

QUALIDADE SANITÁRIA DO MILHO ARMAZENADO EM
PROPRIEDADES FAMILIARES SITUADAS NA REGIÃO CENTRAL
DE MINAS GERAIS

RENATA REGINA PEREIRA DA CONCEIÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JUNHO – 2015

QUALIDADE SANITÁRIA DO MILHO ARMAZENADO EM
PROPRIEDADES FAMILIARES SITUADAS NA REGIÃO CENTRAL
DE MINAS GERAIS

RENATA REGINA PEREIRA DA CONCEIÇÃO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Pedro Amorim Berbert.
Coorientadora: Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JUNHO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 182/2015

Conceição, Renata Regina Pereira da

Qualidade sanitária do milho armazenado em propriedades familiares situadas na Região Central de Minas Gerais / Renata Regina Pereira da Conceição. – 2015.

90 f. : il.

Orientador: Pedro Amorim Berbert

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 70 – 86.

1. *Zea mays* L. 2. Insetos praga 3. Fungos 4. Grãos ardidos 5. Micotoxinas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD–
633.1521

QUALIDADE SANITÁRIA DO MILHO ARMAZENADO EM
PROPRIEDADES FAMILIARES SITUADAS NA REGIÃO CENTRAL
DE MINAS GERAIS

RENATA REGINA PEREIRA DA CONCEIÇÃO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 29 de junho de 2015

Comissão Examinadora:

Dr^a. Valéria Aparecida Vieira Queiroz (D.Sc., Produção Vegetal) – Embrapa Milho e Sorgo (Coorientadora)

Dr. Raphael Cardoso Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – Centro Universitário São Camilo

Dr^a. Marília Amorim Berbert de Molina (D.Sc., Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – UENF

Professor Pedro Amorim Berbert (Ph.D., Engenharia Agrícola) – UENF (Orientador)

Dedico

Aos meus amados pais, Maria Tereza e Dionísio, e a minha irmã Monique, por todo apoio e amor, e por serem minha fonte de inspiração diária.

E aos meus avós, Ildeu (*in memoriam*) e Ana, por serem meu exemplo de vida.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante presença em minha vida, me guiando e dando força nos momentos difíceis;

Aos meus pais, dos quais me orgulho e admiro muito, pelo amor incondicional, apoio e educação, e por serem sempre presentes;

Aos meus queridos Monique e Leandro, pelo carinho, incentivo e compreensão, sempre;

Aos meus avós, por serem exemplo de força e perseverança;

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Engenharia Agrícola, pela oportunidade de realização deste curso;

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de estudo;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo financiamento do projeto;

Ao Professor Pedro Amorim Berbert, pela orientação, confiança, oportunidade, paciência e por ter proporcionado a concretização deste trabalho;

À Dr^a. Valéria Aparecida Vieira Queiroz, meu grande exemplo como profissional, agradeço pela coorientação, amizade, apoio e dedicação de sempre, por todos os seus ensinamentos, por acreditar no meu potencial, e por contribuir com meu crescimento pessoal e profissional. Serei sempre grata!

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Milho e Sorgo, pela oportunidade da realização do projeto;

A banca examinadora, pelas correções e valiosas sugestões;

Aos amigos do Laboratório de Micotoxinas, pelo companheirismo, colaboração nos trabalhos e momentos vividos, em especial o técnico de laboratório e amigo Rafael, pela amizade e auxílio nas análises;

Aos amigos do curso de mestrado: Thaís, Thaísa, João Paulo, Letícia, Camilla, Graziella e Victor, pela amizade, paciência, ajuda nos tempos difíceis e por proporcionarem ótimos momentos;

Aos companheiros do Laboratório de Engenharia Agrícola;

Às amigas do Apartamento 303: Rafaela, Yaska e Natália, por me receberem com tanto carinho, pelo ótimo convívio e pelas palavras de apoio, em especial a Rafaela, por ser sempre presente e dividir comigo das mesmas dificuldades e obstáculos, com a esperança que no fim tudo dá certo!

A toda minha família, minha base e alegria;

Aos meus amigos: Camila, Priscíula, Letícia, Kênia e Júlio, pela amizade que ultrapassa as barreiras geográficas e o tempo, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo incentivo e auxílio quando precisei. Vocês são a melhor parte de mim!

Ao Laboratório de Fitopatologia, em especial o Técnico Osni, pela colaboração nas análises;

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pelo auxílio prestado;

A todos que, de alguma forma, contribuíram e foram importantes na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A cultura do milho	4
2.2 Infestação por insetos praga durante o armazenamento.....	7
2.3 Fungos em grãos de milho	10
2.3.1 <i>Fusarium</i> spp.	11
2.3.2 <i>Aspergillus</i> spp.	12
2.3.3 <i>Penicillium</i> spp.....	13
2.3.4 <i>Stenocarpella</i> spp.....	14
2.4 Grãos ardidos.....	16
2.5 Micotoxinas em grãos de milho.....	18
2.5.1 Aflatoxinas	20
2.5.2 Zearalenona	23
2.5.3 Fumonisinias	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Coleta das amostras	28
3.2 Avaliação da incidência de insetos praga e índices de perda.....	31

3.3 Avaliação da sanidade dos grãos de milho	32
3.3.1 Massa de 1000 grãos	32
3.3.2 Incidência de grãos ardidos	33
3.3.3 Identificação de fungos	33
3.4 Determinação de micotoxinas em grãos de milho armazenados (aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona).....	34
3.4.1 Detecção e quantificação de aflatoxinas.....	35
3.4.2 Detecção e quantificação de fumonisinas.....	36
3.4.3 Detecção e quantificação de zearalenona	37
3.5 Delineamento estatístico.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Dados pluviométricos.....	39
4.2 Avaliação da incidência de insetos praga e índices de perda	41
4.2.1 Incidência de insetos praga.....	41
4.2.2 Índices de perda de massa específica aparente.....	45
4.2.3 Massa de 1000 grãos.....	48
4.3 Avaliação da sanidade dos grãos de milho	50
4.3.1 Incidência de grãos ardidos	50
4.3.2 Identificação de fungos	53
4.4 Análises de Micotoxinas	57
4.4.1 Aflatoxinas totais	57
4.4.2 Fumonisinas totais	62
4.4.3 Zearalenona	66
5. RESUMO E CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICE	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparativo de produção – Milho primeira safra	5
Tabela 2: Demanda do consumo de milho – 2013/2014 (x1000 toneladas).....	6
Tabela 3: Limites máximos de tolerância para infestação por insetos praga.....	9
Tabela 4: Limites máximos de tolerância para grãos avariados e ardidos.....	17
Tabela 5: Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas no Brasil ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	20
Tabela 6: Principais efeitos causados pela ingestão de aflatoxinas em alguns animais.....	23
Tabela 7: Propriedade, local e data de realização das coletas.....	30
Tabela 8: Médias mensais dos dados pluviométricos dos municípios situados na Região Central de Minas Gerais em que foram coletadas as amostras de grãos de milho armazenados em paióis de produtores familiares (mm).....	40
Tabela 9: Número de grãos ardidos (% N.G.A) e massa dos grãos ardidos (% M.G.A) em amostras de milho coletadas em paióis de produtores familiares no período de junho/2013 a janeiro/2014.....	51
Tabela 10: Número de grãos ardidos (% N.G.A) e massa dos grãos ardidos (% M.G.A) em amostras de milho coletadas em paióis de produtores familiares no período de julho a novembro/2014	51

Tabela 11: Frequência da incidência de grãos ardidos contendo fungos patogênicos em grãos de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de junho/2013 a janeiro/2014.....	53
Tabela 12: Frequência da incidência de grãos ardidos contendo fungos patogênicos em grãos de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de julho a novembro/2014.....	53
Tabela 13: Frequência da incidência de fungos patogênicos em grãos sadios de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de junho/2013 a janeiro/2014.....	55
Tabela 14: Frequência da incidência de fungos patogênicos em grãos sadios de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de julho a novembro/2014.....	55
Tabela 15: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de aflatoxinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre junho/2013 e janeiro/2014.....	57
Tabela 16: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de aflatoxinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre julho e novembro/2014.....	58
Tabela 17: Aflatoxinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em paióis de propriedades familiares da região Central de Minas Gerais (junho/13 a janeiro/14).....	59
Tabela 18: Aflatoxinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em paióis de propriedades familiares da região Central de Minas Gerais (julho a novembro/14).....	59
Tabela 19: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de fumonisinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre junho/2013 e janeiro/2014.....	62
Tabela 20: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de fumonisinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre julho e novembro/2014.....	62

