fúngica.	70
TABELA 10: Resultados da análise de regressão múltipla, para cada um dos silos....	74
TABELA 11: Análise da regressão linear múltipla para as populações fúngicas.....	78
TABELA 12: Influência dos fatores abióticos sobre algumas espécies fúngicas.	78

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor e consumidor de arroz, uma vez que esse cereal faz parte da alimentação básica da sua população, sendo consumido regularmente. O consumo médio anual de arroz em casca no mercado interno brasileiro, de acordo com os valores divulgados pelo Ministério da Agricultura, é de 11,7 milhões de toneladas (Arrozpec, 2003). Dentre os grãos de maior consumo, o arroz ocupa a terceira posição, sendo antecedido somente pela soja e pelo milho. Isso demonstra a importância da qualidade que esse produto deve apresentar, uma vez que é utilizado para a alimentação direta humana e animal.

Infelizmente, de modo geral, ainda existem graves falhas no sistema atual de colheita e manuseio dos recursos agro-industriais. No Brasil, essas falhas estão relacionadas a perdas durante o período de colheita, transporte e armazenamento desses recursos, devido a doenças que atingem a lavoura (fungos e pragas), a má administração dos grãos durante o armazenamento e a falta de informação do produtor. Estima-se que 20% da produção seja perdida no processo de colheita, transporte e armazenamento.

Por serem produtos sazonais consumidos regularmente, os cereais requerem um sistema de colheita e armazenamento capaz de suprir a demanda de mercado, durante a entressafra, e oferecer sempre um produto de qualidade. Para isso, podem ser utilizados diversos tipos de armazenamento, entre eles, o armazenamento em silos do produto a granel, ou a utilização de armazéns, onde o produto é mantido ensacado.

As condições climáticas no Rio Grande do Sul, com precipitações pluviométricas variando entre 100 e 150mm no período da colheita, enquanto a média anual varia entre 85 e 140mm (CPETEC, 2003), acabam por elevar a ocorrência de doenças nas lavouras, prejudicando a qualidade de sementes e grãos produzidos. Assim, a umidade elevada que atinge esses produtos exige procedimentos rigorosamente controlados de secagem e armazenamento, uma vez que a umidade e a temperatura são os principais fatores para o desenvolvimento de fungos.

A contaminação dos cereais por fungos é responsável principalmente pela perda na qualidade de grãos, que passam a ter um menor valor nutricional e comercial e podem veicular toxinas. Assim, muitas vezes a produção acaba sendo rejeitada e descartada pelo produtor, ou indevidamente comercializada por falta de informação, conscientização ou fiscalização adequada. Dessa forma, contaminações fúngicas passam a envolver questões econômicas, sociais e de saúde pública, já que podem causar danos à saúde da população consumidora.

Nesse contexto, encaixa-se esse trabalho que busca uma avaliação da presença de fungos toxigênicos e micotoxinas, bem como alternativas para a redução dessa eventual contaminação, em função do tipo de manejo empregado durante a secagem e o armazenamento dos grãos de arroz. O levantamento de dados produzido também contribuirá para que se conheça o papel de algumas das variáveis que têm influência, permitindo assim, que essas possam ser posteriormente controladas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral realizar um estudo comparativo entre três diferentes manejos de secagem e armazenamento de arroz, com relação à incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Avaliar a contaminação do arroz por micotoxinas ao longo do tempo, em função das variáveis estudadas (tempo, contaminação fúngica, umidade do arroz e umidade relativa da massa de grãos) que podem influenciar na produção dessas toxinas;

✓ Identificar as espécies presentes no arroz analisado que pertençam aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, e testar o potencial toxigênico dos isolados que são potencialmente produtores de micotoxinas;

✓ Avaliar se há diferença entre os tratamentos aplicados no processo de armazenamento, utilizando a contaminação fúngica como resposta;

✓ Avaliar a contaminação fúngica no decorrer do experimento, como resposta às variáveis que podem influenciar esse processo (tempo, temperatura, umidade do arroz e umidade relativa da massa de grãos) e verificar o grau de influência de cada uma delas;

✓ Avaliar o teor de acidez lipídica do grão ao longo do tempo, em cada um dos silos, em função das variáveis estudadas (contaminação fúngica, tempo, umidade dos grãos, UR e temperatura da massa de grãos) que podem ter influência nesse valor e verificar o grau de influência de cada uma delas;

✓ Verificar como a umidade dos grãos, a UR e a temperatura da massa de grãos influenciam no aparecimento das espécies isoladas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) é originário do Sudoeste da Ásia, que compreende a região Leste da Índia, Indochina e Sul da China. Esse cereal pertence à família *Gramineae*, subfamília *Pooideae*, sendo o número de espécies do gênero *Oryza* ainda não definido (Ness, 1998).

No Brasil, o arroz é produzido em ecossistemas de várzea e de terras altas, sob diversos sistemas de cultivo. O sistema irrigado é o que predomina nas várzeas da região Sul do país (Guimarães & Sant'Ana apud Vieira *et al.*, 1999).

O arroz em casca é composto por 24% de casca, 8% de farelo e 68% de arroz polido. De acordo com Porto (2001), a composição centesimal do arroz descascado pertencente à variedade IRGA-410 está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição centesimal do arroz descascado pertencente a variedade IRGA-410

COMPONENTE	VALOR PERCENTUAL
Carboidratos	84,66
Umidade	18,2
Proteínas	8,40
Gordura	4,54
Cinzas	2,40

Fonte: Porto (2001).

No arroz polido, o amido está presente essencialmente nas células do endosperma. Já as proteínas encontram-se em todos os tecidos, existindo em maiores concentrações no embrião e no endosperma. Dentro do endosperma as concentrações aumentam do centro para a periferia. (Faroni, 1987). A constituição da proteína do arroz polido apresenta cerca de 5% de albumina, 10% de globulina, menos de 5% de prolamina e 80% de glutelina (Sgarbieri, 1996).

3.2 SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE GRÃOS

Para Athié *et al.* (1998) a maioria dos produtos agrícolas é colhida no ponto de maturação fisiológica quando apresentam teores máximos de amido, proteínas e lipídios, e teor de umidade elevado. Sob esta última condição, a atividade metabólica do produto tem prosseguimento, além de ser propícia ao desenvolvimento de fungos e insetos, conduzindo a deterioração rápida. Assim, através da remoção da umidade pela secagem, natural ou artificial, torna-se possível a conservação de produtos agrícolas durante o armazenamento.

De acordo com Hara apud Vieira *et al.* (1999), os grãos podem ser considerados secos quando o teor de umidade encontra-se em 14% (base úmida) e úmidos quando esse valor está acima de 18% (base úmida). Para as condições climáticas brasileiras, no entanto, é mais prudente e seguro utilizar uma umidade de 13% (base úmida), para classificar um produto como seco.

A secagem pode ser realizada como uma etapa isolada ou como parte integrante do processo de armazenamento. No primeiro caso, os grãos passam por estruturas exclusivamente montadas para a secagem, seguindo então para o armazenamento em silos de estocagem a granel ou em armazéns, onde o produto é mantido em sacarias. No segundo caso, a estrutura de armazenamento, geralmente um silo, possui o sistema de secagem integrado, de maneira que o grão é acondicionado para a redução de sua umidade e permanece no mesmo local durante a estocagem (Ness, 1998).

Tratando-se do processo de secagem de modo isolado, os sistemas de secagem são classificados de acordo com Silva *et al.* (2000a) em dois grandes grupos: a secagem natural e a artificial. Quanto à natural, o produto permanece no campo, sendo exposto às condições do ambiente para que seu teor de umidade seja reduzido. Nesse sistema, embora com o passar do tempo, o produto alcance um teor de umidade adequado para o armazenamento, ele fica sujeito ao ataque de pragas, ao tombamento da planta e as intempéries, que contribuem para acarretar grandes perdas na qualidade do produto. No caso do arroz, não é aconselhável o uso do sistema

natural de secagem, uma vez que sua permanência na lavoura levaria a degradação e perdas, antes que o teor de umidade para a conservação (13%, em base úmida) fosse atingido. Isso porque a exposição contínua das panículas à ação dos ventos, ao ataque de pássaros, insetos e roedores ocasionaria grandes perdas qualitativas e quantitativas.

Com relação à secagem artificial, pode-se empregar um sistema com ar natural ou com ar aquecido. No primeiro caso, o produto é exposto a uma circulação forçada de ar nas condições ambiente, sendo fornecido ar com baixa temperatura, o que provoca um aumento no tempo de operação e dependência das condições ambientais para a realização da secagem. Com relação ao gasto de energia, a secagem com ar natural é mais econômica já que somente necessita-se de gasto energético para vencer a resistência da massa de grãos. Além disso, esse procedimento tem a vantagem de não prejudicar o grão por elevação da temperatura, evitando fissuras, susceptibilidade à fratura, descoloração e perda do poder germinativo. No caso da secagem com aquecimento, o ar é condicionado antes de sua entrada no secador, para que sua umidade relativa fique reduzida. Para isso utiliza-se um sistema de queima de lenha ou GLP (Gás Liquefeito de Petróleo) para aquecer o ar, tornando-o capaz de retirar uma quantidade maior de umidade do produto, de maneira que todo o processo se realiza em um reduzido período de tempo (Silva *et al.*, 2000a; Hosney, 1991).

Após a secagem, o arroz é armazenado de duas maneiras principais: armazenamento convencional ou a granel. No Brasil, desde o surgimento da rede armazenadora, até o início da década de 70, essas unidades concentraram-se no litoral e só avançaram para o interior em condições muito especiais, conforme a cultura. Sua modalidade, com relação ao manuseio dos produtos, voltou-se, predominantemente, para a guarda e conservação em sacaria (armazenamento convencional), e a partir dos anos 70 o sistema de armazenagem a granel foi adotado (Silva *et al.*, 2000b).

Estima-se que atualmente, pouco menos da metade dos grãos produzidos no país ainda seja armazenada ensacada, principalmente nos casos de pequenos produtores. A estocagem de arroz em sacos é feita em armazéns, em geral sob condições ambientais não controladas. As embalagens mais utilizadas são as do tipo poroso ou permeável (sacos de aniagem ou polipropileno trançado). Esse tipo de embalagem permite trocas de umidade com o ambiente, propiciando assim, que os grãos entrem em equilíbrio higroscópico com o meio ambiente (Baudet apud Peeske *et al.*, 1998; Hara apud Vieira *et al.*, 1999).

Quando se trata do armazenamento a granel, os grãos são mantidos em silos onde podem ser manipulados mediante operação rápida, econômica e eficiente, apresentando condições técnicas de conservação por longos períodos (Ness, 1998).

No caso das duas operações (secagem e armazenamento) serem realizadas de modo integrado, utiliza-se estruturas chamadas de silos secadores (secador estacionário). Esses silos, usualmente metálicos, são montados em uma base que possui um piso falso perfurado, que serve de apoio ao cereal ou, possuem em sua base um sistema de dutos invertidos, por onde o ar, aquecido ou não, é forçado a passar através do cereal ainda úmido. Nesse tipo de silo os grãos podem ser secos e armazenados na mesma instalação. Durante o armazenamento, para evitar ou corrigir uma possível estratificação da umidade e formação de massas de ar quente, pode-se recorrer novamente à aeração (Fonseca *et al*, 1983).

3.3 QUALIDADE DOS GRÃOS ARMAZENADOS

Para que a qualidade dos grãos seja mantida durante o armazenamento, alguns fatores devem ser observados, tais como umidade dos grãos, umidade relativa no ambiente de armazenamento e temperatura da massa de grãos. De acordo com Faroni & Silva (2000), o teor de umidade é o fator mais importante no processo de deterioração de grãos armazenados. Deste modo, mantendo-se a umidade em níveis baixos, os demais fatores terão seus efeitos gradualmente diminuídos, resultando em um menor ataque de microrganismos e diminuição da respiração dos grãos.

No que se refere à umidade dos grãos durante o armazenamento, Hosney (1991) sugere 13% em trigo, 14% em cevada, 13% em aveia, 13%

em sorgo e 12-13% em arroz como níveis máximos de umidade para o armazenamento seguro.

A umidade relativa (UR) mínima para germinação de esporos fúngicos deve estar, geralmente, acima de 70% na atmosfera da massa de grãos. O conteúdo de umidade do grão em equilíbrio com esse valor de UR varia de acordo com seu tipo, por isso é importante que se conheça o valor de umidade relativa e a temperatura em que se encontra a massa de grãos. Assim, para que seja observada a faixa de segurança de 12-13% de umidade nos grãos de arroz, a umidade relativa deve ser mantida abaixo de 70%, enquanto a temperatura deverá permanecer entre 18 e 30°C. Observa-se ainda que, se os grãos estiverem quebrados ou trincados ou se o armazenamento for por um período superior a dois anos, o conteúdo máximo de umidade dos grãos deve ser aquele em equilíbrio com um valor de umidade relativa de 65% (Hoseney, 1991; Silva *et al.*, 1995; Athié *et al.*, 1998).

Durante o armazenamento ocorrem inúmeras reações bioquímicas nos grãos que podem alterar sua qualidade, seja por influência dos fatores abióticos ou bióticos. Parte dessas alterações são de origem enzimática. Durante a estocagem do arroz, pode ocorrer a hidrólise de glicerídeos pela ação de enzimas lipolíticas, representadas principalmente pela lipase, galactolipase e fosfolipase, produzindo di e monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol, em um processo denominado de rancidez hidrolítica que é favorecido por temperatura e conteúdo de umidade elevados (Bilhalva, 1979).

Essa alteração é acelerada pelo crescimento fúngico devido à elevada atividade lipolítica desses microrganismos. A hidrólise dos lipídios ocorre muito mais rapidamente do que a hidrólise das proteínas e carboidratos, razão pela qual, o conteúdo de ácidos graxos livres tem sido proposto como um índice de deterioração inicial do grão (Athié *et al.*, 1998). Nesse contexto, a redução do teor de umidade e/ou temperatura durante o armazenamento, pode reduzir a velocidade da atividade enzimática, permitindo prolongar o período de armazenamento do arroz.

3.4 CONTAMINAÇÃO DE GRÃOS POR FUNGOS

O crescimento dos fungos ocorre tanto nos alimentos como nos grãos, não somente nos estágios de pré-colheita como também durante os estágios de pós-colheita, devido principalmente às condições inadequadas de secagem e armazenamento, causando a deterioração dos grãos, perda do valor nutricional, redução no conteúdo de óleo e aumento dos ácidos graxos livres, além da produção de micotoxinas (Monteiro *et al.*, 1996; Lazzari, 1997).

De acordo com Domingos (1986) são denominados fungos de campo as espécies que contaminam os grãos antes da colheita, durante o desenvolvimento das plantas na lavoura. Todos esses fungos necessitam de grãos com alto teor de umidade para se desenvolverem, e por isso, atacam os grãos durante as fases de crescimento e maturação. Para Christensen &

Kaufmann (1965) a umidade deve estar acima de 20% para o desenvolvimento desses fungos.

Os principais fungos de campo que invadem os grãos pertencem às espécies dos gêneros: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Esses fungos podem causar a perda da cor natural ou brilho dos grãos e, assim, reduzir o valor comercial do produto Domingos (1986). Segundo Lazzari (1993a), existe pouco ou nenhum controle sobre as condições que favorecem o desenvolvimento de fungos de campo, pois eles invadem a cultura durante os estágios finais de amadurecimento.

Os fungos de armazenamento contaminam os grãos após a colheita e se desenvolvem quando o teor de umidade do produto está entre 13 e 18% (Christensen & Kaufmann, 1965). Os fungos mais comumente encontrados causando deterioração de grãos armazenados são espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (Domingos, 1986).

As condições que alteram o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento são: umidade dos grãos, umidade relativa de equilíbrio, temperatura, migração de umidade, taxa de oxigênio do ar intergranular, presença de impurezas e grãos danificados pelo manuseio, ataque de insetos e roedores, tempo de armazenamento e danos físicos durante a colheita e beneficiamento (Domingos, 1986). Os maiores efeitos do desenvolvimento fúngico em grãos e sementes armazenados são perda do poder germinativo,

perda de matéria seca, produção de micotoxinas e alteração do valor nutricional (Lazzari, 1993b).

3.5 FUNGOS TOXIGÊNICOS

Fungos toxigênicos são aqueles capazes de produzir micotoxinas. Do ponto de vista do metabolismo desses microrganismos, são considerados metabólitos primários os compostos essenciais para o seu crescimento, tais como proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e carboidratos, enquanto que os metabólitos secundários, como as micotoxinas, ocorrem após a fase de crescimento e estão freqüentemente associados às alterações morfogênicas, sendo restritos a pequeno número de espécies (Prado *et al.*, 1995; Scussel, 1998).

Nem sempre as condições favoráveis à infestação fúngica coincidem com a produção de micotoxinas, mas uma vez produzidas, permanecem após a morte do produtor ou quando da substituição dele por outro microrganismo. A presença de um fungo não significa necessariamente que a micotoxina esteja presente ou vice-versa (Blaney *et al.*, 1986; Sinha *et al.*, 1986).

Segundo Miller (1995), dentre as toxinas produzidas por fungos, as mais largamente encontradas em alimentos são aflatoxinas, deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxinas e fumonisinas. A Tabela 2 apresenta as principais espécies de fungos toxigênicos e suas principais micotoxinas.

Tabela 2: Principais fungos toxigênicos e suas micotoxinas.

Espécies Fúngicas	Micotoxinas
<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina
<i>A. flavus</i>	Ácido ciclopiazônico
<i>A. ochraceus</i> ; <i>Penicillium viridicatum</i> ; <i>P. cyclopium</i>	Ocratoxina A
<i>P. expansum</i>	Patulina
<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Deoxivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. poae</i>	Toxina T-2
<i>F. sporotrichioides</i> ; <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i>	Diacetoxyscirpenol
<i>F. culmorum</i> ; <i>F. graminearum</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenona
<i>F. moniliforme</i>	Fumonisinias

Fonte: Modificada de D'Mello & MacDonald (1997).