Tabela 21: Fumonisinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em propriedades familiares da região central de Minas Gerais (junho/13 a janeiro/14).....	63
Tabela 22: Determinação de fumonisinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em propriedades familiares (julho a novembro/14).....	63
Tabela 1A – Informações sobre plantio, colheita e práticas agrícolas na produção de milho em 11 propriedades que praticam agricultura familiar na Região Central de Minas Gerais.....	88
Tabela 2A – Informações sobre estruturas e práticas de armazenamento de milho em 11 propriedades que praticam agricultura familiar na Região Central de Minas Gerais.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Adulto,larva e pupa de <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky.....	8
Figura 2 - <i>Fusarium verticillioides</i> em microscopia eletrônica.....	12
Figura 3 - Conidióforo de <i>Aspergillus</i> 2.3 Grãos ardidos	13
Figura 4 – Estruturas de <i>Penicillium</i>	14
Figura 5 – Conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Stenocarpella macrospora</i>	15
Figura 6 – Grãos ardidos pelo ataque de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Fusarium verticillioides</i>	16
Figura 7 – Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	21
Figura 8 – Estrutura química da zearalenona.....	23
Figura 9 – Estrutura química das fumonisinas B1, B2, B3.....	26
Figura 10 – Mapa da Região Central de Minas Gerais.....	29
Figura 11 – Ilustrações do processo de coleta das amostras.....	31
Figura 12 – Imersão de grãos de milho em água para avaliar o percentual de infestação.....	32
Figura 13 – Grãos considerados ardidos.....	33
Figura 14 – Ilustrações do processo de identificação de fungos.....	34
Figura 15 – Ilustrações do processo de análise e detecção de fumonisinas e aflatoxinas.....	37
Figura 16 – Infestação por insetos praga em grãos de milho coletados em seis propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre junho de 2013 e janeiro 2014.....	42

Figura 17 - Infestação por insetos praga em grãos de milho coletados em sete propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre os meses de julho e novembro de 2014.....	42
Figura 18 – Teor de água (% b.u.) das amostras de grãos de milho armazenados em propriedades familiares entre junho de 2013 e janeiro 2014.....	44
Figura 19 - Teor de água (% b.u.) das amostras de grãos de milho armazenados em propriedades familiares entre julho e novembro de 2014.....	45
Figura 20 – Massa específica aparente do milho armazenado em seis propriedades familiares entre junho de 2013 e janeiro de 2014.....	46
Figura 21 – Redução (%) da massa específica aparente de grãos de milho durante o armazenamento entre junho de 2013 e janeiro de 2014.....	46
Figura 22 - Massa específica aparente do milho armazenado em sete propriedades familiares entre julho e novembro de 2014.....	47
Figura 23 - Redução (%) da massa específica aparente de grãos de milho durante o armazenamento entre julho e novembro de 2014.....	47
Figura 24 – Massa de 1000 grãos (g) de milho armazenados em paióis de produtores familiares durante o período de junho de 2013 a janeiro de 2014.....	49
Figura 25 - Massa de 1000 grãos (g) de milho armazenados em paióis de produtores familiares durante o período de julho a novembro de 2014.....	49
Figura 1A – Laudo da análise de Zearalenona em milho armazenado em paióis de propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais..	90

RESUMO

CONCEIÇÃO, Renata Regina Pereira da, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Junho de 2015. Qualidade sanitária do milho armazenado em propriedades familiares situadas na Região Central de Minas Gerais. Orientador: Prof. Pedro Amorim Berbert. Coorientadora: Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade sanitária do milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais. Foi analisada a incidência de insetos praga, de grãos ardidos e de micotoxinas, identificada a prevalência de fungos e avaliado o índice de perdas em milho armazenado. Entre os meses de junho de 2013 e janeiro de 2014 e de julho a novembro de 2014 foram coletadas amostras em 11 propriedades familiares dos municípios de Esmeraldas, Fortuna de Minas, Funilândia, Inhaúma e Sete Lagoas. As coletas aconteceram em quatro períodos com intervalos de dois meses. Para a avaliação de insetos praga, foram utilizados 200 grãos da amostra e o teste de patologia dos grãos foi realizado empregando-se o método do papel de filtro com congelamento. Para detecção de fumonisinas e aflatoxinas seguiu-se o método por purificação em colunas de imunoafinidades FumoniTest® e AflaTest®, e os teores foram determinados em fluorímetro. Para zearalenona foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência associado a espectrômetro de massas. Os teores de fumonisinas e de aflatoxinas foram avaliados por análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey em 5% de probabilidade. Para as demais avaliações foram utilizadas análises

descritivas. Durante o período de armazenamento, o teor de água das amostras manteve-se entre 8,0% e 11,8%. A maioria das amostras apresentou níveis de infestação por insetos praga acima do limite máximo de 8% tolerado para comercialização, com níveis entre 0,3 e 52,5%, ao longo do armazenamento. Houve redução na massa específica aparente ao longo dos períodos de armazenamento, com índices de 2,7% a 16,2%. A massa de 1000 grãos também apresentou redução, com valores variando até 9,4% e 13,0%, no primeiro e segundo ano, respectivamente. As amostras apresentaram baixa incidência de grãos ardidos com níveis entre 0,03% e 0,75% e entre 0,02% e 0,14%, no primeiro e no segundo ano da pesquisa, respectivamente, portanto, abaixo do limite de 5%. Verificou-se prevalência do fungo do gênero *Fusarium*, que apresentou até 100% de ocorrência. Foram encontradas aflatoxinas em 88,64% das 44 amostras, com níveis entre 2,5 e 77,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que em apenas duas delas os níveis encontravam-se acima do limite máximo estabelecido de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação com fumonisinas, com variação entre 31 e 4.650 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que, 43,18% das amostras encontravam-se acima do limite de 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ estabelecido pela União Europeia para consumo humano, porém, nenhuma das amostras estava acima do limite máximo estabelecido pela ANVISA, de 5.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para milho não processado. Foram encontrados apenas traços de contaminação com zearalenona nas amostras analisadas. Os resultados obtidos mostraram elevada incidência de insetos praga e de fungos nas amostras de milho armazenado em paióis de produtores familiares. No caso das micotoxinas, embora a maioria das amostras tenha apresentado teores abaixo do limite máximo tolerado, foi observada elevada incidência. Assim, sugere-se a adoção de boas práticas agrícolas e armazenamento adequado, para que haja controle de infestação e redução de contaminação dos grãos, visando boa qualidade sanitária do milho.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, Renata Regina Pereira da, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. June, 2015. Title: Sanitary quality of corn stored in family farms located at the Central Region of Minas Gerais State, Brazil. Advisor: Prof. Pedro Amorim Berbert. Coadvisor: Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

The main objective of this study was to evaluate the sanitary quality of corn stored in family farms of the Central Region of Minas Gerais State, Brazil. It was analyzed the incidence of insect pests, injured grain and mycotoxins, identified the prevalence of fungi and evaluated the rate of losses in stored corn. Data collection was performed from June 2013 to January 2014 and from July to November 2014 in eleven family farms located in the following towns: Esmeraldas, Fortuna de Minas, Funilândia, Inhaúma and Sete Lagoas. Corn samples were collected in four occasions every two months. Two hundred kernels from each corn sample were used to evaluate insect infestation and the pathology test was carried out employing the method of freezing filter paper. Fumonisin and aflatoxins were detected through the FumoniTest® and AflaTest® immunoaffinity columns, respectively, and the levels were determined in fluorimeter. High-Performance Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry was used to detect zearalenone. Fumonisin and aflatoxin levels were evaluated by analysis of variance and the means were compared by Tukey's test at 5% probability. All remaining variables were analyzed through descriptive statistics. The moisture content of the samples varied from 8.0% and 11.8% w.b. during the storage

periods. Most samples showed levels of insect infestation above the 8% maximum limit tolerated for corn commercialization, with values ranging from 0.3% to 52.5% along storage time. There were reductions in bulk density over the storage periods, varying from 2.7% to 16.2%. The mass of 1000 grains also decreased, with values ranging up to 9.4% and 13.0% in the first and second storage periods, respectively. Corn samples showed low incidence of injured grains, with levels ranging from 0.03% to 0.75% and from 0.02% to 0.14%, in the first and second storage periods, respectively, therefore below the maximum allowed limit of 5%. *Fusarium* occurrence prevailed over other fungus genera with up to 100% incidence. Aflatoxins were found in 88.64% of the 44 samples with levels in the range from 2.5 to 7.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and only two samples were contaminated with levels above the maximum tolerable limit of 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. All corn samples were contaminated with fumonisin, with levels ranging from 31 to 4650 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Results showed that 43.18% of the samples were contaminated with levels above the 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ limit set by the European Union for human consumption. However, none of the samples was above the maximum limit established by the Brazilian Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA) of 5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for unprocessed corn. Only traces of zearalenone were found in the samples analyzed. The overall results showed a high incidence of insect pests and fungi contamination in corn stored in cribs in the family farms investigated. Irrespective of these results, mycotoxin contamination levels were below the maximum tolerated limits. Therefore, good agricultural practices and proper storage must be adopted to control grain insect infestation and reduce fungus contamination in order to produce corn with sanitary and intrinsic quality characteristics.

1. INTRODUÇÃO

Cultivado em diversas regiões do mundo, o milho é um cereal que se destaca pela importância significativa nas alimentações humana e animal, sendo essa última responsável por 70% do consumo deste cereal no mundo (Duarte et al., 2009; Cancellier et al., 2011). Além disso, a produção mundial de milho é superada apenas pela do trigo e do arroz (Silva et al., 2012). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, o que contribui expressivamente para o crescimento econômico do país (Kawashima e Soares, 2006).

Assim como ocorre com outros cereais, o milho é alvo de ataques de diversas pragas e fungos ao longo de sua cadeia produtiva. Condições inadequadas de plantio, colheita, transporte e armazenamento são alguns dos fatores que contribuem para contaminações que podem resultar na deterioração dos grãos, perda nutricional e produção de micotoxinas (Kawashima e Soares, 2006; Freitas et al., 2009; Almeida et al., 2009).

As micotoxinas são metabólitos secundários que podem causar sérios danos à saúde humana e animal, além de grandes perdas econômicas, pois tornam os grãos impróprios para o consumo (Hermanns et al., 2006). São produzidas, principalmente, pelos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Rocha, 2010). As espécies do gênero *Fusarium* são comumente encontradas antes ou após a colheita dos grãos, já as de *Aspergillus* e *Penicillium* são normalmente encontradas durante a secagem e o armazenamento (Hermanns et al., 2006). A presença de fungos em produtos agrícolas armazenados não implica

necessariamente na produção de micotoxinas. Por outro lado, a detecção de micotoxinas pode ocorrer mesmo sem a presença do fungo no alimento, pois as micotoxinas são altamente resistentes aos processamentos industriais (mecânicos e térmicos), e podem permanecer no alimento mesmo após a eliminação do fungo que as produziram (Oliveira e Koller, 2011; Kawashima, 2004).

As principais micotoxinas produzidas em alimentos são as aflatoxinas, a zearalenona, as fumonisinas, as ocratoxinas, a patulina e o desoxinivalenol (Maziero e Bersot, 2010). A sua ingestão pode causar efeitos agudos ou crônicos na saúde, os quais, dependendo da dosagem, podem ser teratogênicos, mutagênicos, carcinogênicos e imunossupressores (Hermanns et al., 2006; Maziero e Bersot, 2010; Kawashima, 2004).

No armazenamento de milho a granel ocorrem perdas tanto em silos quanto em graneleiros ou no milho armazenado em sacarias nos armazéns. Portanto, tecnologias adequadas de combate às pragas e de prevenção da ocorrência de fungos e micotoxinas nesses locais devem ser adotadas. Porém, no armazenamento de milho em espiga, utilizando paióis rústicos, geralmente empregados por pequenos e médios produtores, as perdas de massa por ataque de insetos e roedores podem atingir 15% do total produzido (Santos, 2008).

De acordo com o Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2009), foram identificados 4.367.902 estabelecimentos de agricultura familiar no Brasil, que representam 84,4% do total de 5.175.489 estabelecimentos, com ocupação de 24,3% da área agropecuária brasileira. A agricultura familiar foi responsável por 46% da produção nacional de milho, cabendo a Minas Gerais 47% deste total. O estado é responsável por 42% da produção de grãos.

Um trabalho realizado pela Embrapa Milho e Sorgo em parceria com a Emater – MG mostrou que das 48 propriedades familiares analisadas em Minas Gerais, 30 apresentaram condições inadequadas de armazenamento, demonstrando a fragilidade do sistema local de armazenamento de milho (Matrangolo, 2011).

No entanto, existem poucos estudos relacionados à qualidade do milho armazenado em paióis. Queiroz et al. (2011) analisaram 40 amostras coletadas durante oito meses em paióis localizados em propriedades que praticam agricultura familiar na região Central de Minas Gerais e concluíram que 82,5%

delas se encontravam contaminadas com fumonisinas acima dos níveis permitidos pela legislação da União Europeia para consumo humano ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Esses dados provocam preocupação, pois a maioria dos agricultores familiares do Estado de Minas Gerais cultiva milho tanto para consumo próprio, quanto para ração de animais. Dessa forma, há a exposição ao risco tanto pelo consumo direto de milho contaminado, quanto pelo indireto, pelo consumo de produtos derivados de animais que consumiram milho contaminado com essas toxinas.

As informações apresentadas evidenciam a importância da busca do conhecimento para se traçar um diagnóstico sobre a qualidade sanitária dos grãos de milho em propriedades familiares, em virtude da preocupação com a segurança alimentar e perdas econômicas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade sanitária do milho armazenado em propriedades familiares situadas na Região Central de Minas Gerais. Para tal, foram analisados a incidência de insetos praga, grãos ardidos e micotoxinas. Além disso, foram identificados os fungos que prevalecem e avaliou-se o índice de perdas em milho armazenado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família *Poaceae* (Gramineae) e é uma planta robusta, herbácea, monoica, que possui ciclo anual com, praticamente, 100% de reprodução cruzada (Gomes et al., 2011; Cruz, 2013). As partes constituintes do grão de milho são o pericarpo (camada externa, composta de fibra), embrião (composto pelo cotilédone, epicótilo e radícula) e endosperma. O endosperma corresponde a 75–80% do grão e seus principais constituintes são amido e proteínas (Gasperini, 2011; Cruz, 2013). O ciclo produtivo do milho compreende cinco etapas: germinação e emergência, crescimento vegetativo, florescimento, frutificação e maturidade (Cruz, 2013).

O cultivo do milho iniciou-se na América Central e foi difundido por povos pré-colombianos que o utilizavam como alimentação básica há 5.000 anos, havendo relatos de que em 900 a.C. o milho já era conhecido no Peru. No Brasil, o cultivo do milho vem de antes da chegada dos europeus no país, sendo que os povos indígenas guaranis foram os primeiros a cultivar esse cereal, que fazia parte de sua dieta. Com a chegada dos portugueses, houve aumento do consumo e da produção de derivados do milho, os quais foram sendo incorporados na dieta dos brasileiros (Gasperini, 2011).

O milho é amplamente cultivado em todo o mundo, sendo o Brasil o terceiro produtor mundial desse cereal, com produção de 82,0 milhões de

toneladas na safra 2014/2015, ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China, com 361,1 e 215,7 milhões de toneladas, respectivamente. (Duarte et al., 2009; FIESP, 2015).

No Brasil, o milho ocupa o segundo lugar no ranking dos cereais em termos de produção (Galon et al., 2010). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (2015), as estimativas da safra de 2013/2014 são de 15,8 milhões de hectares de área total cultivada, com produção de 80,1 milhões de toneladas e produtividade média de 5,0 toneladas/hectare. Para a safra de 2014/2015 as estimativas são de 15 milhões de hectares de área total cultivada, com produção de 79 milhões de toneladas e produtividade média de 5,2 toneladas/hectare.

Conforme descrito na Tabela 1, a Região Sudeste é a segunda maior produtora de milho no Brasil, ficando atrás somente da Região Sul. O estado de Minas Gerais se apresenta como o maior produtor da região Sudeste, tanto para a Safra 2013/2014 quanto para a Safra 2014/2015, com produção de 5,7 e 5,5 milhões de toneladas, respectivamente (Conab, 2015).

Tabela 1: Comparativo de produção – Milho primeira safra.

Região/UF	Produção (mil t)	
	Safra 13/14	Safra 14/15
Norte	1029,7	1072,6
Nordeste	4750,0	4800,9
Centro-Oeste	3184,9	2628,6
Sudeste	8060,9	8011,8
MG	5742,5	5525,0
ES	60,5	25,4
RJ	10,3	6,5
SP	2247,6	2454,9
Sul	14627,4	13781,9

Adaptação do 7º Levantamento de safra de grãos (Conab, 2015).

Nos últimos 28 anos o milho apresentou grande evolução como cultura comercial, com taxas de crescimento da produção de 3,0% ao ano e de área plantada de 0,4% ao ano (Gasparini, 2011).

O milho tem papel fundamental na alimentação humana e animal. É matéria-prima para fabricação de diversos outros produtos, inclusive nas indústrias de alta tecnologia, como as indústrias farmacêuticas, e na produção de papéis, adesivos, filmes e embalagens biodegradáveis (Paes, 2008; Cancellier et al., 2011). De acordo com Galon et al. (2010), aproximadamente 70% dos grãos produzidos no Brasil são destinados ao consumo animal. No entanto, conforme a Tabela 2, o milho apresenta baixa utilização na alimentação humana.