O potencial de produção de micotoxinas pode ser estabelecido pelo isolamento de espécies toxigênicas e sua inoculação em meios com nutrientes e condições de temperatura e umidade adequadas, com posterior avaliação do meio de cultivo quanto a presença de micotoxinas. Outra possibilidade para verificação do potencial toxigênico é a detecção da micotoxina na matriz analisada (Osborne, 1982). Em uma avaliação do potencial toxigênico de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus alliaceus*, Bayman *et al.* (2002) utilizaram caldo batata-dextrosado e caldo sacarose-extrato de levedura como meio de cultura para o desenvolvimento fúngico. A presença de ocratoxina foi verificada por cromatografia líquida (HPLC). Com o objetivo de avaliar o potencial toxigênico de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, Nunes (2001) utilizou farelo de arroz desengordurado e arroz parboilizado como meio de cultura. Para avaliar o potencial aflatoxigênico de espécies de *Aspergillus* diretamente no meio de cultura, dispensando etapas de extração da toxina, Lin

& Dianese (1976) desenvolveram uma metodologia utilizando ágar enriquecido com leite de coco, como substrato para o desenvolvimento fúngico.

3.6 MICOTOXINAS

As micotoxinas, produtos do metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos que se proliferam em alimentos e ração animal, acarretam, quase sempre, graves danos à saúde humana e animal (Goldblatt & Winner, 1977).

A história das micotoxinas teve seu início nos anos 60, com a identificação das aflatoxinas. A partir de então, os métodos analíticos, as estruturas químicas, os efeitos toxicológicos e os organismos produtores de diferentes micotoxinas estão sendo amplamente estudados (Goldblatt & Winner, 1977; Bullerman, 1979; Soares, 1987).

Cerca de 300 micotoxinas já foram isoladas, contudo, as mais freqüentemente encontradas em alimentos e que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas, são: aflatoxinas, ocratoxinas e zearalenona (Scussel, 1998).

O efeito tóxico causado pelas micotoxinas em humanos e animais, principalmente monogástricos, varia de acordo com a micotoxina em questão, podendo ser agudo e/ou crônico (Hussein & Brasel, 2001). Enquanto algumas

causam danos funcionais ao fígado e rim, outras se apresentam neurotóxicas ou interferem na síntese de proteínas, causando efeitos que variam de sensibilidade cutânea a imunodeficiência extrema (Sweneey & Dobson, 1998).

As micotoxinas têm ocorrência mundial (América, Europa, Ásia e África), tendo sido detectadas em países como EUA., Alemanha, França, Inglaterra, Rússia, Japão, Índia, Filipinas, Tailândia e também no Brasil (Osborne, 1982; Mallmann *et al.*, 1994). Entre 25% e 50% de todos os produtos alimentícios, especialmente os grãos mais consumidos, estão contaminados com micotoxinas (Mannon & Johnston, 1985; Bhat & Miller, 1991;). É importante notar que as micotoxinas em produtos alimentícios nos EUA, Canadá e Comunidade Econômica Européia geram perdas significativas na produção animal, refletindo-se na redução da produção de carne, leite e ovos, no aumento de doenças e na diminuição da taxa de reprodução (Miller, 1995).

Entre os fatores que afetam a produção de micotoxinas em alimentos estão os fatores biológicos, fatores físicos no campo e durante o armazenamento e fatores químicos. Dentre os fatores biológicos envolvidos encontra-se a contaminação dos grãos por diferentes espécies fúngicas, podendo as interações entre essas espécies influenciar a produção de micotoxinas. Outro fator biológico importante reside na susceptibilidade de determinadas espécies vegetais em serem contaminadas por fungos. Os fatores físicos incluem basicamente tempo, temperatura, umidade e extensão da infestação por insetos (D'Mello & MacDonald, 1997). Acredita-se que a

infestação por insetos predispõe os grãos à infecção fúngica e, portanto, à produção de micotoxinas (Farrar & Davis, 1991).

Ainda de acordo com D'Mello & MacDonald (1997), os fatores químicos incluem particularmente a utilização de fungicidas, sendo que alguns são capazes de estimular a produção de micotoxinas. Nesse caso, quando os fungicidas são utilizados satisfatoriamente o risco de contaminação por micotoxinas é baixo, porém inúmeros estudos demonstraram que doses em concentrações sub-letais podem promover a produção de micotoxinas. No que se refere ao uso de conservantes alimentícios, Chipley & Uraih (1980) demonstraram que derivados do ácido benzóico foram efetivos na inibição do crescimento fúngico e produção de micotoxinas por cepas de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*.

Os fatores biológicos, físicos e químicos podem atuar de modo isolado, mas geralmente o que se observa é um efeito conjunto sobre o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. Skrinjar *et al.* (1995) constataram o efeito inibidor da interação entre ácido propiônico e temperatura no crescimento de *Penicillium aurantiogriseum* e sua produção de ocratoxina A.

3.6.1 Aflatoxinas

A identificação das aflatoxinas ocorreu em 1960 com um grave acidente econômico na Inglaterra, envolvendo a morte de perus. Nessa ocasião

verificou-se que a ingestão de rações que continham farelo de amendoim de procedência brasileira, bem como de outros países (Uganda, Quênia, África Ocidental, Zâmbia e Índia) era o fator responsável pela doença desconhecida (IARC, 1987).

As aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nominus*, sendo que as duas primeiras espécies apresentam padrões de crescimento semelhantes (International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSF, 1996). Ambas crescem na faixa de temperatura de 10-12°C a 42-43°C, com um crescimento ótimo em 32-33°C (Pitt & Hocking, 1997). A produção de aflatoxinas por essas espécies ocorre entre 12 e 40°C (Koehler *et al.* apud Lacaz, 1991).

Quanto ao pH, tanto *A. flavus*, como *A. parasiticus* podem crescer na faixa que varia de 2,1 a 11,2, com o ótimo entre 3,5 e 8,0 (Wheeler *et al.*, 1991). De acordo com o ICMSF (1996) as aflatoxinas podem ser produzidas na faixa de pH ótima para o crescimento fúngico, com a máxima produção em pH 6,0. Já com relação à atividade de água do substrato, as aflatoxinas são produzidas em valores de atividade de água (a_w) variando entre 0,95 e 0,99, sendo 0,82 o valor mínimo para a produção da toxina por *A. flavus* (ICMSF, 1996).

De acordo com Luchese & Harrigan (1993), diversos fatores nutricionais são conhecidos por afetarem a produção de aflatoxinas, incluindo a presença no meio de cultura de vários carboidratos e fontes de nitrogênio, fosfatos, lipoperóxidos e metais. Porém, a atuação desses fatores na regulação da biossíntese de aflatoxinas ainda não foi elucidada.

Existe, porém, diferença entre a produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus*, já que o último produz aflatoxinas G e B, enquanto o primeiro produz apenas aflatoxina do tipo B. Além disso, isolados de *A. parasiticus* tendem a produzir maiores concentrações de micotoxinas do que *A. flavus*, que ainda possui um maior percentual de cepas não toxigênicas (Pitt, 1993).

As aflatoxinas estruturalmente constituem-se em cumarinas substituídas ligadas a deidrofurano, sendo estas substituições fatores que conferem diferentes toxicidades (Pereira & Chang, 1993). A Figura 1 mostra a estrutura química das aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂.

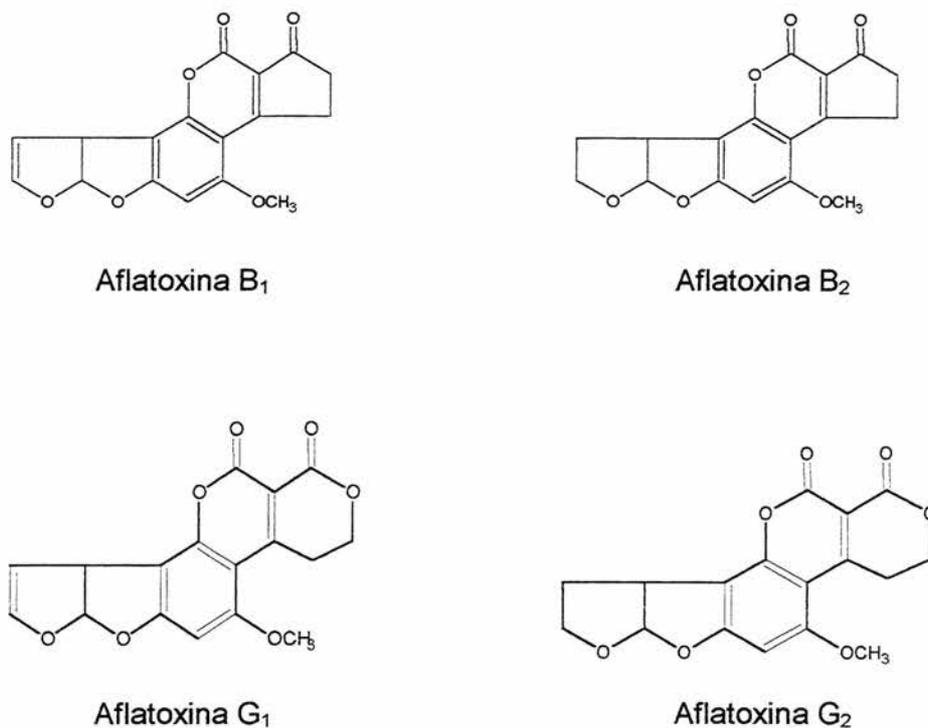


Figura 1: Estrutura química das principais aflatoxinas.

Fonte: Sweeney & Dobson, 1998.

Essas toxinas apresentam efeitos carcinogênico, teratogênico e mutagênico, sendo absorvidas em pequenas doses, podendo causar lesões em longo prazo, como é o caso do câncer de fígado, ou até mesmo toxicidade aguda em recém nascidos (Neto, 1981; Valladares, 1985; Diener *et al.*, 1987; Stoloff *et al.*, 1991). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer – IARC (1993), as aflatoxinas são classificadas como carcinogênica (Grupo 1) para humanos.

3.6.2 Ocratoxina A

A ocratoxina A foi identificada pela primeira vez na África do Sul em 1965, pelo isolamento de cepas de *Aspergillus ochraceus* causador de efeitos tóxicos em animais de laboratório (Soares, 1987).

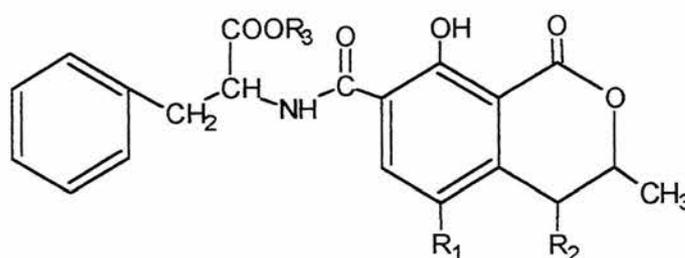
A ocratoxina A é produzida principalmente pelo *Aspergillus ochraceus*, predominante em climas tropicais, com um crescimento entre 8 e 37°C, com desenvolvimento ótimo entre 24 e 37°C, e produção da toxina entre 12 e 37°C, com valor ótimo 31°C. Outro produtor da ocratoxina A é o *Penicillium verrucosum*, predominante em climas temperados, com um crescimento entre 0 e 31°C, com desenvolvimento ótimo 20°C, que coincide com a temperatura ótima dessa espécie, para a produção de toxina (ICMSF, 1996).

Wheeler *et al.* (1991) verificaram um bom crescimento de *A. ochraceus* em pH variando de 3 a 10, com crescimento mínimo em pH 2,2. Já para *P. verrucosum* a faixa de pH que permite o crescimento varia de 2,1 a 10,0, com crescimento ótimo entre 6,0 e 7,0 (Sweeney & Dobson, 1998).

De acordo com Pitt & Christian (1968), *A. ochraceus* apresenta crescimento ótimo em a_w variando de 0,95 a 0,99, apesar de ser capaz de crescer a valores de a_w tão baixos como 0,77. Porém, Adebajo *et al.* (1994) encontrou uma produção máxima de toxina em a_w de 0,80. Quanto à a_w

necessária ao crescimento de *P. verrucosum*, Pitt & Hocking (1997) classificaram essa espécie como xerofílica por ser capaz de crescer em a_w de 0,80.

As ocratoxinas são um grupo de sete derivados de isocumarina, ligada a uma amida que, por sua vez, está unida a um grupo β -fenilalanina, como mostra a Figura 2, sendo que entre os derivados dessa estrutura, a ocratoxina A (OTA) é o maior e mais tóxico metabólito (Sweeney & Dobson, 1998).



	R ₁	R ₂	R ₃
Ocratoxina A	Cl	H	H
Ocratoxina B	H	H	H
Éster etílico da ocratoxina A (ocratoxina C)	Cl	H	CH ₂ CH ₃
Éster metílico da ocratoxina A	Cl	H	CH ₃
Éster etílico da ocratoxina B	H	H	CH ₂ CH ₃
Éster metílico da ocratoxina B	H	H	CH ₃
4-hidróxi-ocratoxina A	Cl	OH	H

Figura 2: Estrutura das ocratoxinas.

Fonte: Furlani & Soares, 1999.

É crescente o interesse pela ocratoxina A presente nos alimentos, rações e matérias-primas, em função do seu caráter nefrotóxico em suínos, além de trabalhos que relatam que essa toxina apresenta também efeitos mutagênico, teratogênico e carcinogênico (Milanez & Leitão, 1994). O IARC (1993) classifica a ocratoxina A como um possível carcinógeno (Grupo 2B) para humanos.

3.6.3 Zearalenona

A zearalenona é um metabólico associado com espécies do gênero *Fusarium*, tais como *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. sporotrichioides*, sendo o *F. graminearum* a principal espécie responsável pelos efeitos estrogênicos, comumente encontrados em animais de fazenda, já que apresenta a mais ampla distribuição entre as espécies toxigênicas (Marasas, 1991; IARC, 1993).

O *Fusarium graminearum* apresenta crescimento ótimo na faixa de 24 a 26°C, em uma a_w mínima de 0,90. O efeito do pH no crescimento é dependente da temperatura, com valores mínimos de 2,4 a 30°C e 3,0 a 25 e 37°C (Wheeler *et al.*, 1991). A produção de toxina por essa espécie reflete amplamente as condições de crescimento (ICMSF, 1996).

Para o *Fusarium culmorum*, foi observado crescimento na faixa de 0 a 31°C, sendo o ótimo localizado em 21°C, com zearalenona sendo produzida em temperaturas superiores a 25°C (Bottalico *et al.*, 1982). A espécie *Fusarium*

sporotrichioides apresenta crescimento ótimo em temperaturas de 22,5 a 27,5°C, dentro de uma faixa que varia de -2 a 35°C. Sobre essa espécie pouco se sabe a respeito dos fatores fisiológicos que afetam a produção de toxina (Sweeney & Dobson, 1998).

A zearalenona é um composto fitoestrogênico (Diekman & Green, 1992), conhecido como 6-(10-hidroxy-6-oxo-*trans*-1-undecenil)- β -ác.resorcílico- μ -lactona (Hussein & Brasel, 2001), representado na Figura 3.

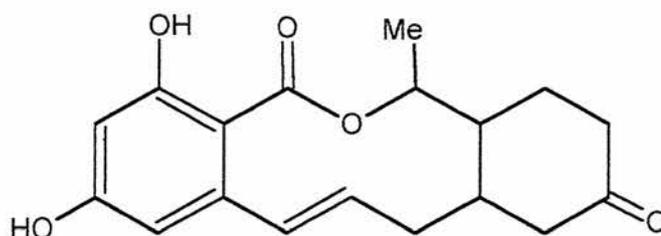


Figura 3: Estrutura da zearalenona.

FONTE: Hussein & Brasel, 2001.

A zearalenona, assim como seus metabólitos (α -zearalenol e β -zearalenol), possui propriedades estrogênicas (Cheeke, 1998), particularmente sobre fêmeas jovens de suíno. Em vacas tem-se atribuído problemas de infertilidade, redução na produção de leite e hiperestrogenismo (Mirocha *et al.*, 1974). Prelusky *et al.* (1994) apresentam a zearalenona como causa de problemas reprodutivos e de infertilidade em animais. O IARC (1993) classifica essa micotoxina como não carcinogênica (Grupo 3) para humanos.

3.7 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS

A ocorrência de aflatoxinas é maior em sementes oleaginosas, como amendoim e seus derivados, algodão, castanhas, embora cereais como, feijão, cevada, sorgo e arroz também possam ser contaminados (Soares & Rodriguez-Amaya, 1989; Scudamore *et al.*, 1998; Scussel, 1998; Sabino *et al.*, 1999).

Sabino *et al.* (1999) fizeram um levantamento da ocorrência de aflatoxinas em amendoins e produtos derivados no estado de São Paulo, no ano de 1994, e verificaram contaminações variando de 5,0 a 2.440,0 μ g/Kg, sendo que 36% das amostras apresentavam concentrações de aflatoxina superiores àquela permitida pela legislação brasileira.

Em milho e derivados para consumo humano, Baldissera *et al.* (1992) encontraram aflatoxinas B e G em níveis de 68ppb, enquanto Sharma & Márquez (2001) encontraram níveis de 5,00 a 8,02 μ g/Kg de aflatoxina B₁, em rações animais preparadas a base de milho.

A ocorrência de ocratoxina foi constatada em cereais tais como milho, soja, trigo sarraceno, cevada, malte, centeio, arroz e seus produtos, amendoim, castanha do Pará, feijão, café e seus produtos, pimenta do reino, frutas secas, sucos de fruta e bebidas fermentadas, tais como cerveja e vinhos (Pohland apud Leoni, *et al.*, 2000; Speijers & Van Egmond apud Leoni, *et al.*,

2000, Zimmerli e Dick apud Leoni, *et al.*, 2000, Furlani & Soares, 1999; Visconti *et al.*, 2000; Filali *et al.*, 2001; Pietri *et al.*, 2001).

No Brasil, Leoni *et al.* (2000) encontraram níveis de ocratoxina A variando de 0,3 a 6,5µg/Kg e 0,5 a 5,1µg/Kg em café moído e torrado e café instantâneo, respectivamente. Na Alemanha foram avaliadas amostras de café, durante os anos de 1995 e 1999, e foram detectados níveis médios de ocratoxina A de 0,4µg/Kg em café verde. 0,6µg/Kg em café torrado e 0,7µg/Kg em café solúvel (Otteneder & Majerus, 2001).