Tabela 2: Demanda do consumo de milho – 2013/2014 (x1000 toneladas).

Consumo animal	
Aves de corte	22.768
Aves de postura	3.789
Suinocultura	12.137
Bovinocultura	3.868
Outros animais	3.175
Consumo industrial	5.703
Consumo humano	
"In natura"	1.873

Fonte: Abimilho (2014).

O milho é uma cultura facilmente produzida em regiões quentes e também nas temperadas. Observa-se que grande parte dos agricultores familiares utiliza-o para consumo próprio e para a alimentação de criações de subsistência como suínos e aves. Entretanto, o clima tropical juntamente com técnicas inadequadas de manuseio propicia a contaminação por fungos (Kawashima e Soares, 2006).

Ao longo dos anos tem-se observado o avanço de doenças na cultura do milho no Brasil, como consequência das relações patógeno-hospedeiro-ambiente, comprometendo, assim, o seu rendimento, que pode ser influenciado também por fatores como fertilidade dos solos, disponibilidade hídrica, sistemas de cultivo, manejo de plantas daninhas e pragas (Juliatti et al., 2007; Silva et al., 2012). Alguns fatores como crescimento na produção e deslocamento da cultura para novas regiões podem contribuir para o aumento da incidência e para severidade das doenças (Juliatti et al., 2007). O milho pode sofrer ataque de fungos, tanto na

pré quanto na pós-colheita. Fatores como mau empalhamento das espigas, injúrias causadas por insetos, alta umidade e clima quente durante a fase de polinização favorecem a incidência de fungos e podem ocasionar redução na produtividade e na qualidade sanitária dos grãos (Duarte et al., 2009; Mendes et al., 2012).

2.2 Infestação por insetos praga durante o armazenamento

A qualidade sanitária dos grãos está relacionada, dentre outros fatores, às condições adequadas de armazenamento, que têm papel fundamental na redução de perdas (Antonello et al., 2009). Alguns fatores possuem grande influência no armazenamento, como temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio, microrganismos, insetos, roedores e pássaros, cuja interação pode acarretar em deterioração e em grandes perdas dos grãos (Santos, 2008).

Grande parte da produção de milho no Brasil, cerca de 80%, é armazenada em silos, que apresentam condições adequadas, com controle de insetos e de fungos. Todavia, pequenos produtores rurais adotam o armazenamento de milho em espigas em paióis, estruturas que podem facilitar o ataque de pragas, provocando perdas de massa e de valor nutritivo, desvalorização comercial, facilitando a disseminação de fungos toxigênicos (Queiroz et al., 2012; Coitinho et al., 2006).

Entre os principais danos que as pragas podem causar destacam-se, redução da massa e desvalorização comercial, perda do valor nutritivo dos grãos, perda do poder germinativo das sementes, deterioração dos grãos causando emboloramento e contaminação dos grãos por outros organismos (Castro, 2011).

De acordo com Lorini (2009) as pragas podem ser classificadas em dois grupos, as primárias e as secundárias. As primárias são aquelas que atacam os grãos inteiros e sadios e podem ser internas ou externas. As primárias internas perfuram os grãos e se desenvolvem no interior deles, já as externas destroem a parte externa do grão e se alimentam da parte interna, mas não se desenvolvem no interior dele. São exemplos das primárias internas as espécies *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* e *S. zeamais*, e das externas a espécie *Plodia interpunctella*. As pragas denominadas secundárias se caracterizam por não

conseguirem atacar o grão inteiro e, portanto, é necessário que o grão esteja danificado para que elas dele se alimentem. Essas pragas multiplicam-se rapidamente e causam grandes prejuízos. Como exemplo, citam-se as espécies *Cryptolestes ferrugineus*, *Oryzaephilus surinamensis* e *Tribolium castaneum*.

Os besouros e as traças são as principais pragas que atacam os grãos armazenados e, dentre elas, destacam-se *Sitophilus zeamais* e *S. oryzae*, como as pragas que causam os maiores danos aos grãos. São chamados de gorgulho dos cereais (Lorini, 2009).

Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) é a principal praga do milho. Quando adulto apresenta cor castanho-escuro com pintas avermelhadas nos élitros, tem a cabeça projetada à frente, na forma de rosto curvado (Figura 1). Os machos apresentam rostos curtos e grossos e as fêmeas longos e afilado, suas larvas são de coloração amarelo-clara e as pupas são brancas (Figura 1). Na fase adulta o tamanho pode variar de 2,5 a 3,0 mm de comprimento. Seu aparelho bucal é o mastigador-triturador, que consegue romper a casca do grão. O período de oviposição é de 104 dias e o número médio de postura por fêmea é de 282 (Cruz, 2013).

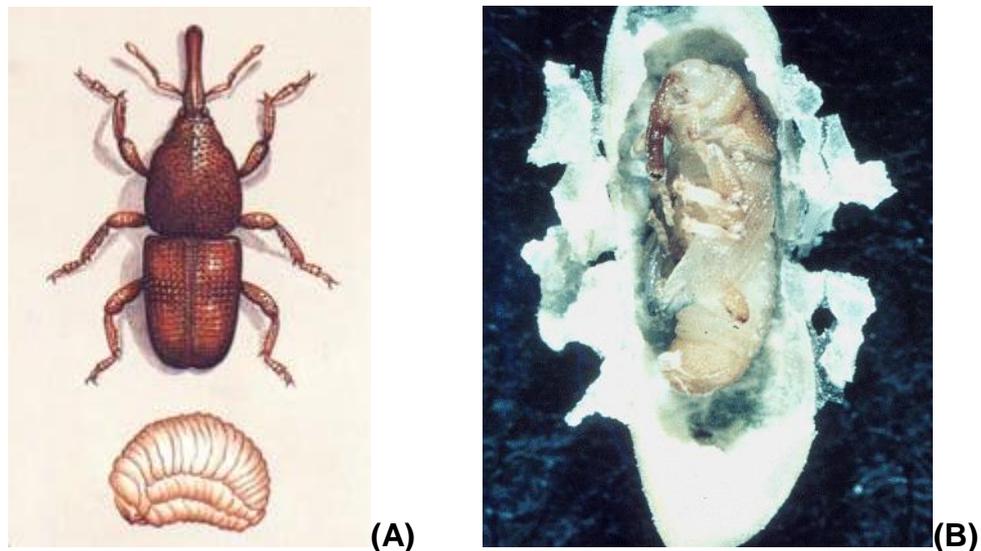


Figura 1 – Adulto e larva (A) e pupa (B) de *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Fonte: Santos, 2008; Antunes e Dionello, 2010.

Essa praga é considerada de grande importância, pois apresenta infestação cruzada, podendo infestar os grãos tanto no campo como no armazém (Cruz, 2013). O armazenamento do milho em espigas empalhadas é utilizado como método de controle da praga, pois, apresenta maior tolerância ao ataque de *S. zeamais* (Guimarães et al, 2010).

O valor comercial do grão está diretamente relacionado ao seu nível de contaminação por insetos, tanto para processamento quanto para consumo (Antunes et al., 2011). Conforme a Tabela 3, o milho pode ser classificado para comercialização de acordo com os níveis de infestação dos grãos.

Tabela 3: Limites máximos de tolerância para infestação por insetos praga.

Enquadramento	Infestação (%)
Tipo 1	2
Tipo 2	3
Tipo 3	4
Fora de tipo	8

Adaptação da Normativa nº 60 de 22 de dezembro de 2011 (Brasil, 2011).

De acordo com Santos (2008) algumas medidas preventivas contra a ocorrência de pragas devem ser adotadas, como a conscientização da importância da influência de fatores ecológicos, como temperatura, a umidade do grão e do ambiente, e o período de armazenamento. A escolha da cultivar, a técnica de colheita, a limpeza dos grãos, a aeração e refrigeração, e a secagem também são fatores a ser considerados.

Para Faroni e Silva (2000), além da prevenção, métodos de controle devem ser adotados. Esses métodos são classificados como legislativos, físicos, químicos e biológicos. O método de controle legislativo abrange a quarentena, que proíbe ou restringe o transporte de grãos infestados por insetos praga, e a sanidade, que inclui a higiene que deve ser adotada com a finalidade de diminuir ou eliminar os insetos. Os controles físicos referem-se à umidade e temperatura, aos pós inertes, à resistência dos grãos e à irradiação. O controle químico de insetos com inseticidas é o mais utilizado e econômico, porém, deve ser empregado juntamente com outras medidas de controle. O controle biológico

inclui os patógenos, parasitoides e predadores. Para os autores, há necessidade da integração desses métodos para o controle das pragas.

2.3 Fungos em grãos de milho

Os fungos são microrganismos que possuem ampla distribuição geográfica e são relevantes em diversas atividades econômicas como a produção de alimentos, fármacos, enzimas e ácidos orgânicos. Porém, alguns fungos são patogênicos para plantas e deterioradores de alimentos, podendo causar redução no valor nutritivo dos alimentos, produção de metabólitos secundários tóxicos e doenças em humanos e animais (Silva et al., 2015).

Dentre os principais danos causados em grãos armazenados em função do desenvolvimento de fungos podem-se citar a fermentação, alterações na coloração e aparecimento de manchas, alterações no odor e no sabor, alterações químicas, perdas de matéria seca, diminuição do poder germinativo e produção de micotoxinas (Ferrari Filho, 2011).

O milho é uma cultura suscetível ao ataque e desenvolvimento de fungos, entre eles aqueles que acometem o grão tanto antes quanto após a colheita, também chamados de fungos de campo e de armazenamento, respectivamente. Entretanto, a distinção entre esses grupos não se dá pela classificação taxonômica, mas sim pelas condições ambientais que favorecem o seu crescimento e desenvolvimento (Embrapa, 2006).

Entre os principais fungos presentes no campo e que são encontrados em colmos, sementes e folhas do milho estão *Stenocarpella maydes* (*Diplodia maydes*), *Stenocarpella macrospora* (*Diplodia macrospora*), *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Cephalosporium* spp, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolares maydes*, *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. e *Gibberella zeae* (Santin et al., 2004; Alves et al., 2012). As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais contaminantes do milho na secagem e no armazenamento (Hermanns et al., 2006). Alguns fungos são chamados de intermediários, pois se desenvolvem em grãos maduros ou imaturos, desde que o período esteja próximo do armazenamento ou da pós-colheita. Esse grupo

compreende os fungos dos gêneros *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Papularia* (Figueira et al., 2003).

Os fungos que mais se destacam por serem responsáveis pela deterioração dos grãos na pré-colheita e, posteriormente, durante o armazenamento, são *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Bento, 2012).

2.3.1 *Fusarium* spp.

Os fungos do gênero *Fusarium* pertencem à família Nectriaceae, ao filo Ascomycota, e foram descritos e classificados pela primeira vez em 1809 pelo micólogo alemão Link (Maciel, 2012).

Com ampla distribuição geográfica, o gênero *Fusarium* é um dos principais fungos que acometem o grão de milho e sua distribuição pode estar associada aos tipos de clima, à vegetação, à microbiota, ao tipo de solo e aos nutrientes. Esse gênero apresenta aproximadamente 775 espécies e subespécies, algumas ocorrem com maior frequência e outras são bem específicas a certos ambientes. Caracteriza-se por possuir crescimento rápido, colônias com colorações pálidas e coloridas e micélio aéreo e ramificado (Martins, 2005; Maciel, 2012; Milanese, 2012; Frias, 2014).

Os microconídios e os macroconídios são as duas principais formas de esporos de *Fusarium*. Os microconídios são comumente unicelulares, uninucleados e fusiformes, já os macroconídios mais comuns são multicelulares, mas cada célula apresenta somente um núcleo (Martins, 2005; Sandoval, 2010).

As espécies do gênero *Fusarium* podem ser associadas a diversos tipos de doenças em plantas, como podridão das raízes, caules e frutos (Menezes et al., 2010). As principais espécies patogênicas de *Fusarium* na cultura do milho são *F. verticillioides* e *F. graminearum*, que causam diversas doenças podendo levar a reduções na produtividade e na qualidade dos grãos (Kuhnem Júnior et al., 2013). Apresentam-se, na Figura 2, ilustrações de *Fusarium verticillioides*.

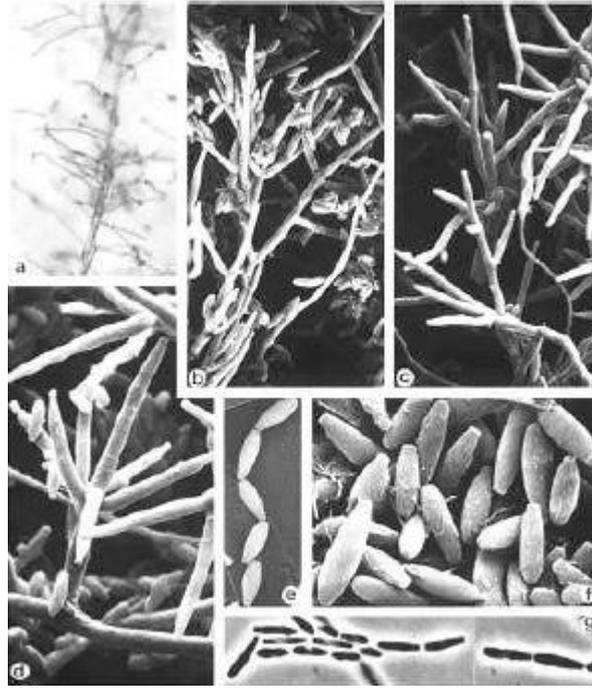


Figura 2 - *Fusarium verticillioides* em microscopia eletrônica. Monofialides com cadeias de conídios (a); conidióforos e microconídios (b – d); macroconídios (e-g). Fonte: Nicolau, 2014.

2.3.2 *Aspergillus* spp.

Outro gênero de fungo muito comum na cultura do milho é o *Aspergillus*, pertencente à família Trichocomaceae. O gênero foi descrito primeiramente por Micheli em 1729, mas foi somente após a publicação dos trabalhos de Tom e Church, em 1926, que as espécies desse gênero passaram a ser mais estudadas. Rapper e Fennel, em 1965, fizeram uma descrição completa do gênero, reconhecendo mais de 132 espécies e 18 variedades (Monteiro, 2012).

Atualmente são conhecidas cerca de 260 espécies, que se caracterizam pelo rápido crescimento, por seus perfis de metabólitos secundários e por suas colorações, que podem variar entre branca, amarela, marrom, verde e preto (Dias, 2012; Monteiro, 2012).

As espécies de *Aspergillus* apresentam conídios unicelulares, globosos, coloridos e hialinos (Figura 3). Seus conidióforos são eretos, simples e apresentam uma vesícula em sua extremidade, onde são formadas as células conidiogênicas métulas e fiáides (Monteiro, 2012, Costa et al., 2014).

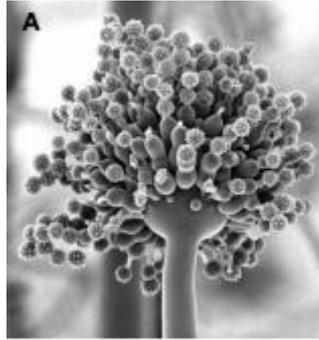


Figura 3 - Conidióforo de *Aspergillus*. Fonte: Damasceno, 2012.

Fungos desse gênero são, normalmente, encontrados nas regiões de climas tropicais e subtropicais, mas podem se instalar em qualquer habitat, e podem estar presentes em diversos alimentos, como milho, leite, amendoim, ovos, queijo, entre outros (Monteiro, 2012; Pedro, 2013). As espécies do gênero são comumente encontradas em armazéns, silos, moinhos, elevadores, entre outros locais onde os produtos agrícolas possam ser armazenados, manuseados e processados (Pezzini et al., 2005).

2.3.3 *Penicillium* spp.

O gênero *Penicillium* pertence à família Trichocomaceae e ao filo Ascomycota. Os fungos deste gênero são amplamente distribuídos pelo mundo, sendo encontrados no solo, no ar, em grãos e matérias orgânicas em decomposição (Monteiro, 2012). Foram observadas 1.107 espécies, variedades e *formae speciales* – fungo que possui adaptação para um hospedeiro específico, de táxons do gênero *Penicillium* (Dias, 2012).

Esse gênero apresenta crescimento rápido, coloração esverdeada, às vezes branca, e uma massa de conidióforos. Esses são curtos, eretos, geralmente lisos. Os conídios desse gênero são unicelulares, variáveis, e geralmente elípticos (Figura 4) (Dias, 2012).

São fungos filamentosos que se dividem em quatro subgêneros, que se diferenciam segundo algumas características, como número de verticilos, forma e tamanho das fiálides, textura da estirpe, tamanho e cor dos conídios (Damasceno, 2012).

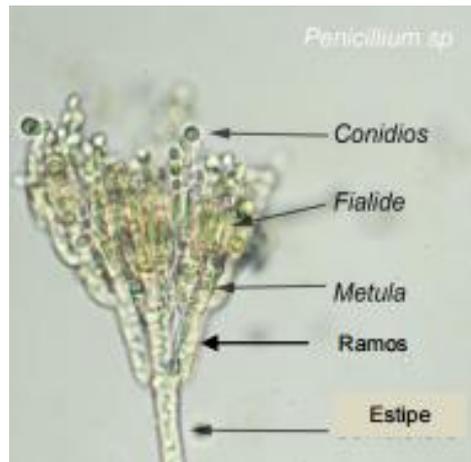


Figura 4 – Estruturas de *Penicillium*. Fonte: Damasceno, 2012.