No que se refere à ocorrência de zearalenona, Scussel (1998) cita a presença dessa micotoxina em milho, sorgo, trigo, cevada, rações e outros cereais. Em amostras de milho e derivados foi detectada por Baldissera *et al.* (1994a e 1994b) a presença de zearalenona em níveis variando de 524 a 2.365µg/Kg.

Schollenberger *et al.* (2002) avaliando toxinas de *Fusarium* spp. em farinha de trigo observaram níveis contaminações com zearalenona variando de 1 a 8µg/Kg em farinha de trigo e 2 a 24µg/Kg em farinha de trigo integral.

3.7.1 Ocorrência de Micotoxinas em Arroz

Soares e Rodriguez-Amaya (1989) avaliaram amostras de arroz polido e parboilizado, provenientes do comércio de Campinas-SP, quanto à

presença de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina. Os resultados desse levantamento demonstraram a contaminação do arroz polido por aflatoxinas em níveis de até 38 μ g/Kg para aflatoxina B₁, 15 μ g/Kg para aflatoxina B₂ e 20 μ g/Kg para aflatoxina G₁.

Análises em amostras de arroz provenientes da Índia e China demonstraram a ocorrência de contaminação por aflatoxina B₁ em ambos os países, sendo os níveis de contaminação de 5-50 μ g/Kg na China e 20 μ g/Kg na Índia (Park & Njapau, 1989; Zhen-Zhen, 1989).

Calvette *et al.* (1993) analisaram amostras de arroz integral, quanto à presença de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona, por método de cromatografia em camada delgada. Os resultados, porém, não demonstraram contaminação das amostras analisadas pelas micotoxinas estudadas.

Nunes (2001) analisando amostras de arroz integral, parboilizado e polido, quanto à presença de micotoxinas, encontrou contaminação por zearalenona e ocratoxina A nas amostras de arroz parboilizado e polido. Os maiores níveis foram detectados no arroz parboilizado, sendo de 1955 μ g/Kg para zearalenona e 128 μ g/Kg para ocratoxina A.

Scudamore *et al.* (1998) analisaram 40 amostras de farelo de arroz destinado à ração animal quanto à presença de 20 micotoxinas. Os resultados obtidos demonstraram baixo nível de contaminação do farelo de arroz. Dentre

as micotoxinas encontradas destacou-se a aflatoxina B₁, que esteve presente em 29 amostras (72,5%), usualmente junto com as demais aflatoxinas, em níveis de até 28µg/Kg. Outra micotoxina detectada foi a ocratoxina A, confirmada em duas amostras em níveis de 12 e 3µg/Kg, enquanto a maioria das amostras parecia conter pequenas concentrações dessa micotoxina.

3.8 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

A confiabilidade de um ensaio de micotoxinas em produtos agrícolas é influenciada de maneira significativa pela amostragem. O desenho de todos os planos de amostragem deve ser baseado na concentração crítica da micotoxina, definição de lotes aceitáveis e rejeitáveis e riscos ao consumidor e produtor (Cole, 1986).

Na maioria dos métodos utilizados para determinação de micotoxinas são necessárias etapas de preparação de amostra, extração, limpeza, triagem, quantificação e confirmação. O preparo consta de quarteamento, trituração e homogeneização da amostra, seguida da extração com solvente apropriado. A escolha do solvente baseia-se na polaridade e solubilidade diferencial das micotoxinas, os mais utilizados são clorofórmio, acetona, metanol, acetonitrila, benzeno, acetato de etila, hexano e/ou água (Soares, 1987; Scussel, 2000).

Para separação e detecção de diferentes grupos e entre micotoxinas de um mesmo grupo, propriedades cromatográficas e espectrofotométricas são rotineiramente empregadas. No entanto, nem sempre estas propriedades são suficientemente específicas, pois outras substâncias podem apresentar características semelhantes. A toxicidade variada e a presença de resultados falsos positivos tornam imprescindível o uso de testes confirmatórios para sua identificação. Esses testes são baseados em derivações químicas, obtendo compostos com propriedades cromatográficas modificadas ou técnicas de espectrometria de massa (Badiale-Furlong, 1992; Scussel, 2000).

Dentre os métodos mais utilizados para a determinação de micotoxinas estão os métodos cromatográficos, fluorimétricos e os imunoensaios. Dentre os métodos cromatográficos podem ser citadas a cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Scussel, 2000).

A CCD permite a avaliação de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina, entre outras micotoxinas e de acordo com Soares e Rodriguez-Amaya (1989) os limites de detecção dessas micotoxinas em CCD pode chegar a 2, 5, 55 e 15 μ g/Kg, respectivamente. Para a confirmação das micotoxinas em CCD podem ser utilizados testes confirmatórios baseados em reações químicas, na alteração do sistema de

eluição ou na utilização de cromatografia em camada delgada bidimensional (Przybylski, 1975; Golinski e Grabarkiewicz-Szczesna, 1984; AOAC, 1990).

De acordo com Sylos (1999) a CCD tem sido bastante utilizada em países em desenvolvimento, devido a sua praticidade, baixo custo e simplicidade. Entretanto, os limites de detecção alcançados por essa metodologia, para muitas micotoxinas, são de baixa capacidade, tornando-se muitas vezes difícil a quantificação dessas toxinas.

A maioria das micotoxinas não é volátil, de modo que métodos de derivatização tornam-se usualmente necessários para análise por cromatografia gasosa. De acordo com Scott (1993) e Onji *et al.* (1998) essa metodologia tem sido amplamente empregada para a análise de tricotecenos e outras micotoxinas de *Fusarium* em cereais.

A cromatografia líquida de alta eficiência tornou-se o método escolhido para a determinação da maioria das micotoxinas. Normalmente utiliza-se coluna de fase reversa, detectores de fluorescência, por absorção de radiação ultra-violeta ou por arranjo de diodos, e quantificação por padronização externa (Sylos, 1999).

Ainda de acordo com Sylos (1999), as vantagens que a CLAE apresenta sobre a CCD envolvem melhor exatidão, precisão, reprodutibilidade, seletividade, alta sensibilidade e controle automático das condições

cromatográficas. Essas características combinadas conduzem a limites de detecção consideravelmente mais altos, como por exemplo, 0,1µg/Kg para aflatoxinas, 0,2µg/Kg para ocratoxina A e 1µg/L para patulina.

De acordo com Duncan *et al.* apud Stroka & Anklam (2002) métodos fluorimétricos simples, que incluem limpeza de extrato em colunas de imunoafinidade, têm sido desenvolvidos com o objetivo de agilizar e custear os procedimentos de análise. Tais métodos são baseados em uma simples medida fluorimétrica de um extrato purificado. Testes realizados por esses autores demonstraram parâmetros de precisão comparáveis aos métodos de CLAE. Entretanto, matrizes complexas podem apresentar um resultado falso positivo, devido a reações cruzadas e interferentes.

No que se refere aos métodos de imunoensaios, os mais empregados são o ELISA e a cromatografia por imunoafinidade, esta utilizada para limpeza dos extratos antes da determinação por cromatografia, principalmente para detecção de aflatoxinas (Scussel, 2000).

3.9 LEGISLAÇÃO

De acordo com D'Mello & MacDonald (1997), uma vez que a contaminação de alimentos e rações com micotoxinas representa um sério risco a saúde humana e animal, medidas para monitorar e controlar os níveis dessas substâncias foram introduzidas em diversos países e estão sendo

constantemente atualizadas. Existe ainda uma considerável variação nas legislações, no que se refere aos limites permitidos e as micotoxinas alvo, nos diferentes países.

Com relação aos limites de aflatoxinas presentes em alimentos e tolerados pela legislação, tem-se que a Legislação Brasileira permite o valor de $20\mu\text{g}/\text{Kg}$ para o somatório de aflatoxina B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , em amendoim, milho e produtos derivados (Fonseca, 2003).

Os limites máximos para ocratoxina A são regulamentados ou estão sendo sugeridos em diversos países e variam de 1 a $5\mu\text{g}/\text{Kg}$ para alimentos infantis, 2 a $50\mu\text{g}/\text{Kg}$ para cereais e 5 a $300\mu\text{g}/\text{Kg}$ para rações (Van Egmond, 1996). No Brasil, o Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas sugere a fixação do limite em $50\mu\text{g}/\text{Kg}$ para todos os alimentos.

No que se refere à legislação brasileira para zearalenona, ainda não há limites permitidos e sugeridos. Em outros países, porém, pode se observar limites de $100\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Itália) e $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ (França) de zearalenona, em cereais e derivados (Fonseca, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização desse projeto foram utilizados três silos pilotos, localizados na Estação Experimental do Arroz do Instituto Riograndense do Arroz (EEA - IRGA), no município de Cachoeirinha – RS. A Figura 4 apresenta um dos silos utilizados no experimento. As dimensões do silo eram: 3,0m de altura total, 2,70m de altura plena (descontando o fundo falso) e 2,80m de diâmetro. A capacidade de cada silo era de 7ton.

Nesse estudo foram avaliados três manejos diferentes, onde a secagem foi feita por circulação forçada de ar. Dois dos silos tiveram controle automatizado para a UR (Umidade Relativa) do ar de entrada, que foi monitorado por um sistema Dryco[®], cedido ao projeto pela empresa Dryeration Indústria, Comércio, Projetos e Representações LTDA. No primeiro silo, quando o ar de entrada não estava de acordo com a condição pré-determinada pelo sistema automatizado, ele era aquecido pela queima de gás liquefeito de

petróleo (GLP), para que sua UR fosse ajustada a 75%. O segundo silo recebeu insuflação de ar ambiente, possuindo também um controle automatizado da condição do ar de entrada. Quando o ar não estava de acordo com o programado (75% de UR), não houve insuflação. No terceiro silo o controle foi feito manualmente por um operador, que se baseava nas condições do ambiente para definir quando deveria ocorrer insuflação de ar. Vale ressaltar que essa última condição é a utilizada normalmente pelos produtores.



Figura 4: Silo metálico utilizado nos experimentos.

Durante o armazenamento a aeração para manutenção foi realizada com o ar em condições ambiente, desde que possuísse umidade relativa inferior a 70% e temperatura inferior a 20°C.

4.2 AMOSTRAGEM

O arroz (cultivar IRGA-419) utilizado para o preenchimento desses silos foi doado pelo Instituto Riograndense do Arroz sendo proveniente das culturas da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul.

A amostragem foi feita utilizando-se um amostrador pneumático manual, que pode ser visto na Figura 5, e realizada quinzenalmente enquanto os silos estavam em regime de secagem, ou seja, enquanto a umidade dos grãos era superior a 13%. Após esse período, passaram a ser realizadas mensalmente, até que se completou o período de nove meses, que corresponde ao período entre safras.

Para verificar se a posição dos grãos no silo interferiria em sua contaminação fúngica e de micotoxinas, foram retiradas amostras de cerca de 1Kg de arroz em casca, em duplicata, em duas alturas de cada silo. As amostras foram coletadas 0,15m e 1,60m do fundo falso.

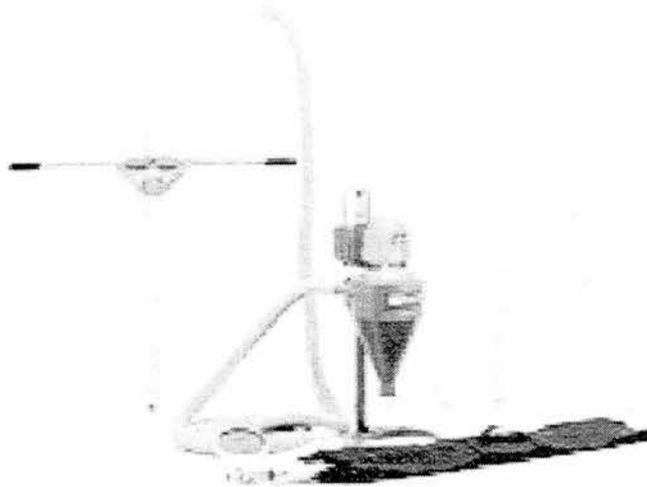


Figura 5: Amostrador manual pneumático.

Fonte: SILVA *et al.*, 2000c.

4.3 DETERMINAÇÕES FÍSICAS

Durante todo o período de observação foram realizadas medidas diárias de temperatura da massa de grãos no silo, temperatura ambiente e umidade relativa ambiente, no local onde o experimento estava sendo desenvolvido, para que se pudesse acompanhar a variação da temperatura e da umidade relativa da massa de grãos. A temperatura da massa de grãos foi determinada por medida direta, com o auxílio de uma termossonda. Os demais dados foram coletados a partir de sensores localizados em uma unidade meteorológica, instalada no EEA - IRGA. Já a umidade relativa da massa de grãos foi determinada a partir dos dados anteriores, com o auxílio do programa Psychart (Fang & Fon, 1995).

No EEA - IRGA, ainda foi realizada a análise diária da umidade do arroz, com o objetivo de acompanhar a secagem e as condições de armazenamento dos grãos. A metodologia utilizada foi a sugerida pelas Regras de Análise de Sementes (Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, 1992), que teve como fundamento a secagem dos grãos em casca e inteiros, em estufa com circulação de ar, a 105°C. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4 DETERMINAÇÕES QUÍMICAS

4.4.1 Determinação de Acidez

No Laboratório de Bromatologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA – UFRGS foi determinada a acidez lipídica dos grãos, para verificar a qualidade do produto durante a secagem e o armazenamento. Para isso, realizou-se uma extração lipídica em éter de petróleo e posteriormente uma titulação da fração lipídica obtida, solubilizada em éter etílico:álcool etílico (2:1), de acordo com a metodologia sugerida pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1976).

As amostras utilizadas para a análise de acidez lipídica foram trituradas a uma granulometria média de 1mm, em um moinho de facas e as análises realizadas em duplicata.

4.4.2 Determinação de Micotoxinas

No laboratório de Toxicologia do ICTA – UFRGS foi realizada a determinação das micotoxinas: aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona.

4.4.2.1 Preparo dos Padrões

Os padrões de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona utilizados nas análises foram da marca Sigma Chemical (EUA) e o preparo dos padrões foi realizado de acordo com as recomendações do item 970.44 e 971.22 da AOAC (1990), sendo as soluções estoques preparadas pela dissolução das micotoxinas em benzeno:acetonitrila (98:2). As soluções de trabalho foram obtidas pela dissolução sucessiva da solução estoque.

A concentração de cada um dos padrões foi estimada com base nas massas de cada uma das micotoxinas e seus respectivos volumes de dissolução. Para as análises quantitativas tornou-se necessário corrigir a concentração das soluções estoques. O procedimento adotado para essa etapa foi o sugerido pela AOAC (1990), que determina a concentração real da solução estoque com base na Equação 1.

$$C = \frac{PM \cdot 1000 \cdot Abs \cdot FC}{\varepsilon} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

C – concentração do padrão em $\mu\text{g/mL}$;

PM – peso molecular da micotoxina;

Abs – valor de absorvância no comprimento de onda máximo;

ε - coeficiente de absorvidade molar no mesmo comprimento de onda em L/cm.mol ;

FC – fator de correção do aparelho.

A determinação do fator de correção do aparelho foi realizada com base nos resultados obtidos durante a calibração do aparelho, com uma curva padrão de soluções de dicromato de potássio, de acordo com AOAC (1990). Os valores de PM, comprimento de onda máximo (λ) e ε de cada micotoxina fornecidos pela AOAC (1990) podem ser verificados na Tabela 3.

Tabela 3: Peso molecular, absorptividade molar e comprimento de onda máximo de absorção das micotoxinas.

Micotoxina	Peso Molecular	ϵ (L/cm.mol)	λ máximo (nm)
Aflatoxina B ₁	312	19800	348
Aflatoxina B ₂	314	20900	350
Aflatoxina G ₁	328	17100	355
Aflatoxina G ₂	330	18200	355
Ocratoxina A	403	5550	333
Zearalenona	318	6060	317

Fonte: AOAC (1990).

4.4.2.2 Avaliação da Confiabilidade do Método

Para avaliar a confiabilidade do método foram determinados o limite de detecção, o limite de quantificação e a recuperação da metodologia, para os padrões utilizados nas análises quantitativas, e o limite de detecção para aqueles padrões que foram utilizados somente nas análises qualitativas.

O limite de detecção foi alcançado pela redução gradual do volume de padrão, de concentração conhecida, aplicado na placa cromatográfica, até que não fosse mais possível a visualização da fluorescência.

O limite de quantificação foi determinado utilizando-se os extratos obtidos na avaliação da recuperação do método. Novamente fez-se uma série de aplicações, com o volume de extrato sendo gradualmente reduzido, até que a fluorescência não pudesse mais ser visualizada sob luz ultravioleta.

A recuperação do método foi determinada a partir da quantificação de amostras contaminadas intencionalmente. Para isso, amostras livres de micotoxinas foram contaminadas com 160µg/Kg (nível inferior) e 400µg/Kg (nível superior) e submetidas as etapas de extração e quantificação descritas no item 4.4.2.3.

4.4.2.3 Ocorrência de Micotoxinas nas Amostras

Para a avaliação do nível de contaminação por micotoxinas das amostras foi utilizada a metodologia de multitoxinas em camada delgada, descrita por Soares (1987), onde foram realizadas etapas de extração, limpeza e purificação do extrato, de acordo com o fluxograma da Figura 6.

Para a verificação da ocorrência de micotoxinas, as amostras foram trituradas a uma granulometria média de 1mm, em um moinho de facas. Todas as amostras foram analisadas na etapa de triagem, sendo que aquelas que se apresentaram suspeitas para alguma das micotoxinas analisadas foram extraídas em duplicata e submetidas à etapa de confirmação.

A confirmação das aflatoxinas B₁ e G₁ foi realizada através da derivatização do padrão e das amostras suspeitas com ácido trifluoroacético, de acordo com metodologia sugerida por Przybylski (1975). Ainda de acordo com o mesmo autor, foi realizada uma confirmação adicional para as

aflatoxinas B₁ e G₁, juntamente com a confirmação das aflatoxinas B₂ e G₂, utilizando-se reação com ácido inorgânico (H₂SO₄ 25%).

A ocratoxina A foi confirmada através de reação de derivatização com trifluoreto de boro, de acordo com metodologia sugerida por Hunt *et al.* (1980). Para a confirmação da zearalenona utilizou a derivatização descrita por Golinski e Grabarkiewicz-Szczesna (1984), seguida da revelação com AlCl₃ (20%, em álcool).

As amostras que foram confirmadas para a presença de micotoxinas foram então quantificadas por cromatografia em camada delgada, com o mesmo solvente utilizado na etapa de confirmação. Para isso fez-se uma comparação visual da intensidade de fluorescência, sob luz ultravioleta, entre as amostras confirmadas e séries de padrões de concentrações crescentes.

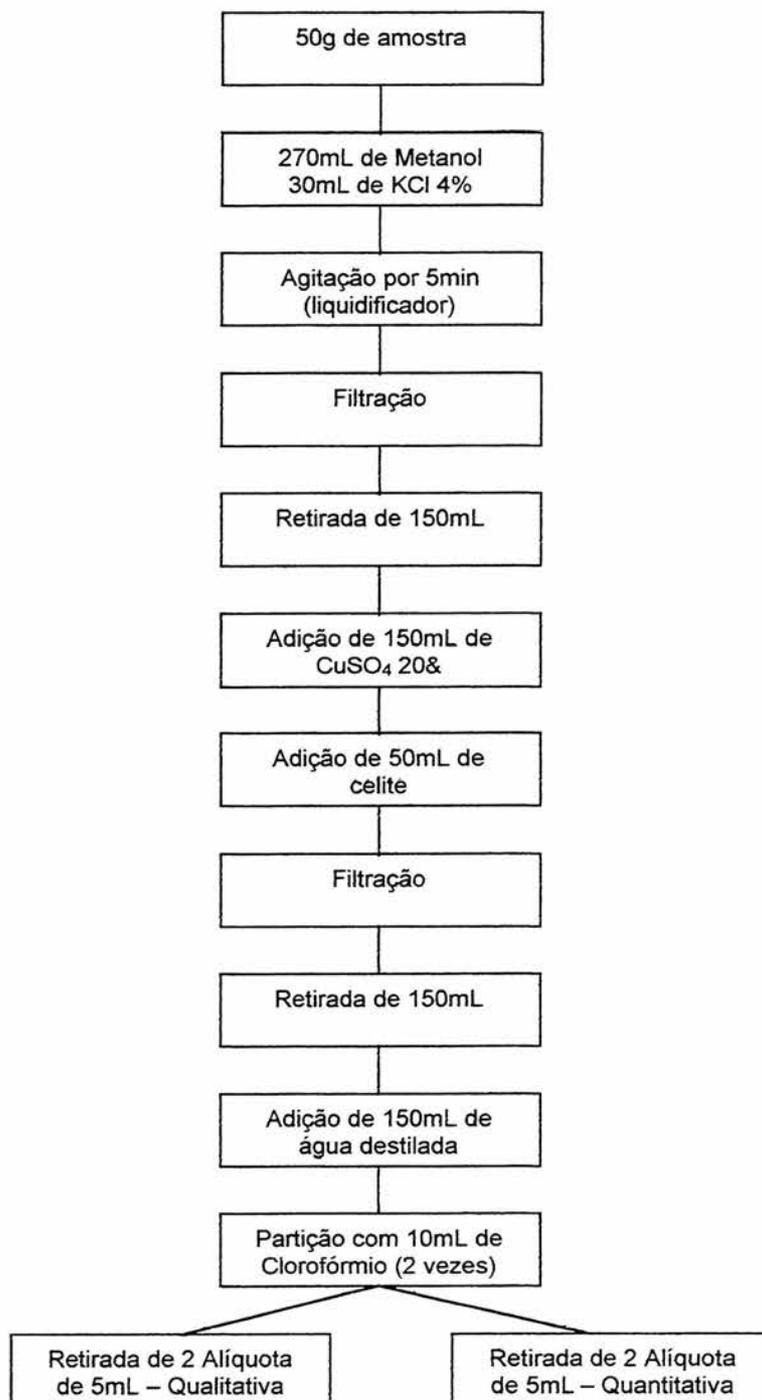


Figura 6: Fluxograma do método de extração de micotoxinas.

4.5 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

No laboratório de Toxicologia do ICTA – UFRGS foram realizadas as determinações para a verificação da incidência de fungos e avaliação das espécies.

4.5.1 Incidência de Fungos

A incidência de fungos foi quantificada através da enumeração de células viáveis expressas em unidades formadoras de colônia (UFC/g), de acordo com metodologia MB – 2750, sugerida pela ABNT (setembro/1987). Nessa análise foram utilizados os grãos com casca e inteiros, que sofreram trituração em *blender*, de acordo com a metodologia citada. Para a verificação da presença de fungos potencialmente produtores de micotoxinas, foi feito o isolamento à partir das placas utilizadas para a enumeração das células viáveis, de cerca de 10 colônias de fungos, distribuídos entre os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, que são gêneros de conhecido potencial toxigênico.

4.5.2 Identificação das Espécies Isoladas

A identificação dos isolados foi realizada através da metodologia descrita por Pitt (1988) e Klich & Pitt (1988), que fazem uso de chaves de identificação. Uma vez identificadas as espécies, aquelas potencialmente

produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A foram avaliadas para a produção dessas micotoxinas.

4.5.3 Avaliação do Potencial Toxigênico

Para os isolados do gênero *Aspergillus* foi feita uma reinoculação desses isolados para placas com meio de cultura ágar coco e incubadas a 25°C por 7 dias, de acordo com Lin & Dianese (1976). Já os isolados do gênero *Penicillium* foram reinoculados em ágar Sabouraud e incubados a 25°C por 21 dias, de acordo com Pinho (1998) Ao final do período de incubação as placas pertencentes aos dois gêneros foram raspadas e seu conteúdo submetido a uma extração com clorofórmio. Posteriormente, o extrato obtido foi aplicado em placas cromatográficas, para a avaliação da presença de ocratoxina A e de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo proposto é um experimento fatorial 3 x 2 x 2, onde o primeiro fator é o manejo, com três níveis, o segundo fator é a altura, com dois níveis e o terceiro é a operação realizada no sio, com 2 níveis. O terceiro fator foi representado pelas etapas de secagem e armazenamento e exclusivamente armazenamento, que aconteceu ao longo do tempo.

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Statistica 5.1 (SatSoft, 1998). Como variáveis-resposta foram determinadas: o número de células viáveis (UFC/g), a proporção de espécies fúngicas entre os isolados de cada amostra, o nível de acidez lipídica das amostras, a temperatura, a umidade relativa e a umidade da massa de grãos, bem como o número de amostras contaminadas por micotoxinas e o seu nível de contaminação.

Para verificar se houve diferença entre os três manejos, entre as alturas e no decorrer do tempo (secagem e armazenamento ou exclusivamente armazenamento), foi feita uma análise de variância. Nessa análise a variável resposta considerada foi a enumeração de células fúngicas viáveis, sendo que houve a necessidade de transformar matematicamente os dados originais (transformação logarítmica) para adaptá-los aos pré-requisitos da análise.

Tomando os parâmetros estudados que têm influência nos níveis de contaminação fúngica, foi verificado qual a influência exercida por cada uma das variáveis sobre a contaminação fúngica. Para isso, uma análise de regressão linear múltipla foi realizada utilizando-se como variáveis independentes a temperatura, a umidade dos grãos, a umidade relativa e o tempo, tendo a contaminação fúngica como variável dependente.

Com o objetivo de delinear o perfil da acidez lipídica, em cada um dos silos, em função dos fatores que podem influenciá-la foi realizada uma análise de regressão linear múltipla, onde pode ser observado o grau de

influência de cada uma das variáveis avaliadas. A variável dependente foi a acidez lipídica e as variáveis independentes consideradas foram: tempo de armazenamento, nível de contaminação fúngica, temperatura, umidade relativa e umidade dos grãos.

Com o objetivo de verificar quais os fatores teriam influência sobre a variação no percentual das espécies isoladas utilizou-se uma análise de regressão linear múltipla, onde as variáveis independentes foram umidade dos grãos, umidade relativa e temperatura e a variável dependente o percentual de espécies presentes em cada uma das amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÕES FÍSICAS

Os gráficos apresentados nas Figuras 7, 8 e 9 mostram, respectivamente, o comportamento da umidade dos grãos, UR e temperatura da massa de grãos ao longo do experimento.

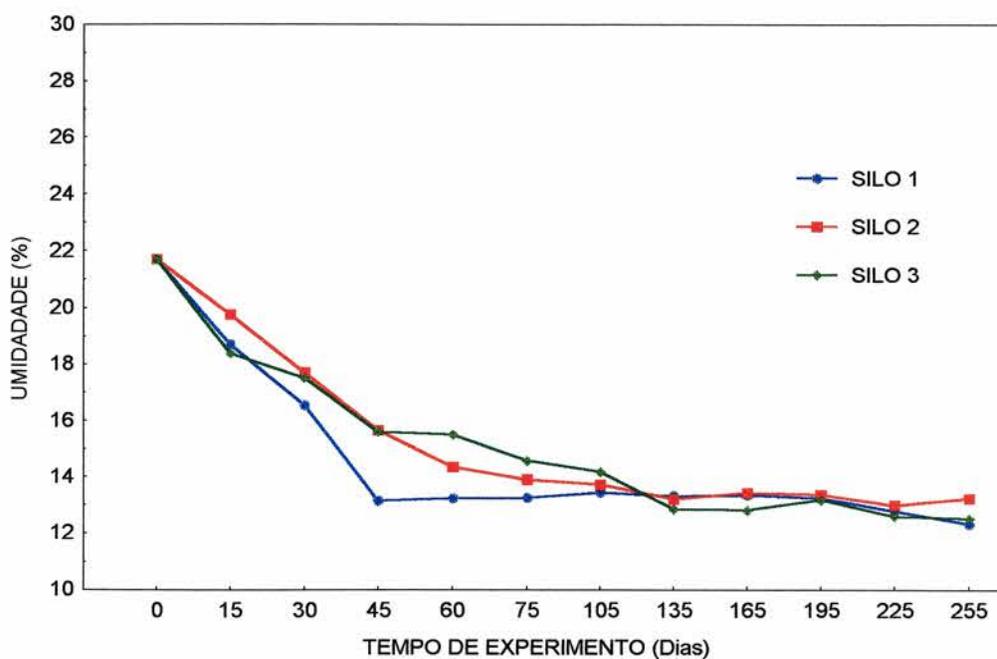


Figura 7: Umidade dos grãos em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de UR (ar quente – Silo 1 e ar ambiente – Silo 2) e controle manual (ar ambiente – Silo 3).

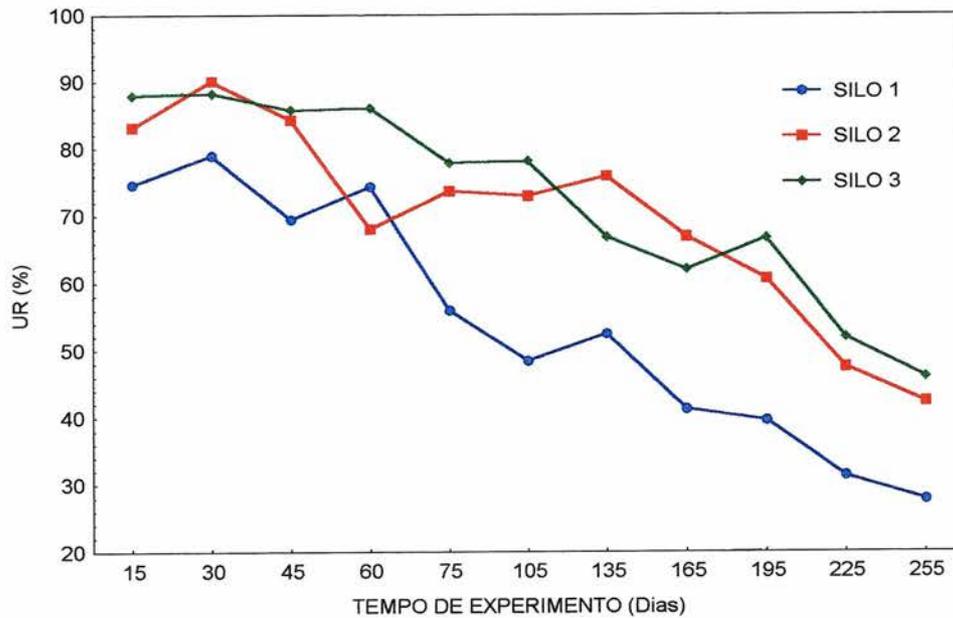


Figura 8: Umidade relativa dos grãos em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de UR (ar quente – Silo 1 e ar ambiente – Silo 2) e controle manual (ar ambiente – Silo 3).

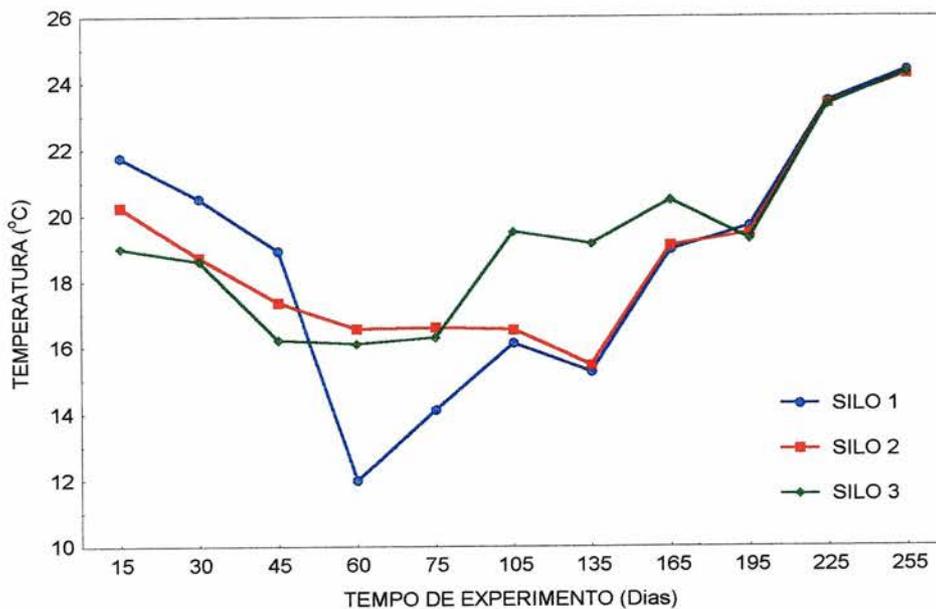


Figura 9: Temperatura dos grãos em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de UR (ar quente – Silo 1 e ar ambiente – Silo 2) e controle manual (ar ambiente – Silo 3).

Na Figura 7 pode-se observar que o Silo 1, que utilizou ar aquecido, apresentava índices de umidade seguros para o armazenamento a partir dos 45 dias de experimento, uma vez que os parâmetros adotados para o armazenamento foram de umidade variando entre 12-14% e temperatura da massa de grãos entre 20 e 25°C. Nessa ocasião, para esse silo, a insuflação com ar aquecido foi cortada, sendo mantida somente a aeração de segurança para o armazenamento. Já os Silos 2 e 3 apresentaram umidades seguras de armazenamento somente após 75 dias, quando esses silos também foram considerados em regime de armazenamento, sendo aerados somente para a manutenção. Para facilitar a análise dos resultados, porém, foi considerado que a secagem dos três silos se encerrou aos 75 dias. Os parâmetros adotados nesse experimento estão de acordo com os sugeridos por Lazzari (1997) para arroz armazenado por um período variando de 6 meses a 1 ano (umidade de 14-15% e temperatura de 20-25°C), como foi o caso do experimento.

Os valores observados para a UR nos Silos 2 e 3 (Figura 8) foram bastante semelhantes, enquanto o Silo 1 apresentou valores inferiores. De acordo com o gráfico, é possível observar que a partir dos 60 dias para o Silo 1, 135 dias para o Silo 2 e 165 dias para o Silo 3 a UR da massa de grãos era inferior a 70%, que de acordo com Hosney (1991) é geralmente o valor crítico de UR quando se deseja armazenar grãos por longos períodos de tempo.

Quanto à temperatura, a massa de grãos dos três silos permaneceu durante todo o período do experimento dentro dos valores previstos como

seguro tanto pelos parâmetros do experimento, como por Lazzari (1997), como pode ser observado na Figura 9.

5.2 DETERMINAÇÕES QUÍMICAS

5.2.1 Determinação de Acidez

Os valores de acidez obtidos ao longo do experimento podem ser observados nas Figuras 10 e 11, sendo a primeira referente as amostras da Altura 1 e a segunda referente as amostras da Altura 2.

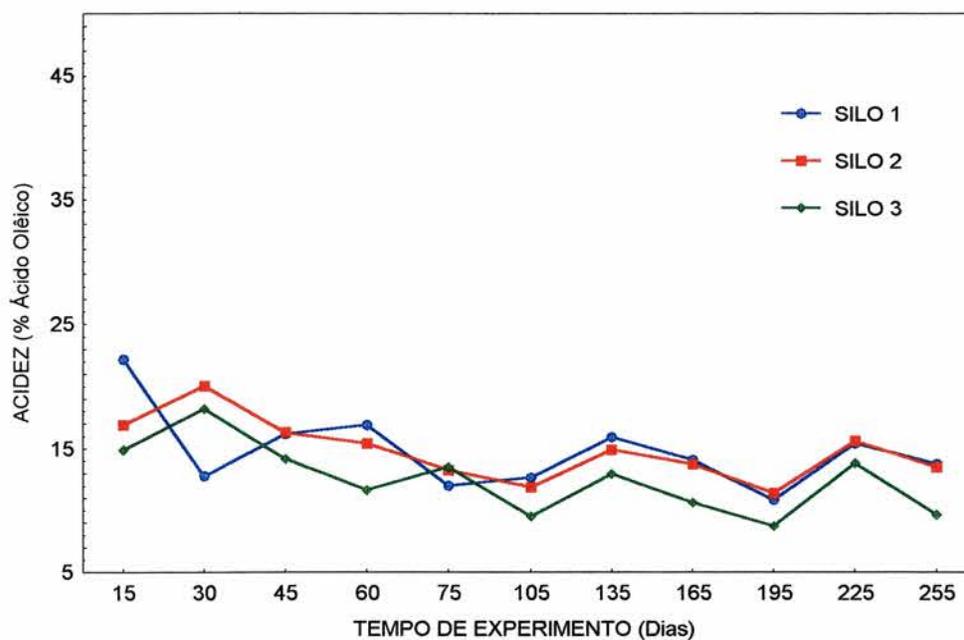


Figura 10: Acidez lipídica dos grãos, para a Altura 1, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de UR (ar quente – Silo 1 e ar ambiente – Silo 2) e controle manual (ar ambiente – Silo 3).