As espécies deste gênero são mais frequentes em regiões que possuem temperaturas mais baixas e a maioria é considerada psicrotrófica, sendo capaz de deteriorar alimentos (Chalfoun e Batista, 2003). As espécies do *Penicillium* podem causar diversos efeitos danosos em seu hospedeiro, como descolorações dos grãos, perda da matéria seca, produção de micotoxinas, redução na germinação de sementes e alteração do valor nutricional (Dias, 2012).

2.3.4 *Stenocarpella* spp.

Os fungos do gênero *Stenocarpella* pertencem à classe Ascomycetes e ordem Dothideales e são considerados importantes patógenos do milho. Suas espécies são comumente encontradas em campo e podem causar podridão do colmo, da espiga e mancha foliar (Casa et al., 2006).

Esse gênero possui duas espécies, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, que foram descritas pela primeira vez nos estados Unidos, nos anos de 1884 (Saccardo, 1944) e 1896 (Earle, 1897), respectivamente (Casa et al., 2006).

Stenocarpella spp. são caracterizados morfológicamente por apresentarem picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados, com coloração marrom-escuro a preta, e conídios cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, com coloração parda (Casa et al., 2006; Siqueira, 2013).

As duas espécies são diferenciadas morfologicamente pela forma, pelo número de células, pela cor e pelo tamanho dos conídios. *S. macrospora* possui conídios de duas a três vezes maiores do que os de *S. maydis*, conforme mostra a Figura 5 (Casa et al., 2006; Siqueira, 2013).



Figura 5 – Conídios de *Stenocarpella maydis* (menores) e *Stenocarpella macrospora* (maiores). Fonte: Casa et al., 2006.

Alguns fatores como a temperatura e a luminosidade são favoráveis para a esporulação e o desenvolvimento desses fungos. Temperaturas entre 23 e 28 °C proporcionam maior crescimento do micélio e os conídios desses fungos germinam mais rapidamente na presença de luz (Siqueira, 2013).

As doenças em milho causadas pelos fungos *Stenocarpella* podem causar efeito negativo na germinação de sementes, morte do embrião ou afetar o vigor da planta (Siqueira, 2013). Em grãos, esses fungos podem reduzir a produtividade e a qualidade e são os principais causadores de grãos ardidos (Casa et al., 2006).

Algumas estratégias de controle podem ser utilizadas a fim de minimizar a incidência desses fungos em milho, como o uso de fungicidas, rotação de culturas e o emprego de cultivar resistente (Casa et al., 2006).

2.4 Grãos ardidos

Um dos principais fatores que influenciam a qualidade e produtividade do milho são as doenças, que podem ocorrer tanto no campo quanto no armazenamento (Lanza et al., 2012). Dentre as doenças causadas por fungos que afetam o milho se destacam as podridões das espigas, em condições de contaminação na pré-colheita, que podem resultar na formação de grãos ardidos. Grãos mofados ou embolorados estão geralmente associados a danos ocorridos na pós-colheita, ou seja, durante o transporte, beneficiamento e armazenamento (Pinto, 2005; Freitas et al., 2009; Stefanello et al., 2012). As podridões dos grãos de milho no campo são causadas por fungos toxigênicos que necessitam que o grão apresente grau de umidade acima de 20% b.u. para seu desenvolvimento e, assim, promoverem a podridão da espiga (Pinto, 2005).

O termo grãos ardidos se refere aos grãos produzidos em espigas que sofreram um processo de podridão devido à contaminação por fungos. São considerados ardidos os grãos que, por ação do calor e umidade ou fermentação, apresentam pelo menos um quarto da sua superfície com colorações variando de marrom-claro a roxo ou vermelho intenso (Figura 6) (Pinto, 2005; Brasil, 2010).

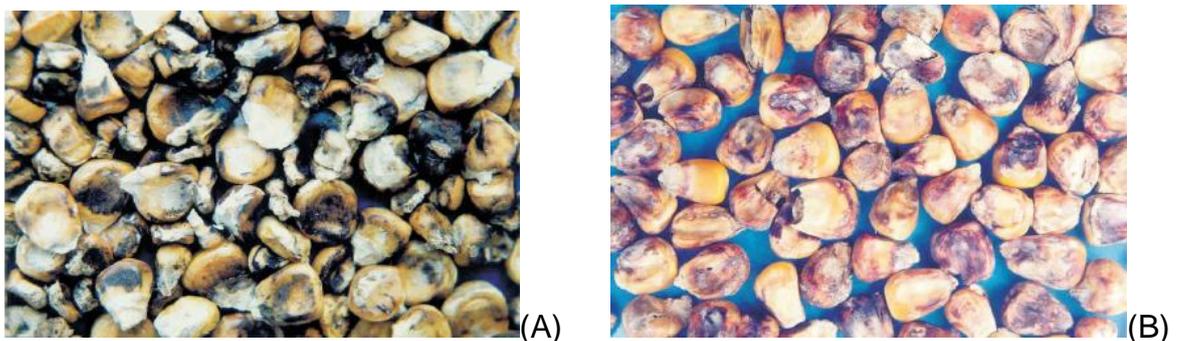


Figura 6 – Grãos ardidos pelo ataque de *Stenocarpella maydis* (A) e *Fusarium verticillioides* (B). Fonte: Pinto, 2005.

Os principais fungos responsáveis pelo aparecimento de grãos ardidos são *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*), *Stenocarpella macrospora* (*Diplodia macrospora*), *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Gibberella zeae* e,

ocasionalmente, *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (Juliatti et al., 2007; Alves et al., 2012).

Os fungos que atacam o milho podem ser divididos em dois grupos, os que produzem apenas grãos ardidos e os que além de produzirem os grãos ardidos sintetizam micotoxinas (Pinto, 2005).

Para Santin et al. (2004) o aumento da incidência de grãos ardidos pode estar relacionado ao atraso da colheita das espigas, que ficam vulneráveis ao ataque de fungos de campo.

Danos nos grãos causados por insetos e ambientes com alta umidade e temperaturas favoráveis facilitam a proliferação de fungos, que ocasionam a degradação do endosperma e, conseqüentemente, a fermentação do grão (Mendes et al., 2009). Além disso, fatores ambientais como épocas de plantio, região, sistemas de cultivo (ex. monocultura associada a plantio direto) e práticas culturais, possuem influência na incidência dos grãos ardidos (Juliatti et al., 2007).

. Os grãos ardidos causam desvalorização comercial do produto e podem apresentar contaminação por micotoxinas que ameaçam a saúde humana e animal. Além disso, essa infecção pode paralisar o processo de enchimento de grãos, reduzindo a massa das espigas, causando grandes perdas econômicas (Mendes et al., 2012).

Segundo a Normativa nº 60 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2011), o milho pode ser classificado de acordo com a sua qualidade, com limites máximos de tolerância para grãos ardidos, conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Limites máximos de tolerância para grãos avariados e ardidos.

Enquadramento	% de Grãos Avariados	
	Ardidos	Total
Tipo 1	1	6
Tipo 2	2	10
Tipo 3	3	15
Fora de tipo	5	20

Adaptação da Normativa nº 60 de 22 de dezembro de 2011 (Brasil, 2011).

Algumas práticas são utilizadas para a prevenção contra a contaminação dos grãos de milho por fungos produtores de grãos ardidos e, dentre elas, destacam-se o manejo dos restos culturais, a rotação de culturas, a utilização de cultivares resistentes, a interrupção do monocultivo do milho, o controle das plantas daninhas hospedeiras dos fungos que causam as podridões das espigas, o uso de sementes de alta qualidade sanitária, não retardar a colheita dos grãos e não colher espigas atacadas por insetos, pássaros e ratos (Pinto, 2005).

2.5 Micotoxinas em grãos de milho

Em 1960, no Reino Unido, houve um surto de mortes inexplicáveis de aves, especialmente de perus, que ficou conhecido como “*Turkey x disease*”. A investigação revelou que as mortes haviam sido provocadas por ração contaminada com uma substância fluorescente produzida pelo *Aspergillus flavus*, que deu origem a palavra aflatoxina. A partir desse ocorrido, pesquisas posteriores identificaram outros fungos produtores de substâncias tóxicas (Food Ingredients Brasil, 2009).

Os fungos toxigênicos são responsáveis pela síntese de metabólitos secundários, as micotoxinas, originadas, principalmente, por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Freire et al., 2007). Os metabólitos secundários são formados ao final da fase exponencial de crescimento do fungo, em geral quando se tem o acúmulo de metabólitos primários usados como precursores. Fungos desses gêneros são produtores de algumas micotoxinas como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, zearalenonas e desoxinivalenol (Maziero e Bersot, 2010).