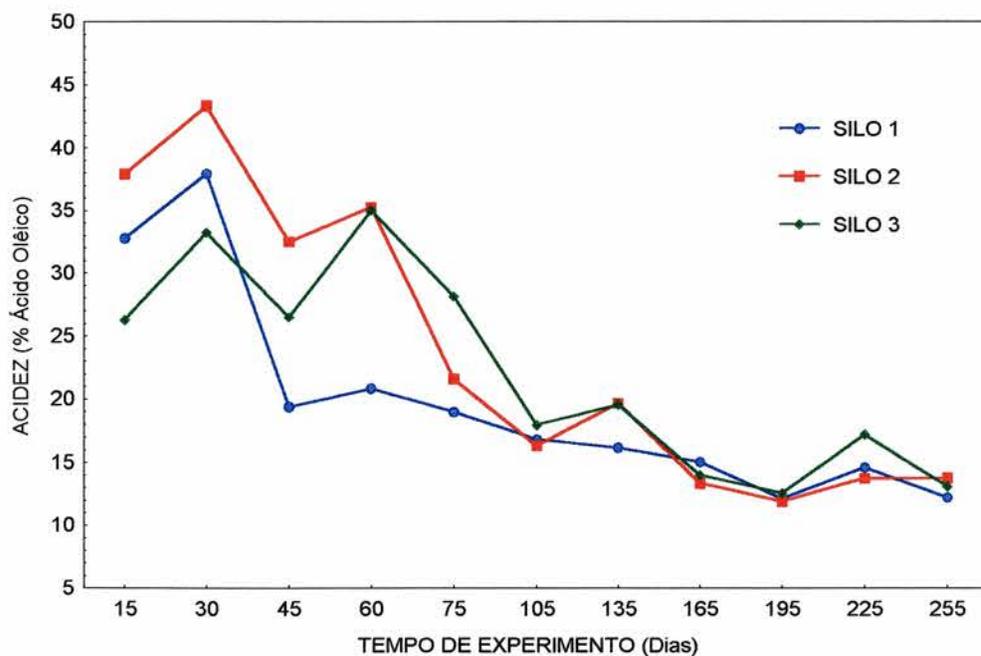


Figura 11: Acidez lipídica dos grãos, para a Altura 2, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de UR (ar quente – Silo 1 e ar ambiente – Silo 2) e controle manual (ar ambiente – Silo 3).

De acordo com as Figuras 10 e 11 os Silos 2 e 3 apresentaram comportamento bastante semelhantes durante todo o experimento, tanto para a Altura 1 como para a Altura 2. Já o Silo 1 apresentou comportamento ligeiramente diferente no período inicial do experimento (até 60 dias) e em seguida acompanhou os demais silos. Quanto as alturas, todos os silos apresentaram valores superiores de acidez na Altura 2.

5.2.2 Determinação de Micotoxinas

5.2.2.1 Avaliação da Confiabilidade do Método

A avaliação da performance do método para a zearalenona permitiu verificar uma recuperação média de 93%, limite de detecção de 110ng/mancha e limite de quantificação de 300ng/g, quando as placas foram reveladas com $AlCl_3$.

Utilizando análise de zearalenona por cromatografia em camada delgada Soares e Rodriguez-Amaya encontraram valores de recuperação variando de 96-107% para diferentes matrizes, limite de detecção de 55ng/g e limite de quantificação de 165ng/g. Já Nunes (2001), trabalhando com a mesma metodologia e arroz como matriz, encontrou níveis de recuperação de 75% e limite de detecção de 52ng/mancha, quando foi utilizado revelador.

Para os padrões utilizados somente nas análises qualitativas foi avaliado o limite de detecção, sendo eles de 5ng/mancha para ocratoxina A, 3ng/mancha para aflatoxina B_1 , 1ng/mancha para B_2 , 3ng/mancha para G_1 e 1ng/mancha para G_2 . Nunes (2001) utilizando também cromatografia em camada delgada encontrou como limite de detecção para aflatoxina B_1 2,5 μ g/Kg e 6,0 μ g/Kg para ocratoxina A.

As diferenças existentes entre os autores no que se refere a performance do método estão relacionadas com a própria subjetividade quantitativa do método, já que todas as medidas são realizadas por comparação visual.

5.2.2.2 Ocorrência de Micotoxinas nas Amostras

Durante a triagem algumas amostras apresentaram-se suspeitas para aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona. A Tabela 4 mostra o número de amostras suspeitas, a que silo elas pertenciam e qual a micotoxina suspeita.

Tabela 4: Amostras suspeitas de contaminação por micotoxinas.

	Número de Amostras suspeitas		
	Silo 1	Silo 2	Silo 3
Ocratoxina A	-	1	3
Zearalenona	30	31	22
Aflatoxina	-	1	2

As amostras suspeitas foram submetidas a metodologia apropriada para confirmação da micotoxina em questão, sendo as confirmadas quantificadas por comparação visual com padrões. A Tabela 5 apresenta o nível de contaminação apresentado pelas amostras confirmadas a que silo essas amostras pertenciam e qual a micotoxina em questão. Ressalta-se que as micotoxinas detectadas estavam presentes em amostras diferentes, sendo as do Silo 1 pertencentes à coleta feita aos 105 (5.850 μ g/Kg) e 195 (1.950 μ g/Kg) dias, enquanto a amostra do Silo 2 (1.840 μ g/Kg) havia sido coletada aos 195 dias.

Tabela 5: Nível de contaminação das amostras confirmadas para zearalenona.

	Nível de contaminação (μ g/Kg)		
	Silo 1	Silo 2	Silo 3
Zearalenona	5.850* e 1.950*	1.840*	-

*Os valores foram corrigidos considerando-se a recuperação do método.

A zearalenona é uma micotoxina tipicamente produzida por *Fusarium graminearum* e espécies relacionadas (Pitt, 2000). De acordo com Domingos (1986) o gênero *Fusarium* é classificado como fungo de campo, ou seja, fungo que ataca a planta no período que antecede a colheita e é comumente substituído pelos fungos de armazenamento nas etapas que precedem a colheita. Isso auxilia no entendimento da detecção de zearalenona no arroz e ausência de observação do gênero *Fusarium* nas etapas de enumeração e isolamento das colônias fúngicas (Item 5.3). Com base nisso pode-se supor que as amostras de arroz foram contaminadas por zearalenona no campo, nas etapas anteriores à colheita, permanecendo a toxina produzida mesmo durante o armazenamento, a despeito da substituição do gênero *Fusarium* por outros, conforme sugere Blaney *et al.* (1986) e Sinha *et al.* (1986).

Nunes (2001) analisando arroz integral, parboilizado e polido encontrou níveis de contaminação de até 1.950µg/Kg de zearalenona em arroz parboilizado e 1.120µg/Kg de zearalenona em amostras de arroz polido, mesmo não tendo sido observada a ocorrência de fungos do gênero *Fusarium* durante a identificação da microbiota fúngica das amostras, o que concorda com os resultados obtidos nesse trabalho.

As amostras suspeitas de contaminação por ocratoxina A e aflatoxinas não foram confirmadas para a presença dessas micotoxinas. Resultados semelhantes foram obtidos por Lima *et al.* (2000) que analisaram

90 amostras, sendo 30 de arroz polido, 30 de farelo de arroz e outras 30 de casca de arroz, e não observaram a ocorrência de aflatoxinas. Vale ressaltar que a ausência de micotoxinas foi observada apesar do isolamento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas do grupo B.

Após 45 dias de armazenamento o arroz já apresentava índices de umidade inferiores a 15% e esse pode ter sido um dos fatores que contribuiu para o não desenvolvimento de micotoxinas durante o armazenamento. De acordo com experimento desenvolvido por Abramson *et al.* (1999) a umidade dos grãos parece ter sido um dos fatores decisivos na produção de toxinas. Isso porque, amostras de cevada mantidas em condições simuladas de estocagem com conteúdo de umidade de 19% permitiram a produção de ocratoxina A, citrinina e esterigmatocistina, enquanto as amostras mantidas a 15% de umidade não apresentaram contaminação por nenhuma micotoxina. Em outro experimento, Abramson *et al.* (1990) demonstrou que grãos de trigo mantidos estocados com conteúdo de umidade de 15% apresentavam contaminação por ocratoxina A significativamente inferior a amostras estocadas com teor de umidade de 19%.

5.3 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

5.3.1 Incidência de Fungos

Os gráficos das Figuras 12 e 13 mostram a enumeração fúngica para os três silos, nas Alturas 1 e 2, ao longo do experimento. Através deles é possível observar que principalmente após o período de secagem (75 dias), para a Altura 1, o Silo 3 apresentou os menores valores de contaminação, enquanto o Silo 1, de modo geral apresentou os maiores. Esses resultados diferem dos esperados, uma vez que o silo que possuía controle das condições de entrada do ar durante a secagem não garantiu menores valores de enumeração fúngica depois da retirada da insuflação de ar. Vale ressaltar que para o Silo 1, nessa altura, o ar aquecido durante a secagem, nos primeiros 30 dias, causou uma redução da enumeração total fúngica. Observa-se ainda que após o período de secagem (75 dias) as contaminações fúngicas permaneceram estáveis em cada um dos silos, o que confirma ter sido alcançada as condições adequadas de armazenamento.

Na Figura 12 pode-se observar um pico de crescimento fúngico para o Silo 2 no período entre 30 e 60 dias que ocorreu apesar das condições de armazenamento não demonstrarem nenhuma alteração brusca (Figuras 7, 8 e 9) e a manutenção do silo (entrada de ar) ter ocorrido de forma normal.

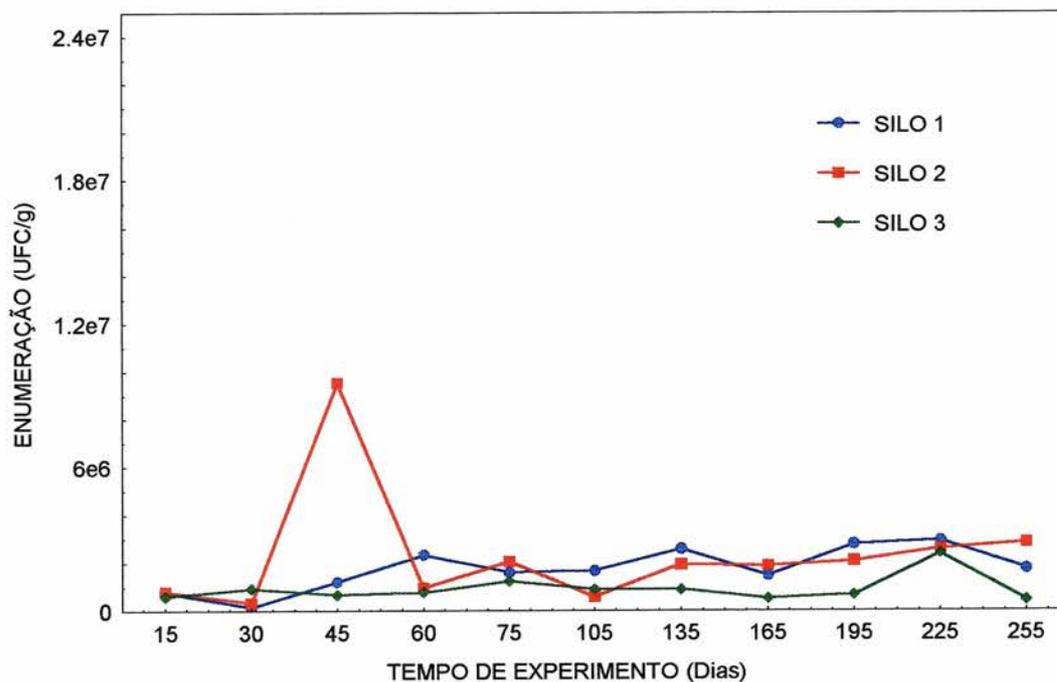


Figura 12:: Enumeração fúngica dos grãos, para a Altura 1, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de UR (ar quente – Silo 1 e ar ambiente – Silo 2) e controle manual (ar ambiente – Silo 3).

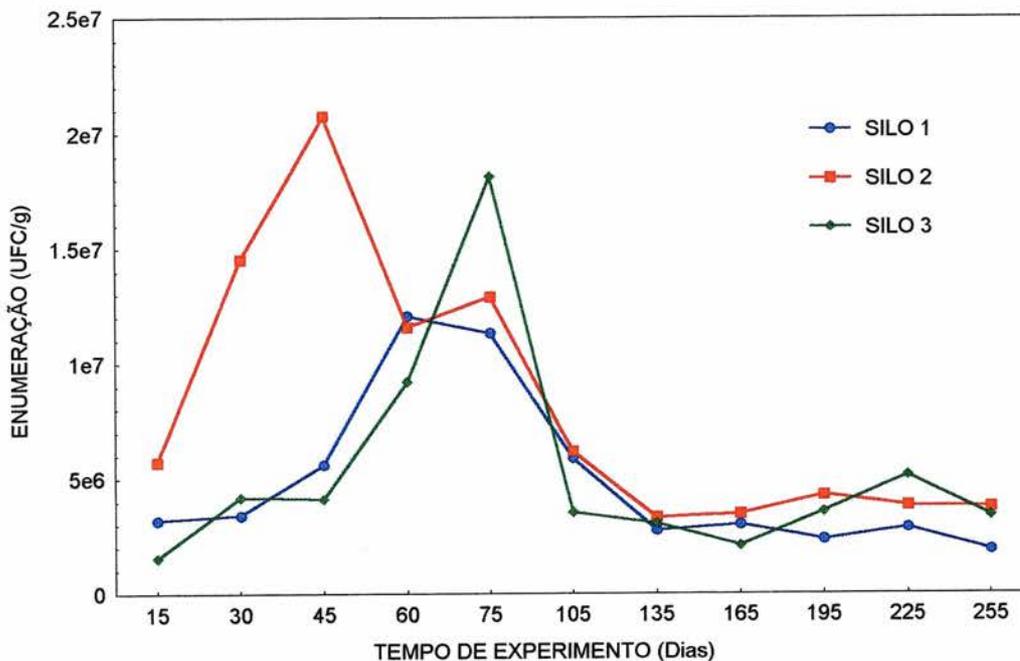


Figura 13: Enumeração fúngica dos grãos, para a Altura 2, em função do tempo nos silos com circulação forçada de ar, controle automático de UR (ar quente – Silo 1 e ar ambiente – Silo 2) e controle manual (ar ambiente – Silo 3).

Na Figura 13 pode-se observar que inicialmente as enumerações fúngicas foram bastante superiores às observadas na Altura 1. Esse fato pode ser explicado com base na frente de secagem ocasionada pelo ar de entrada que causou uma redução mais acentuada na umidade dos grãos da Altura 1 e uma redução de umidade mais lenta na Altura 2. Uma vez tendo sido atingido os valores desejados de umidade, também na Altura 2, então a contaminação fúngica para os três silos começou a sofrer redução considerável, o que pode ser observado à partir dos 75 dias de experimento. Além disso, à partir desse período foi retirada a insuflação de ar, que era um fator de contaminação da massa de grãos no silo, uma vez que o ar de entrada não sofria qualquer tipo de tratamento, além do aquecimento no Silo 1. Assim, retirada a entrada de ar contaminado e tendo sido atingido os teores de umidade e temperatura seguros para o armazenamento, a redução da enumeração fúngica era esperada, em todos os silos.

5.3.2 Identificação das Espécies Isoladas e Potencial Toxigênico

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais observados durante todo o experimento nas amostras. A presença predominante desses gêneros também foi observada em arroz por Tonon *et al.* (1997), Lima *et al.* (2000) e Nunes (2001).

A Figura 14 apresenta a frequência média de aparecimento de cada uma das espécies isoladas, desconsiderando o silo e a altura aos quais

pertenciam, enquanto as Figuras 15, 16 e 17 apresentam as espécies que foram mais freqüentemente isoladas nos Silos 1, 2 e 3, respectivamente.

Observando o gráfico da Figura 14 é possível verificar que dentre as espécies de *Penicillium* as que mais apareceram foram *P. crustosum*, *P. implicatum* e *P. canescens* enquanto dentre as espécies de *Aspergillus* as que se destacaram foram *A. flavus*, seguida de *A. parasiticus*. Tonon *et al.* (1997) analisando a micoflora de arroz em casca e moído, provenientes do nordeste da Argentina e sul do Paraguai, verificaram um domínio das espécies *Penicillium citrinum*, *P. islandicum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *Fusarium semitectum*. Apesar dos gêneros predominantes terem sido os mesmos, os resultados obtidos por Tonon *et al.* (1997) diferem em nível de espécie dos aqui apresentados. Essas diferenças podem ser atribuídas principalmente as diferenças climáticas entre as regiões de desenvolvimento das culturas.

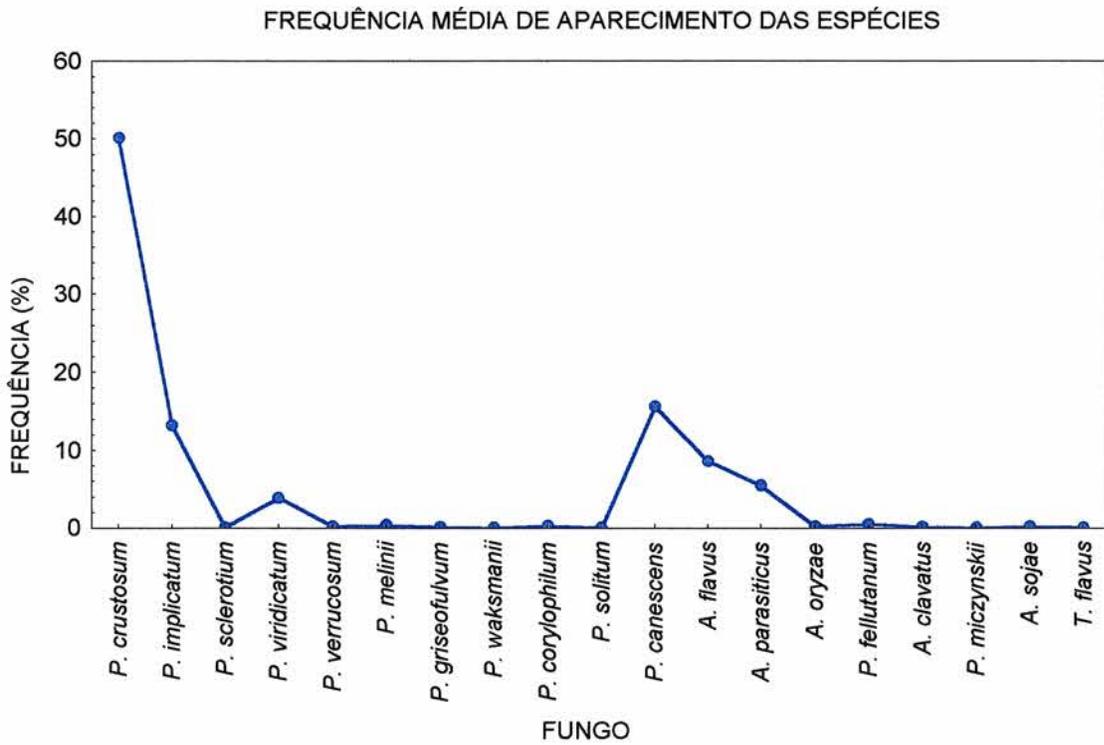


Figura 14: Frequência média de aparecimento das espécies isoladas ao longo do experimento, desconsiderando o silo ou a altura as quais pertenciam.

De acordo com Pitt (1988) *Penicillium crustosum* tem sido isolado a partir de muitos cereais, inclusive arroz, e rações animais, *Penicillium canescens* é um fungo amplamente distribuído e *Penicillium implicatum* possui características xerofílicas e é de significativa importância biodeterioradora em alimentos secos. Dentre esses fungos a presença de *Penicillium crustosum* deve ser especialmente monitorada, uma vez que essa espécie pode ser produtora da micotoxina penitreno A, produzida em condições de alta atividade de água (Pitt, 2002).

Vale ressaltar ainda, apesar da baixa frequência, o aparecimento de espécies micotoxigênicas descritas na Tabela 6, juntamente com as toxinas que podem produzir.

Tabela 6: Fungos potencialmente toxigênicos isolados das amostras e suas toxinas.

Espécie Fúngica	Toxina	Fonte
<i>P. viridicatum</i>	ácido penicílico	L'Vova <i>et al.</i> , 1992
<i>P. verrucosum</i>	ocratoxina A	Pitt, 1987
<i>P. griseofulvum</i>	roquefortina C, ácido ciclopiazônico, patulina e griseofulvina	Frisvad & Thrane (1995)
<i>A. flavus</i>	aflatoxinas (grupo B), ácido aspergílico e ácido ciclopiazônico	Frisvad & Thrane (1995)
<i>A. parasiticus</i>	aflatoxinas (grupo B e G), ácido aspergílico e ácido kojic	Frisvad & Thrane (1995)
<i>A. oryzae</i>	ácido kojic e ácido ciclopiazônico	Frisvad & Thrane (1995)
<i>A. clavatus</i>	patulina	Frisvad & Thrane (1995)
<i>A. sojae</i>	ácido kojic e ácido aspergílico	Frisvad & Thrane (1995)

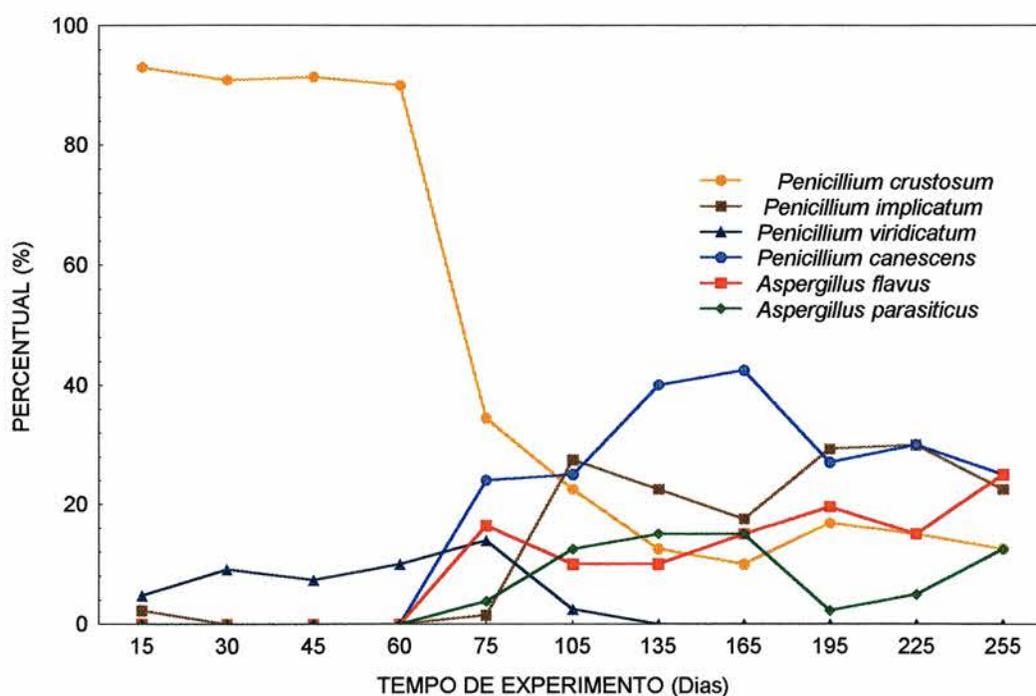


Figura 15: Espécies fúngicas identificadas de maior frequência no Silo 1, ao longo do experimento.

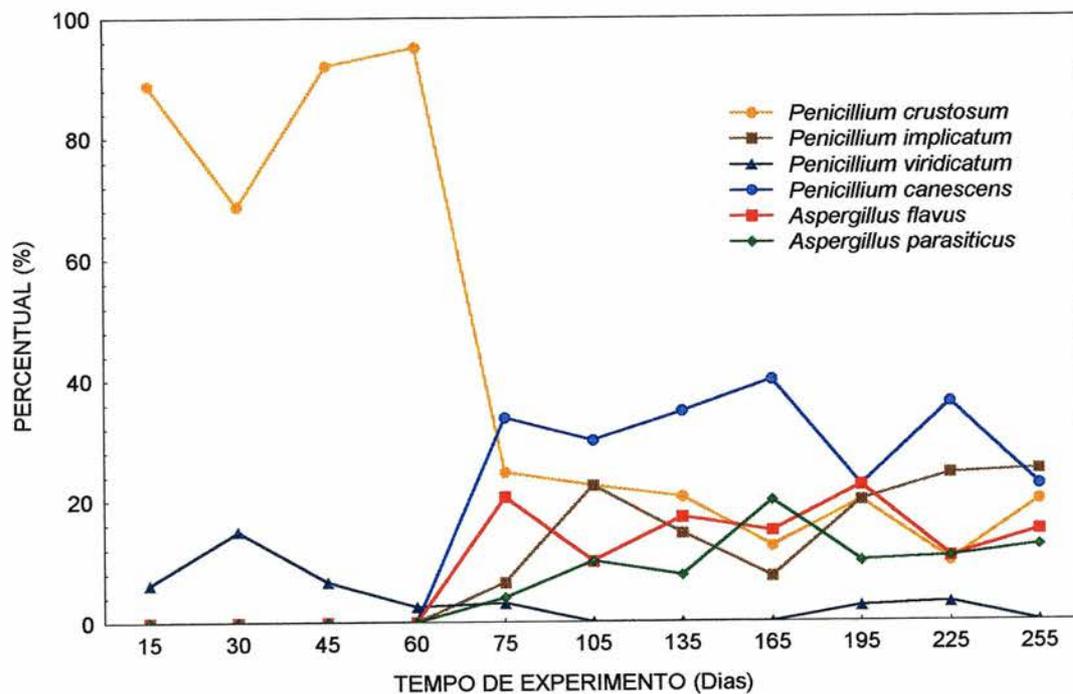


Figura 16: Espécies fúngicas identificadas de maior freqüência no Silo 2, ao longo do experimento.

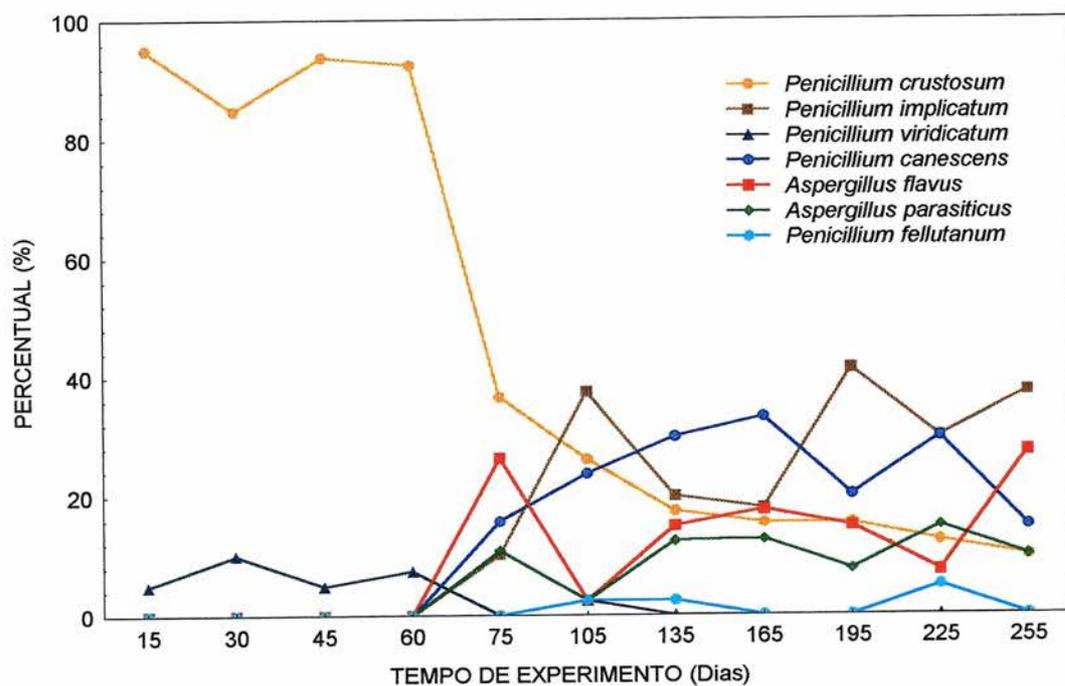


Figura 17: Espécies fúngicas identificadas de maior freqüência no Silo 3, ao longo do experimento.

5.3.3 Avaliação do Potencial Toxigênico

Os isolados da espécie *Penicillium verrucosum* foram testados de acordo com a metodologia descrita no Item 4.5.3 para a presença de ocratoxina A. Porém, nas condições estudadas, nenhum isolado apresentou produção da micotoxina testada. Vale lembrar que muitas outras espécies toxigênicas foram identificadas e não puderam ser testadas pela falta de padrões adequados.

Testes de potencial micotoxigênico também foram realizados para observar o comportamento dos isolados das espécies de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*. A Tabela 7 apresenta o número de isolados testados, o número de isolados que tiveram seus metabólitos secundários confirmados para aflatoxinas e suas respectivas identificações.

Tabela 7: Teste de potencial toxigênico em isolados de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*.

	Nº de isolados testados	Nº de isolados confirmados	Micotoxina
<i>Aspergillus flavus</i>	137	2	Afla B ₁ e B ₂
<i>Aspergillus parasiticus</i>	85	-	-

Os dois isolados que se apresentaram como produtores de aflatoxina nas condições testadas pertenciam a espécie *Aspergillus flavus*, que de acordo com Frisvad e Thrane (1995) é produtora de aflatoxinas somente do grupo B, o que concorda com os resultados obtidos.

Apesar do grande número de cepas testadas, somente 2 ($\approx 1\%$) se mostraram como produtoras de aflatoxinas nas condições utilizadas (ágar coco, 7 dias a 25°C). Esse número poderia ser elevado caso as condições de teste de potencial toxigênico fossem alteradas, como, por exemplo, o meio de cultura. De acordo com Raybaudi *et al.* (2000), em um estudo de potencial toxigênico, realizado com isolados de *Aspergillus flavus* e *parasiticus*, cerca de 37% dos isolados apresentaram produção de aflatoxinas em arroz, enquanto somente cerca de 4% dos testados produziu aflatoxinas em ágar coco.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.4.1 Comparação entre os Silos com relação à Enumeração Fúngica

Para avaliar se houve diferença entre os três silos foi realizada uma análise de variância para experimento fatorial $3 \times 2 \times 2$, onde a variável resposta avaliada foi a enumeração de células fúngicas. Para essa análise foram levadas em consideração as alturas de coleta de amostra e o período de experimento foi dividido nominalmente em duas etapas: secagem e armazenamento. A primeira etapa consistiu de secagem integrada ao armazenamento e a segunda de exclusivo regime de armazenamento (insuflação de ar suspensa).

Para essa etapa houve a necessidade de transformar os dados originais de enumeração fúngica para adaptá-los aos pré-requisitos da análise, de modo que uma transformação logarítmica foi aplicada. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos na análise para as variáveis, tanto em separado, como para as interações entre essas variáveis. Pelos resultados expressos nessa tabela é possível verificar uma interação altamente significativa entre as variáveis avaliadas, ou seja, uma forte interação entre os fatores silo, operação (secagem e armazenamento) e altura, no que se refere à enumeração dos fungos. Isso significa dizer que os silos podem diferir entre si, dependendo da altura e/ou da operação considerada, no que se refere à enumeração fúngica.

Tabela 8: Resultados da análise de variância para experimento fatorial 3 x 2 x 2 (silo x operação x altura).

	Valor de F	p-level
1 - Silo	109,87	0,000
2 - Operação	0,88	0,348
3 - Altura	1.866,26	0,000
Interação 1-2	6,24	0,002
Interação 1-3	66,512	0,000
Interação 2-3	301,90	0,000
Interação 1-2-3	53,22	0,000

A Figura 18 mostra os gráficos obtidos pela análise de variância e serve de base para os resultados obtidos pelo teste de Tukey para comparação de médias.

A análise de Tukey permitiu observar que para a Altura 1 e a operação de secagem não houve diferença significativa entre os Silos 1 e 3, sendo estes os que apresentaram melhores resultados, ou seja, valores inferiores para enumeração fúngica. Da mesma maneira, na Altura 2 os resultados demonstraram que durante a secagem os menores índices de contaminação fúngica foram obtidos para os Silos 1 e 3, que não apresentaram diferença significativa entre si. Com base nos resultados descritos é possível dizer que durante a operação de secagem os melhores resultados foram obtidos para os Silos 1 e 3, independentemente da altura.

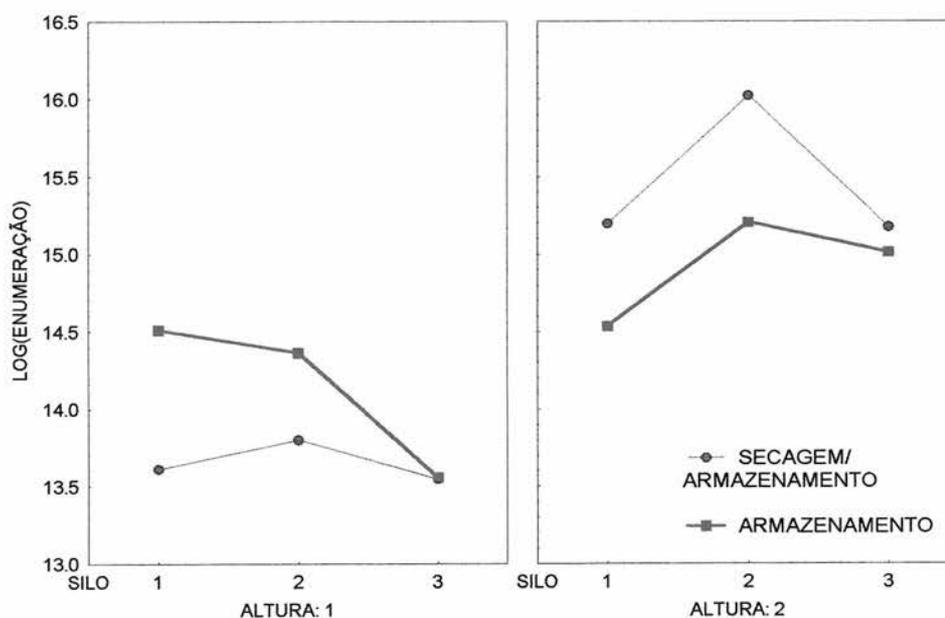


Figura 18: Médias de Log(Enumeração) para análise de variância para experimento fatorial 3 x 2 x 2 (silo x operação x altura).

Com relação à operação de armazenamento, o teste de comparação das médias permitiu observar que na Altura 1 o Silo 3 foi o que apresentou os melhores resultados, enquanto na Altura 2 os menores valores de

contaminação ocorreram no Silo 1. Um dos fatores que pode ter contribuído para isso é o teor de umidade, que durante o período de armazenamento foi inferior na Altura 1 - Silo 3 e inferior na Altura 2 - Silo 1.

Dessa forma, a análise de variância realizada sugere que dentre os silos avaliados, no que se refere à contaminação fúngica, os Silos 1 e 3 devem ser os eleitos para o armazenamento do arroz de modo mais controlado.