O crescimento fúngico e a contaminação dos alimentos com essas toxinas dependem de fatores como umidade, temperatura, pH, tempo para o crescimento fúngico, presença de oxigênio, características genéticas, constituição do substrato, lesões nos grãos causadas por insetos ou dano mecânico/térmico, quantidade de inóculo fúngico e interação/competição de linhagens fúngicas de colheita, de pós-colheita, de transporte, de processamento e de armazenamento do produto (Kawashima e Soares, 2006; Maziero e Bersot, 2010).

Uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos, e um fungo pode também produzir vários tipos de micotoxinas (Maziero e Bersot, 2010).

A inserção das micotoxinas na cadeia alimentar pode ocorrer de duas formas: direta ou indiretamente. Na contaminação direta, o fungo toxigênico contamina o produto e sintetiza a micotoxina, permanecendo no produto. Na contaminação indireta, a micotoxina estará presente no produto final resultante de contaminação fúngica prévia, porém, o fungo é eliminado durante o processamento do alimento (Maziero e Bersot, 2010).

A presença de micotoxinas em alimentos é relevante devido à sua associação com doenças em humanos e animais, além de afetar a produtividade e o comércio de grãos (Byaruhanga e Atukwase, 2011). A ingestão de produtos contaminados pode causar micotoxicoses, cuja gravidade depende de fatores como grau de exposição, toxicidade da micotoxina, idade e estado nutricional do indivíduo. Os rins, o fígado e os sistemas endócrino, imunológico e nervoso, são os locais mais afetados pelos metabólitos tóxicos, dentre outros órgãos e sistemas (Maziero e Bersot, 2010). As micotoxicoses podem gerar doenças agudas ou crônicas, levando à morte rápida ou à formação de tumores (Pereira e Santos, 2011).

A maioria das micotoxinas é termoestável, dessa forma, são necessárias estratégias que minimizem o ataque de fungos aos grãos, como a utilização de linhagens de plantas resistentes, a colheita e o armazenamento adequado, controle de insetos e roedores, e controle da temperatura e umidade (Food Ingredients Brasil, 2009).

As aflatoxinas eram as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estavam previstos na legislação brasileira. No entanto, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, a ANVISA estabeleceu os Limites Máximos Tolerados (LMT) para as micotoxinas aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2) e zearalenona (ZON) em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas no Brasil conforme Tabela 5.

Tabela 5: Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas no Brasil ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Aplicação em 2011		
Micotoxinas	Alimento	LMT
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolas de milho	20
Fumonisinias (B1+B2)	Milho de pipoca	2000
	Alimentos à base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Zearalenona	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Ocratoxina A	Cereais, e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
Desoxinivalenol (DON)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Aplicação em janeiro de 2012		
Fumonisinias (B1+B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	300
Desoxinivalenol (DON)	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750

Adaptação da RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 (ANVISA).

2.5.1 Aflatoxinas

A morte de mais de 100 mil perus na Inglaterra em 1960, por consumirem ração à base de amendoim contaminado, fez com que as aflatoxinas se tornassem as micotoxinas mais estudadas e conhecidas (CIB, 2004; Nogueira, 2009).

São conhecidos 17 compostos denominados aflatoxinas, porém, apenas quatro são mais estudados (Figura 7) e estão geralmente relacionados a surtos

de intoxicação. Quimicamente, as aflatoxinas são um grupo de metabólitos bis-furano-cumarina (Nogueira, 2009).

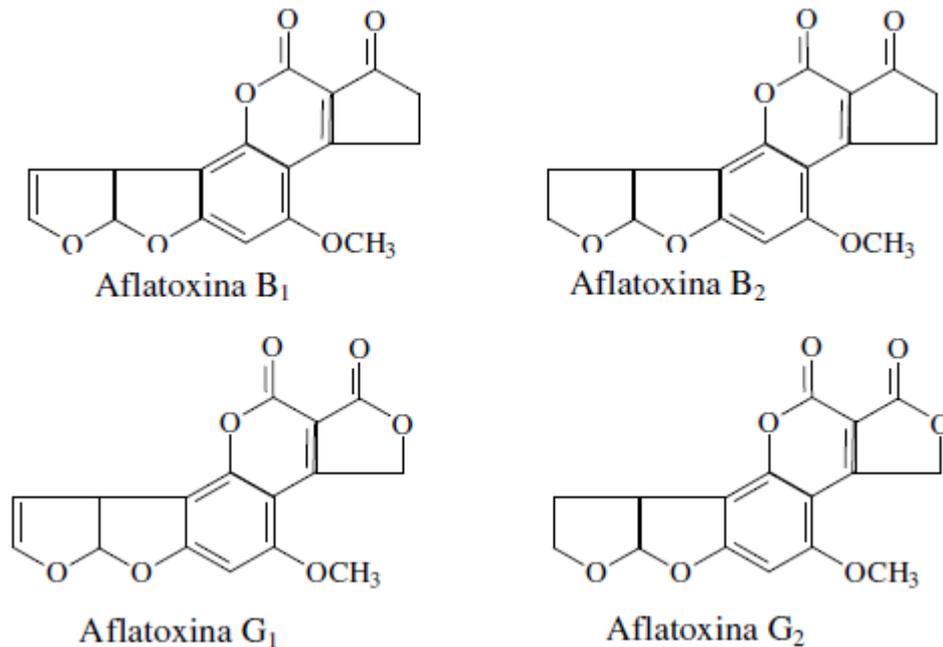


Figura 7 – Estrutura química das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Fonte: Nogueira, 2009.

Existem várias espécies do fungo *Aspergillus* que atuam na produção das micotoxinas, porém, destacam-se *A. flavus* e *A. parasiticus*, que produzem as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Dentre as micotoxinas, essas são as que apresentam os maiores danos aos seres humanos e aos animais, devido à alta toxicidade e à ampla ocorrência (Oliveira e Koller, 2011). A aflatoxina B₁ é produzida por todas as linhagens produtoras de aflatoxinas e é considerada a mais tóxica de todas as 17 diferentes moléculas que o grupo apresenta, atacando principalmente o fígado (Rocha, 2010).

No Brasil, algumas condições são favoráveis à produção de aflatoxinas, como o clima quente e úmido e técnicas inadequadas de plantio, colheita, secagem e armazenamento (Oliveira e Koller, 2011). Essas toxinas geralmente contaminam os alimentos durante o armazenamento. A temperatura mínima necessária para o desenvolvimento do fungo e a produção da micotoxina

encontra-se entre 10 e 12 °C, com temperatura ótima acima de 25 °C (Oliveira e Koller, 2011; Santana, 2012).

Além do milho, essas toxinas encontram-se presentes em diversos outros alimentos, como amendoim, castanhas, feijão, arroz, cevada, sementes de girassol e rações para animais (Oliveira e Koller, 2011).

A ingestão de alimentos altamente contaminados por aflatoxinas pode causar intoxicações agudas, denominadas aflatoxicoses (Ramos et al., 2008). Entretanto, por possuírem propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras, as aflatoxinas, quando ingeridas continuamente, mesmo que em baixas concentrações, podem originar sérios danos à saúde animal e humana, como por exemplo, o câncer hepático (Dilkin et al., 2000; Oliveira e Koller, 2011).

Os efeitos causados pelas aflatoxinas podem diferir de acordo com as espécies alvo e podem, também, variar dentro da mesma espécie em função de alguns fatores como idade, sexo, condições nutricionais do animal e composição da dieta. O tempo de exposição e a quantidade ingerida são fatores que também influenciam nos efeitos causados pela micotoxina (Nogueira, 2009). A toxicidade da aflatoxina é maior para animais jovens e machos, quando comparados com velhos e fêmeas, e a maioria das espécies animais que apresenta suscetibilidade a aflatoxinas pode morrer após três dias da ingestão, dependendo da dose (Food Ingredients Brasil, 2009). Os principais efeitos causados em animais estão descritos na Tabela 6 (Nogueira, 2009).

Segundo Nogueira (2009), a prevenção é a forma mais eficaz de se controlar a contaminação por aflatoxinas. Os estudos a respeito dessa micotoxina referentes às condições favoráveis para sua produção são extremamente úteis para a mitigação do problema.

Tabela 6: Principais efeitos causados pela ingestão de aflatoxinas em alguns animais.

Animal	Efeitos da aflatoxicose
Frangos e poedeiras	Redução do crescimento e da eficiência dos antibióticos; fígados e rins descolorados, pigmentados e um pouco aumentados, fibrose, acumulação de gordura; hemorragia, anorexia, fraqueza das pernas e das asas; diminuição da produção de ovos, gema pálida, ovos menores, casca frágil, pontos pretos; desenvolvimento menor dos embriões, redução do ganho de peso.
Suínos	Necrose centrilobular, fibrose, problemas nos rins, hemorragia, ataxia, proliferação dos dutos biliares, menor peso das crias, menor taxa de sobrevivência, perda de peso e morte.
Bovinos	Necrose centrilobular, fibrose, infecção no miocárdio, síndrome nervosa, infertilidade, diminuição da gordura do leite, inapetência e ataxia.
Equinos	Danos ao fígado, anorexia, hemorragia, convulsão e morte.
Peixes	Danos ao fígado e rins, pouco desenvolvimento e morte.