5.4.2 Influência dos Fatores Abióticos sobre a Contaminação Fúngica

Para avaliar qual a influência exercida pela temperatura, umidade dos grãos, umidade relativa e o tempo sobre a contaminação fúngica foi realizada uma análise de regressão linear múltipla. Nessa etapa foi realizada uma transformação logarítmica nos dados originais de enumeração fúngica para adaptá-los aos pré-requisitos. A partir dessa análise foi possível observar que todas as variáveis avaliadas tiveram influência significativa no processo. A Tabela 9 apresenta os coeficientes de cada variável (padronizado e real), além do nível de significância das variáveis no processo.

Tabela 9: Resultados da análise de regressão linear múltipla para a enumeração fúngica.

	BETA	B	p-level
Intercepto		13,725	0,0000
Temperatura	-0,540	-0,192	0,0000
Umidade	0,570	0,275	0,0000
Tempo	0,562	0,008	0,0000
UR	-0,084	-0,005	0,0069

Os resultados da Tabela 9 demonstram que existe uma influência significativa das variáveis avaliadas sobre a enumeração fúngica ($p < 0,05$). Além disso, observa-se que a influência dada pelas variáveis ocorreu na seguinte ordem decrescente: umidade, tempo, temperatura e UR, como mostra os valores absolutos dos coeficientes padronizados (Beta). Ainda a partir desses resultados é possível expressar uma equação que explique o comportamento das variáveis avaliadas sobre a enumeração fúngica. A Equação 2 apresenta um coeficiente de correlação múltiplo de 0,52, que pode ser considerado bom.

$$\text{LogEnumeração} = 13,725 - 0,192 \cdot \text{Temp} + 0,275 \cdot \text{Umid} + 0,008 \cdot \text{Tempo} - 0,005 \cdot \text{UR}$$

Equação 2

De acordo com os resultados obtidos é possível dizer que a enumeração fúngica apresenta uma correlação negativa com a temperatura e com a UR, ou seja, quanto maiores forem esses valores, menores serão os índices de contaminação por fungos. Resultados discordantes foram encontrados por Paster & Bullerman (1988) que observaram uma redução em peso de micélio com a redução da temperatura.

A Figura 19 mostra de modo isolado o efeito da temperatura sobre a enumeração fúngica. Pelo gráfico da figura é possível observar que à medida que a temperatura aumenta há uma tendência da enumeração fúngica diminuir. Isso pode estar relacionado com as características fisiológicas das espécies

fúngicas envolvidas no armazenamento. Mesmo quando se fez a análise de regressão linear considerando outras variáveis conjuntamente o efeito negativo da temperatura permaneceu sobre a enumeração fúngica.

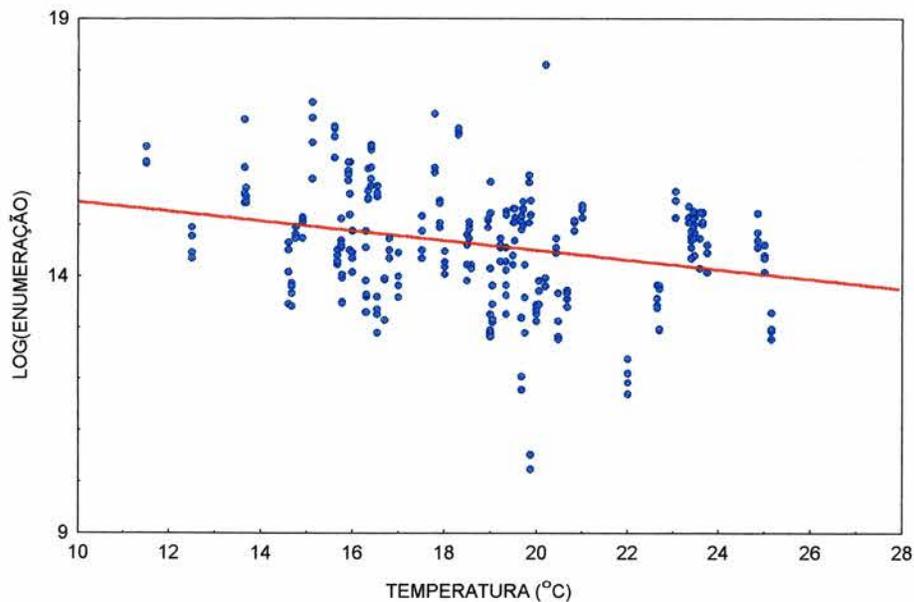


Figura 19: Efeito isolado da temperatura sobre a enumeração fúngica.

A Figura 20 mostra a relação isolada da UR com a enumeração fúngica, onde é possível notar uma tendência de correlação positiva entre essas variáveis. De acordo com Ellis *et al.* (1993) um fator muito importante a ser considerado, nesse caso, é o efeito sinérgico da UR e dos outros fatores abióticos sobre a resposta fúngica. Isso explica o fato de que quando a análise de regressão linear múltipla considerou os outros fatores abióticos, o efeito da UR passou a ser o inverso daquele apresentado de modo isolado.

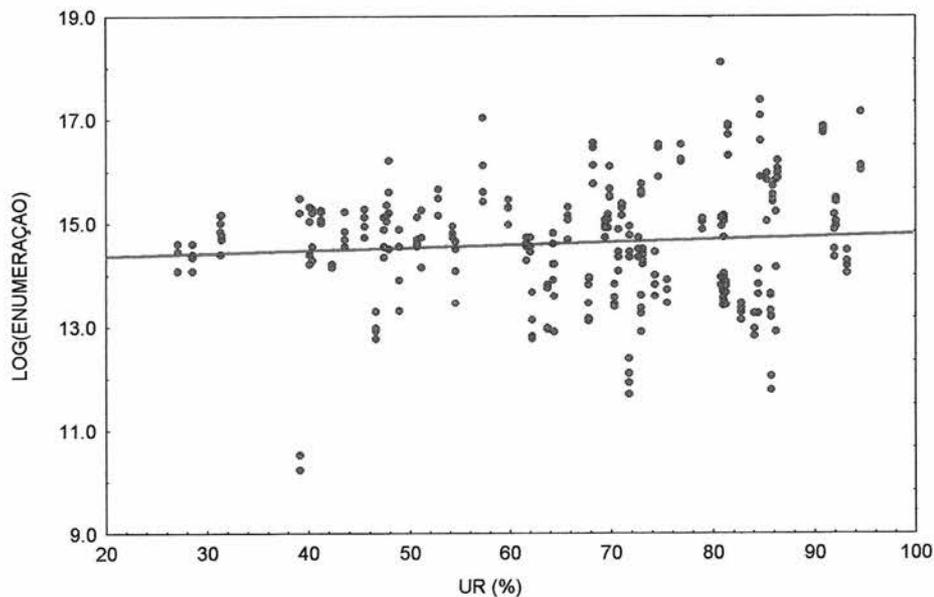


Figura 20: Efeito isolado da UR sobre a enumeração fúngica.

Analisando ainda a Equação 2 é possível correlacionar, porém de modo positivo, a enumeração de fungos com a umidade e o tempo de armazenamento. Assim, um aumento na umidade e/ou no tempo de estocagem é refletido positivamente no crescimento fúngico.

5.4.3 Influência dos Fatores Bióticos e Abióticos na Acidez Lipídica

Para avaliar o perfil da acidez lipídica em cada um dos silos, foi realizada uma análise de regressão linear múltipla, onde a variável dependente foi a acidez lipídica e as variáveis independentes o tempo de armazenamento, o nível de contaminação fúngica, a temperatura, a umidade relativa e umidade dos grãos. Nessa etapa foram realizadas transformações logarítmicas nos dados originais de enumeração fúngica e acidez lipídica para adaptá-los aos pré-requisitos da análise. Os resultados dessa análise estão na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados da análise de regressão múltipla, para cada um dos silos.

Silo 1			
$\text{LogAcidez} = 0,073(\text{Umid}) + 0,013(\text{UR}) + 0,057[\text{Log}(\text{Enum})] + 0,001(\text{Tempo})$ $r = 0,81$			
	BETA	B	p-level
Umidade	0,509	0,073	0,0000
UR	0,676	0,013	0,0000
Log(Enumeração)	0,197	0,057	0,0000
Tempo	0,370	0,001	0,0000
Silo 2			
$\text{LogAcidez} = 0,934 + 0,091(\text{Umid}) + 0,117[\text{Log}(\text{Enum})] - 0,002(\text{Tempo}) - 0,023(\text{Temp}) - 0,007(\text{UR})$ $r = 0,87$			
	BETA	B	p-level
Intercepto		0,934	0,0000
Umidade	0,551	0,091	0,0000
Log(Enumeração)	0,342	0,117	0,0000
Tempo	-0,384	-0,002	0,0000
Temperatura	-0,163	-0,023	0,0000
UR	-0,242	-0,007	0,0000
Silo 3			
$\text{LogAcidez} = 0,085(\text{Umid}) + 0,232[\text{Log}(\text{Enum})] - 0,003(\text{Tempo}) - 0,017(\text{UR}) - 0,022(\text{Temp})$ $r = 0,91$			
	BETA	B	p-level
Umidade	0,468	0,085	0,0000
Log(Enumeração)	0,580	0,232	0,0000
Tempo	-0,637	-0,003	0,0000
UR	-0,615	-0,017	0,0000
Temperatura	-0,153	-0,022	0,0000

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que cada silo foi influenciado por diferentes variáveis. Apesar disso, todas variáveis, com exceção da UR e do tempo de armazenamento, influenciaram igualmente o

sistema, ou seja, sempre de modo positivo ou negativo, o que pode ser observado pelos valores dos coeficientes reais (B) ou padronizados (Beta).

Para a enumeração fúngica, de acordo com as equações da Tabela 10, tem-se uma correlação positiva entre essa variável e a acidez dos lipídios. Esse comportamento é o sugerido por Farroni & Silva (2000), que atribui aos fungos presentes no armazenamento a aceleração da liberação de ácidos graxos, em função da alta atividade lipolítica desses microrganismos.

De acordo com as equações obtidas nas análises pode-se dizer que a umidade possui uma correlação positiva com o logaritmo da acidez. Assim, com o aumento dessa variável há um aumento na acidez lipídica. De acordo com Bilhalva (1979), a hidrólise dos lipídios durante o armazenamento pode ocorrer pela ação de enzimas lipolíticas, que é favorecido pela temperatura e conteúdo de umidade elevados, o que concorda com a ação da umidade encontrada nesse trabalho. Porém, pelas equações dos Silos 2 e 3 tem-se um efeito negativo da temperatura frente a acidez lipídica, o que é discordante da afirmação feita por Bilhalva (1979). O comportamento da temperatura, nesses casos, poderia ser explicado pelo seu efeito sobre a oxidação de ácidos graxos livres, levando a formação de hidroperóxidos. Segundo Sowbhagya & Bhattacharya (1976) as condições de temperatura e luminosidade são particularmente importantes para as taxas de hidrólise e oxidação dos lipídios do arroz, durante o período de estocagem. Assim, um aumento de temperatura poderia ocasionar um aumento na taxa de oxidação dos ácidos graxos livres.

Isso levaria a uma redução da acidez lipídica do arroz, principalmente porque de acordo com Hamilton (1983), os ácidos graxos livres são os substratos mais importantes nas reações de oxidação lipídica durante a estocagem.

Para o efeito da temperatura sobre a acidez lipídica é possível verificar uma atuação direta e indireta dessa variável. A ação direta, já discutida, envolve as reações de oxidação de ácidos graxos. Já a atuação de modo indireto é percebida quando se analisa conjuntamente o resultado obtido para a temperatura sobre a enumeração fúngica. Nessa ocasião, foi possível observar que a temperatura teve um efeito negativo sobre a contaminação fúngica, ou seja, com o aumento da temperatura havia uma redução na enumeração fúngica, que poderia causar uma redução na acidez lipídica, de modo indireto.

A relação da UR com a acidez lipídica dada pelas equações da Tabela 10 mostra um comportamento divergente dessa variável para o Silo 1, quando comparado ao 2 e 3. No primeiro caso o que se observa é um comportamento positivo da UR sobre a acidez do arroz, enquanto no caso do Silo 2 e 3 um aumento na UR leva a uma redução na acidez lipídica. Porém, quando se avalia o papel da UR isoladamente sobre a acidez lipídica nesses silos o que se observa é uma correlação positiva entre a acidez e a UR. Esse fato deixa claro que a correlação negativa encontrada na análise de regressão linear múltipla nesses silos é o resultado da interação dessa variável com os outros fatores bióticos e abióticos do sistema.

O tempo de armazenamento é o responsável por permitir que as reações bioquímicas aqui discutidas ocorram, uma vez que é ao longo do período que os fatores abióticos e bióticos se manifestam sobre o sistema. Quando se avalia o tempo de armazenamento sobre a acidez lipídica durante todo o experimento, de modo isolado, o que se observa é uma influência negativa dessa variável. A inversão, porém, dessa influência sobre o sistema do Silo 1 deve ser explicada pela interação com as outras variáveis do sistema e demonstra que as relações de colinearidade entre as variáveis independentes são diferentes nesse silo.

De modo geral, as análises demonstraram que os fatores bióticos e abióticos influenciam a acidez lipídica do arroz e que a resposta dada por um sistema de armazenamento não será o resultado da atuação isolada desses fatores, mas sim de uma interação entre eles. Assim, o conhecimento dessas interações torna-se essencial para a avaliação do sistema como um todo.

5.4.4 Influência dos Fatores Abióticos sobre as Espécies Isoladas

Com o intuito de verificar quais os fatores teriam influência sobre a variação no percentual das espécies isoladas (variação da população fúngica) utilizou-se uma análise de regressão linear múltipla, onde as variáveis independentes foram umidade dos grãos, umidade relativa e temperatura e a variável dependente o percentual de espécies presentes em cada uma das amostras. Os resultados obtidos por essa análise estão apresentados na

Tabela 11 e permitiram observar que os fungos isolados foram influenciados de modo regular ($r = 0,37$) pela UR e umidade.

Tabela 11: Análise da regressão linear múltipla para as populações fúngicas.

	BETA	B	p-level
Intercepto		-21,637	0,0049
UR	0,256	0,378	0,0000
Umidade	0,152	1,971	0,0039

A análise realizada permitiu ainda agrupar algumas espécies fúngicas com relação aos fatores abióticos que as influenciam, a um nível de significância de 5% e uma correlação próximo a 0,5. Dessa forma, a Tabela 12 mostra cada fator abiótico e a espécie fúngica que ele influencia.

Tabela 12: Influência dos fatores abióticos sobre algumas espécies fúngicas.

Fator abiótico	Tipo de Influência	
	Positiva	Negativa
Umidade Relativa	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Penicillium implicatum</i> , <i>P. canescens</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>
Umidade	-	<i>Penicillium implicatum</i> e <i>Aspergillus flavus</i>
Temperatura	<i>Penicillium implicatum</i>	-

Os dados da Tabela 12 permitem observar que para o controle das espécies avaliadas o fator abiótico alvo deve ser a UR, de modo preferencial, seguida pela umidade dos grãos e temperatura.

Segundo Pitt e Hocking (1997) o *Penicillium implicatum* possui características xerofílicas, de modo que baixos índices de umidade e umidade relativa tornam o ambiente propício para o desenvolvimento dessa espécie, de modo semelhante ao observado nesse trabalho (Tabela 12). Ainda de acordo com esses autores, os *Aspergillus flavus* e *parasiticus* podem apresentar crescimento em substratos com baixa atividade de água (0,80), dependendo da temperatura. Isso pode ter contribuído para essas espécies também apresentarem uma correlação negativa com a umidade e a umidade relativa.

Em estudo realizado por Pozzi *et al.* (1995) não foi possível encontrar uma correlação linear simples significativa entre o tempo de estocagem, fatores abióticos e a enumeração de fúngica dos gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium*. De modo que os dois gêneros mostraram uma relativa uniformidade em sua distribuição.

8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se dizer que durante a operação de secagem integrada ao armazenamento (0-75 dias) os melhores resultados foram obtidos para os Silos 1 e 3, independentemente da altura. Já para a operação de exclusivo armazenamento (75-255 dias), o Silo 3 apresentou os melhores resultados para a Altura 1 e o Silo 1 para a Altura 2.

Quanto à presença de micotoxinas foram detectadas contaminações por zearalenona em níveis de 5.850 μ g/Kg e 1.950 μ g/Kg no Silo 1, e 1.840 μ g/Kg no Silo 2.

As espécies fúngicas isoladas mais freqüentemente foram *Penicillium crustosum*, *Penicillium canescens* e *Penicillium implicatum*. Dentre as espécies potencialmente toxigênicas testadas foram identificados dois isolados de *Aspergillus flavus* produtores de aflatoxina B₁ e B₂.

Durante o experimento as variáveis que influenciaram a contaminação fúngica foram umidade, tempo, temperatura e UR, em ordem decrescente de influência. Além disso, observou-se que as variáveis

temperatura e UR correlacionaram-se negativamente com a enumeração fúngica, enquanto a umidade e o tempo atuaram de modo positivo.

A avaliação do perfil da acidez lipídica em cada um dos silos demonstrou que cada sistema foi influenciado por um grupo particular de variáveis, dentre as avaliadas. Apesar disso, todas variáveis, com exceção da UR e do tempo de armazenamento, influenciaram igualmente o sistema, ou seja, sempre de modo positivo ou negativo. A análise permitiu ainda verificar que o conhecimento da interação entre as variáveis é de extrema importância para a avaliação do sistema como um todo.

A avaliação dos fatores abióticos sobre a frequência das espécies fúngicas isoladas permitiu observar que houve uma correlação regular ($r = 0,37$) entre essas espécies e os fatores UR e umidade. Além disso, foi possível agrupar as espécies fúngicas de maior frequência, com relação aos fatores abióticos que as influenciam. Assim, as espécies *Penicillium crustosum*, *Penicillium implicatum*, *P. canescens*, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* foram influenciadas pela UR, as espécies de *Penicillium implicatum* e *Aspergillus flavus* sofreram influência da umidade, enquanto a espécie *Penicillium implicatum* correlacionou-se com a temperatura.

10 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliação do efeito do armazenamento sobre a enumeração de fungos toxigênicos e micotoxinas em arroz armazenado ensacado (método tradicional);
- ✓ Avaliação da influência da integridade dos grãos de arroz sobre a incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas;
- ✓ Verificação das correlações entre a enumeração fúngica e os fatores abióticos em arroz armazenado ensacado;
- ✓ Verificação das correlações entre a acidez fúngica e os fatores bióticos e abióticos em arroz armazenado ensacado;
- ✓ Avaliação do potencial toxigênico dos isolados pertencentes as espécies *Aspergillus flavus* e *parasiticus* no arroz em casca e/ou moído.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, D.; MILLS, J.T.; SINHA, R.N. Micotoxin production in amber durum wheat stored at 15 and 19% moisture content. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 7, n. 5, p. 617-627, 1990.

ABRAMSON, D.; HULASARE, R.; WHITE, N.D.G.; JAYAS, D.S.; MARKUARDT, R.R. Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Journal of Stored Products Research**, Kindlington, v. 35, p. 297-305, 1999.

ADEBAJO, L.O.; BAMGBELU, O.A.; OLOWU, R.A. Mold contamination and the influence of water activity and temperature on mycotoxin production by two *Aspergilli* in melon seed. **Nahrung**, Weinheim, v. 38, p. 209-217, 1994.

ARROZPEC – O Portal do Arroz e da Pecuária. Contém informações sobre indicadores econômicos, cotações, análises de mercado, tecnologia e climatologia. Disponível em <<http://www.arrozpec.com.br>>. Acesso em 5 de junho de 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Alimentos – Contagem de Bolores e Leveduras em Placas**. MB – 2750, setembro de 1987.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: AOAC, 1990. v. 2

ATHIÉ, I.; CASTRO, M. F. P. M. de; GOMES, R. A. R.; VALENTINI, S. R. T. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação Cargill, 1998. 236p. Cap.: Alterações nos grãos durante a estocagem.

BADIALE-FURLONG, E. **Tricotecenos em Trigo: um Estudo de Metodologia Analítica, Incidência, Contaminação Simultânea por outras Micotoxinas e de alguns Fatores que Influem na Produção no Campo**. 136f. Tese (Doutorado Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

BALDISSERA, M.A.; AHAMAD, H.E.; PRANKE, P.H.L.; HEINRICHS, C.M.; ZANANDREA, S.E.; SANTURIO, J.M. Incidência de aflatoxinas em amendoins e farinha de milho. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, VII, 1992, São Paulo. **Anais...**São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1992. p. 14.

BALDISSERA, M.A.; SANTURIO, J.M.; CANTO, S.H.; PRANKE, P.H.; ALMEIDA, C.A.A.; SCHIMIDT, C. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil – Parte II. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 53, n. 1/2, p. 5-10, 1993.

BALDISSERA, M.A.; SANTURIO, J.M.; MALLMANN, C.A.; ALMEIDA, C.A.A. KIPPER, M.; SOUZA, C.E.JR; SANTOS, X.C.; CAMARGO, B.S. Aflatoxinas zearalenona e ocratoxina A em alimentos: resultados de 1987 a 1993. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, VIII, 1994, Rio de Janeiro. **Anais do I Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia**, Rio de Janeiro, 1994a. p. 90.

BALDISSERA, M.A.; SANTURIO, J.M.; ALMEIDA, C.A.A.; KIPPER, M.; SOUZA, C.E.JR; HASS, L. Prevalência de zearalenona e deoxinivalenol em milho colhido na região sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, VIII, 1994, Rio de Janeiro. **Anais do I Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia**, Rio de Janeiro, 1994b. p. 92.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2326-2329, 2002.

BHAT, R.V.; MILLER, J.D. Mycotoxins and food supply. **Food, Nutrition and Agriculture (FAO)**. - **Food for the Future**, Roma: FAO, 1991. p. 27-31.

BILHALVA, A.B. **Preservação do Farelo de Arroz e Rendimento de Engenho em Cultivares de Arroz (*Oryza sativa L.*) irrigado**. Tese (Professor Titular) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1979. 43p.

BLANEY, B.J.; RAMSEY, M.D.; TYLER, A.L. Mycotoxins and toxigenic fungi in insect damaged maize harvested during 1983 in Far North Queensland. **Australian Journal of Scientific Research**, Collingwood, v. 35, p. 463-471, 1986.

BOTTALICO, A.; VISCONTI, A.; LERARIO, P. Effect of temperature on zearalenone production by isolates of *Fusarium* from cereals, in Italy. **Phytopathology Mediterranea**, Firenze, v. 21, p. 78-82, 1982.

BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, Washington, v. 42, n. 1, p. 65-86, 1979.

CALVETTE, K.L.A; MOECKE, E.H.S.; AMANTE, E.R. Análise de micotoxinas e microscopia de arroz integral, farinha de centeio e farelo de trigo em estabelecimentos de Florianópolis – SC. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 40-40, 1993.

CPETEC – CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS: Endereço oficial que traz informações sobre clima, tempo, satélites, observações climáticas, entre outros assuntos correlacionados. Disponível em <<http://www.cptec.inpe.br>>. Acesso em 24 de junho de 2003.

CHEEKE, P.R. Mycotoxins in cereal grains and supplemets. In: CHEEKE, P.R. **Natural Toxicants in Feeds, Forages and Poisonous Plants**, Danville: Interstate Publishers Inc., 1998. p. 87-136.

CHIPLEY, J. R.; URAIH, N. Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 352-357, 1980.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Deterioration of stored grains by fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 3, p. 69-84, 1965.

COLE, R.J. **Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins**. Orlando: Academic Press Inc., 1986.

DIENER, U.L. *et al.* Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 249-270, 1987.

DIEKMAN, M.A.; GREEN, M.I. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 1615-1627, 1992.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 155-166, 1997.

DOMINGOS, P. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 603p.

ELLIS, W.O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K.; KHANIZADEH, S.; OLDHAM, J.H. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 9-21, 1993.

FARONI, L.R.A. **Fatores que Influenciam a Qualidade dos Grãos Armazenados**. Viçosa: CENTREINAR, 1987. 30p.

FARONI, L.R.A.; SILVA, J.S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: SILVA, J.S.; AFONSO, A. D. L.; LACERDA FILHO, A. F. **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 1 CD-ROM.

FARRAR, J. J.; DAVIS, R. M. Relationships among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. **Phytopathology**, Washington, v. 81, p. 661-666, 1991.

FILALI, A.; OUAMMI, L.; BETBEDER, A.M.; BAUDRIMONT, I.; SOULAYMANI, R.; BENAYADA, A.; CREPPY, E.E. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 18, n. 6, p. 565-568, 2001.

FONSECA, H.; SOAVE, J.; AZZINI, L.E.; BANZATTO, N.A.; CAMARGO, O.B.A. **Arroz: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**, São Paulo: Coordenadoria da Indústria e Comércio, 1983. v. 2, p. 37-72.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Micotoxin production by food-born fungi. In: SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food-born Fungi**. Baarn: Lubrecht & Cramer Ltd, 1995. p. 251-260.

FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, n.1/2, p. 1-6, 1999.

GOLDBLATT, L.A.; WINNER, B.A. Mycotoxin past, present and future. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 54, p. 302, 1977.

GOLINSKI, P.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. **Journal of the**

Association of Official Analytical Chemists, Arlington: v. 67, n. 6, p. 1108-1110, 1984.

HAMILTON, R.J. The chemistry of rancidity in foods. In: ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in Foods**. Londres: Applied Science Publishers, 1983. p. 12-13

FONSECA, H. Contém informações na área de micotoxinas sobre legislação, publicações, materiais de laboratório, entre outros. Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em 5 de junho de 2003.

HOSENEY, R. C. **Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991. 321p. Cap. 5: Almacenamiento de los cereales.

HUNT, D.C.; MCCONNIE, B.R.; CROSBY, N.T. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatization and high performance liquid chromatography. **Analyst**, Londres, v. 105, p. 89-90, 1980.

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

IARC – International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**. Lyon: OMS, 1987. Suplemento 7, p. 83-87.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins**. Lyon: OMS, 1993. Monografia 56.

ICMSF – International Commission On Microbiological Specifications For Foods, **Microorganisms in Foods**, Londres: Academic Press, 1996. p. 347-381.

KLICH, M.A; PITT, J.I. **A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs**, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, 1988. 116p.

LACAZ, C.S. **Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 695

LAZZARI, F.A. Contaminação fúngica de sementes, grãos e rações. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1993, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993a. p. 59-69.

LAZZARI, F.A. A redução da qualidade pela atividade fúngica. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1993, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993b. p. 70-78.

LAZZARI, F.A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações.** Curitiba: FEPAGRO, 1997. 148p.

LEONI, L.A.B.; SOARES, L.M.V.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 17, n. 10, p. 867-870, 2000.

LIMA, C.A.P.; ORSI, R.B.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 37-39.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A coconut-ágar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, Washington, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LUCHESE, R.H.; HARRIGAN, W.F. Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 74, p. 5-14, 1993.

L'VOVA, L.S.; ORLOVA, N.I.; OMEL'CHENKO, V.D. *Penicillium* - species fungi - producers of ochratoxin A in grain. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, Moscou, v. 28, n. 6, p. 889-893, 1992.

MALLMANN, A.C.; SARTURIO, M.J.; WENTZ, I. Aflatoxinas – Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n.3, p. 635-643, 1994.

MANNON, J; JOHNSON, E. Fungi down on the farm. **New Scientist**, London: Ipc Magazines, v. 28, p. 12-16, 1985.

MARASAS, W.F.O. Toxigenic Fusaria. In: SMITH, J.E.; ANDERSON, R.A. **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 119-139.

MILANEZ, T.; LEITÃO, M.F.F. Atividade de água na produção de ocratoxina A por *Aspergillus alutaceus* Bert & Curt em feijão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 238-246, 1994.

MILLER, J.D. **Mycotoxins**. In: WORKSHOP ON MYCOTOXINS IN FOOD IN AFRICA, 1995, Cotonou. **Anais...** Croydon: Cardwell K.F. Ed., 1996. Section II.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Comissão Técnica de Normas e Padrões. **Regras para análises de sementes**, Brasília, p. 365, 1992.

MIROCHA, C.J.; SCHAUERHAMER, B.; PATHRE, S.V. Isolation, detection and quantification of zearalenone in maize and barley. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.57, p. 1104-1110, 1974.

MONTEIRO, P.V.; RAO, K.S.; PRAKASH, V. *In Vitro* interection of groundnut proteins with aflatoxin B₁. **Journal of Food Science and Technology**, Londres, v. 33, n. 1, p. 27-31, 1996.

NESS, A. R. R. **Qualidade do Arroz em Casca Seco e Armazenado em Silos Metálicos com Aeração Controlada**. 1998. 110f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 1998.

NETO, V.R.L. Aflatoxinas e câncer hepático. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 33, n. 8, p. 1052S-1053S, 1981.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. p. 245-246.

NUNES, I.L. **Micotoxinas, micoflora e seu potencial toxigênico em arroz destinado ao consumo humano**. 2001. 95f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2001.

ONJI, Y.; AOKI, Y.; TANI, N. UMEBAYASHI, K.; KITADA, Y. DOHI, Y. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, p. 59-65, 1998.

OSBORNE, B.G. Mycotoxins and the cereals industry – a review. **Journal of Food Techonology**, Oxford, v. 17, p. 1-9, 1982.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. **Food Additive and Contaminants**, Londres, v. 18, n. 5, p. 431-435, 2001.

PARK, D.L.; NJAPAU, H. Contamination issues and padding. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaing, v. 66, p. 1402-1405, 1989.

PASTER, N.; BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 257-265, 1988.

PEESKE, S.T.; NEDEL, J,L,; BARROS, A.C.S.A. **Produção de Arroz Irrigado**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária - Universidade Federal de Pelotas, 1998. Cap.: Armazenamento de sementes de arroz.

PEREIRA, M.L.; CHANG, Y.K. Contaminantes do trigo e farinha e medidas de sanitização na indústria de moagem e panificação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 26, p. 20-29, 1993.

PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; PALLARONI, L.; PIVA, G. Occurrence of ochratoxin A in italian wines. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 18, n. 7, p. 647-654, 2001.

PINHO, B.H.S. **Ocorrência de micotoxinas, mofos e leveduras e propriedades físico-químicas das massas de pizza comercializadas nas cidades de Rio Grande e Pelotas – RS**. 1998. 63f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 1998.

PITT, J.I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 266-269, 1987.

PITT, J.I. **A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, 1988. 187p.

PITT, J.I. Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Protection**, Washington, v. 56, n. 265-269, 1993.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, Leeds, v. 38, suplemento 1, p. 17-22, 2000.

PITT, J.I. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Nova Iorque, v. 504, p. 29-41, 2002.

PITT, J.I.; CHRISTIAN, J.H.B. Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. **Applied Microbiology**, Washington, v.16, p. 1853-1858, 1968.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Londres: Academic Press, 1997. 593p. Cap.: *Aspergillus* and related teleomorphs, Cap.: *Penicillium* and related genera.

PORTO, A.G. **Avaliação da qualidade de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) secas e armazenadas em silos metálicos**. 2001. 128f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2001.

POZZI, C.A.; CORRÊA, B.; GAMBALI, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O.; MEIRELLES, C.A. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

PRADO, G.; LEITE, E.M.A.; VIEIRA, M.B.C.M.; DE OLIVEIRA, M.S. Influência de metais na produção de aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 294-297, 1995.

PRELUSKY, D.B.; ROTTER, B.A.; ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. **Mycotoxins in Grain: Compounds Other Than Aflatoxin**. St. Paul: Eagan Press, 1994. p. 359-403.

PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 58, n. 1, p. 163-164, 1975.

FANG, W.; FON, D.S. **Psychart**. Taipei: National Taiwan University, 1995. Cartas psicrométricas eletrônicas..

RAYBAUDI, R.; MARTÍNEZ, A.; VELÁSQUEZ, I.; ESCOBAR, E.; ALVARADO, R. Incidence of aflatoxin in corn as related to levels of *Aspergillus flavus/parasiticus* and moisture content. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, X, 2000, Guarujá.

Official Program and Abstract Book, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2000.
p. 187.

SABINO, M.; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A.; MILANEZ, T.V.; NAVAS, S.A.; ZORZETTO, M.A.P. A survey of the occurrence of aflatoxins in groundnuts (peanuts) and groundnut products in São Paulo state / Brazil in 1994. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 53-57, 1999.

SCHOLLENBERGER, M.; TERRY JARA, H.; SUCHY, S.; DROCHNER, W.; MULLER, H. –M. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. **Internatonal Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p. 85-89, 2002.

SCOTT, P.M. Gas chromatography of mycotoxins. In: BETINA, V. **Chromatography of Mycotoxins: Techniques and Applications**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993. p. 373-425.

SCUDAMORE, K.A.; NAWAZ, S., HETMANSKI, M.T.; RAINBIRD, S.C. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: III. Determination of mycotoxins in rice bran. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 15, n. 2, p. 185-194, 1998.

SCUSSEL, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenamento de Grãos**. Florianópolis: Editora do Autor, 2000. 382p.

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

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradação e Modificação**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.

SHARMA, M.; MÁRQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 93, p. 109-114, 2001.

SILVA, J.S.; AFONSO, A. D. L.; LACERDA FILHO, A. F. Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas. In: **Pré-processamento de produtos agrícolas**. Juiz de Fora: Instituto Maia, 1995. 509p.

SILVA, J.S.; AFONSO, A. D. L.; DONZELLES, S. M. L. Secagem e Secadores. In: SILVA, J.S.; AFONSO, A. D. L.; LACERDA FILHO, A. F. **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000a. 1 CD-ROM.

SILVA, J.S.; CAMPOS, M.G.; SILVEIRA, S.F.R. Armazenagem e comercialização de grãos no Brasil. In: SILVA, J.S.; AFONSO, A. D. L.; LACERDA FILHO, A. F. **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000b. 1 CD-ROM.

SILVA, J.S.; BERBERT, P.A.; AFONSO, A.D.L.; RUFATO, S. Qualidade dos grãos. In: SILVA, J.S.; AFONSO, A. D. L.; LACERDA FILHO, A. F. **Secagem e Armazenagem de Produtos Agrícolas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000c. 1 CD-ROM.

SINHA, R.N.; ABRAMSON, D.; MILLS, J.T. Interrelation among ecological variables in stored cereals and associations with mycotoxin production in the climatic zones of western Canada. **Journal Food Protection**, Washington, v. 49, n. 8, p. 608-614, 1986.

SKRINJAR, M.; DANEV, M.; DIMICACUTE, G. Interactive effects of propionic acid and temperature on growth and ochratoxin A production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 40, n. 3, p. 253-256, 1995.

SOARES, L.M.V **Micotoxinas: um Método para Análise Simultânea e Incidência em Alimentos Comercializados na Região de Campinas, São Paulo**. 140f. Tese (Doutorado Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SOWBHAGYA, C.M.; BHATTACHARYA, K.R. Lipid autoxidation in rice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 41, p. 1018-1023, 1976.

SATSOFT. **Statistica**, Tulsa: SatSoft Inc., 1998. Versão 5.1.

STOLOFF, L.; VANEGMOND, H.P.; PARK, D.L. Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 1, n. 8, p. 213-222, 1991.

STROKA, J.; ANKLAM, E. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and de detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p.90-95, 2002.

SYLOS, C.M. Vantagens e limitações na análise se micotoxinas por HPLC. In: MERCADANTE, A. *et al.* **Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, 2001. 272p.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 141-158, 1998.

TONON, S.A.; MARUCCI, R.S.; JERKE, G.; GARCÍA, A. Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern

Paraguay. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, p. 231-235, 1997.

VAN EGMOND, H.P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A, 1996. In: FURLANI, R.P.Z.; SOARES, L.M.V. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, n. 1/2, p. 1-6, 1999.

VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do Arroz no Brasil**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 633p. Cap.: Sistemas de Cultivo; Cap.: Armazenamento.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 888, p. 321-326, 2000.

WHEELER, K. A.; HURDMAN, B.F.; PITT, J. I. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 141-150, 1991.

ZHEN-ZHEN, J.I.A. A review of the study on fungi and mycotoxins in foodstuffs in Beijing during the last ten years. In: NATORI, S.; HASHIMOTO, K.; UENO, Y. **Mycotoxins and Phycotoxins**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989. p. 135-143.