Adaptado de Nogueira, 2009.

2.5.2 Zearalenona

A zearalenona (Figura 8) está entre as principais micotoxinas encontradas nos grãos e é produzida por fungos do gênero *Fusarium*, sendo que *F. graminearum* e *F. culmorum* são as principais espécies produtoras da molécula (Teixeira, 2010; Boeira, 2012).

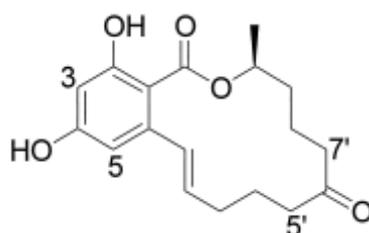


Figura 8 – Estrutura química da zearalenona. Fonte: Nogueira, 2009.

O nome da micotoxina se originou do fungo *Gibberella zeae* (forma assexuada do fungo *F. graminearum*), principal produtor de zearalenona (Teixeira, 2009). Quimicamente, a molécula da zearalenona é constituída por uma lactona ácida resorcílica, com um grande anel que compreende 13 carbonos (Boeira, 2012).

Variações térmicas acentuadas durante o crescimento da cultura no campo são consideradas propícias à produção dessa micotoxina, pois apesar da faixa ótima de temperatura favorável para o crescimento do gênero *Fusarium* ser entre 20 a 25 °C, a zearalenona é produzida em temperaturas mais baixas, entre 10 e 12 °C (Pereira e Santos, 2011; Nascimento et al, 2012). Dessa forma, a variação de temperatura que ocorre durante o dia e a noite se torna um fator importante para a produção desta micotoxina. Assim, regiões de clima temperado favorecem o crescimento e desenvolvimento dos fungos e a produção de zearalenona (Boeira, 2012).

A zearalenona aparece, em média, em 5% das amostras de milho analisadas, sendo considerada como uma das principais micotoxinas encontradas nesse cereal. Também é encontrada em trigo, cevada, sorgo e rações de animais (Dilken et al., 2000; Maziero e Bersot, 2010). Os fungos produtores de zearalenona atacam o milho ainda no campo, no estágio de floração, principalmente em períodos chuvosos, e se as condições forem favoráveis, pode ocorrer produção de zearalenona (Food Ingredients Brasil, 2009).

A presença de oxigênio e o teor de água dos grãos são fatores imprescindíveis para a produção de zearalenona; em condições inadequadas de armazenamento essas micotoxinas podem ser encontradas com elevados níveis de contaminação (Boeira, 2012).

Segundo Teixeira (2009) medidas que evitem a intoxicação de animais por consumirem alimentos contaminados ainda são muito limitadas. A zearalenona é termoestável, porém, durante o processo de extrusão, que utiliza altas temperaturas e pressão, a micotoxina pode ser parcialmente destruída (Boeira, 2012).

Em várias espécies animais a zearalenona e seus derivados têm efeitos estrogênicos, causando infertilidade, edema vulvar, hipertrofia mamária, prolapso vaginal em fêmeas e feminização, atrofia testicular e aumento de tamanho das glândulas mamárias em machos (Maziero e Bersot, 2010). Além disso, possui

efeitos hepatotóxicos, imunotóxicos e nefrotóxicos em animais e humanos (Teixeira, 2009).

2.5.3 Fumonisinias

As fumonisinias encontram-se entre as principais micotoxinas contaminantes do milho, havendo sido descritas e caracterizadas pela primeira vez em 1988. São produzidas, principalmente, pelo gênero fúngico *Fusarium* (Cruz, 2010; Mallmann et al., 2013). A espécie *F. verticillioides* é muito comum em campo, sendo encontrada com maior frequência em grãos recém-colhidos, com níveis de contaminação de até 100% (Hermanns et al., 2006; Reis et al., 2010; Wild e Gong, 2010). Porém, outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinias: *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum* e *F. oxysporum* (Pozzi et al., 2002).

Existem diversos tipos de fumonisinias e até o momento são conhecidas 25 substâncias, sendo B1, B2 e B3 as que ocorrem com maior frequência, entretanto a B1 é considerada a fumonisina que mais interfere no metabolismo dos esfingolipídios, causando principalmente efeitos carcinogênicos (Cruz, 2010; Pereira e Santos, 2011; Santana, 2012).

O Brasil possui clima favorável para contaminação dos grãos por fumonisinias, pois sua produção requer condições de alta umidade e temperaturas de aproximadamente 20 a 26 °C (Cruz, 2010).

Sua estrutura química (Figura 9) difere das outras micotoxinas, pois as fumonisinias não apresentam anéis ou grupamentos cíclicos. A fumonisina B1 é um diéster de propano 1, 2, 3 – ácido tricarbóxico e 2 – amino – 12, 16 dimetil – 3, 5, 10, 14, 15 - pentahidroxicosano em que nos C₁₄ e C₁₅ os grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2, 3 – ácido tricarbóxico (Bezuidenhout et al., 1988).

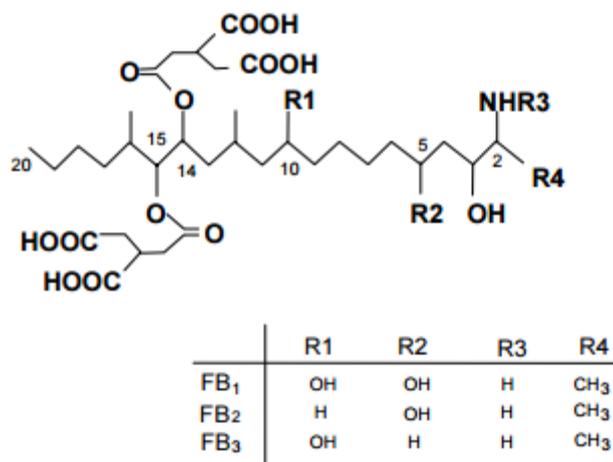


Figura 9 – Estrutura química das fumonisinas B1, B2, B3. Fonte: Minami et al., 2004.

As fumonisinas possuem característica de hidrossolubilidade, apresentando maior solubilidade em acetonitrila-água ou metanol e insolúveis em solventes orgânicos (Butkeraitis, 2003). Entretanto, assim como as outras micotoxinas, são estáveis em calor (Food Ingredients Brasil, 2009). De acordo com Minami et al. (2004), não existe nenhum processo industrial comumente utilizado em alimentos que possa eliminar as fumonisinas do produto contaminado.

Assim como no caso das aflatoxinas, a ingestão de produtos à base de grãos contaminados com fumonisinas pode causar sérios danos à saúde animal e humana. Por possuírem estruturas semelhantes aos precursores dos esfingolipídios, as fumonisinas podem alterar funções celulares importantes como o controle da integridade da membrana, a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose (Turner et al., 1999; Rocha, 2010). Além disso, essas micotoxinas são conhecidas por causarem leucoencefalomalácia em equinos, edemas pulmonares em suínos e câncer de esôfago em humanos (Jay, 2005).

As fumonisinas têm sido associadas à incidência de câncer de esôfago em humanos em diversos países, principalmente na África do Sul e nos Estados Unidos, devido ao consumo de milho e outros produtos com elevado índice de contaminação (Cruz, 2010). Um dos efeitos mais graves causados pelas fumonisinas ocorre em equinos, a leucoencefalomalácia, que é uma doença não infecciosa esporádica e altamente fatal, que pode resultar na morte dos animais

dentro de horas a uma semana. Essa doença atinge o sistema nervoso central e é caracterizada por uma encefalite hemorrágica aguda (Minami et al., 2004; Cruz, 2010).

Outros animais sofrem com os efeitos causados pela ingestão de produtos contaminados. Em ratos, camundongos, coelhos, suínos, macacos e equinos a fumonisina pode provocar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Em suínos, os efeitos podem ser edema pulmonar e hidrotórax, e em aves e ratos causam diversos problemas no fígado (Minami et al., 2004; Cruz, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises para avaliar a qualidade sanitária do milho armazenado foram realizadas nos Laboratórios de Micotoxinas e Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, e no Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, Rio Grande do Sul.

3.1 Coleta das amostras

Foram selecionados 11 produtores rurais de cinco municípios da Região Central de Minas Gerais (Figura 10) que praticam agricultura familiar, com critérios estabelecidos pelos Técnicos da EMATER – MG.

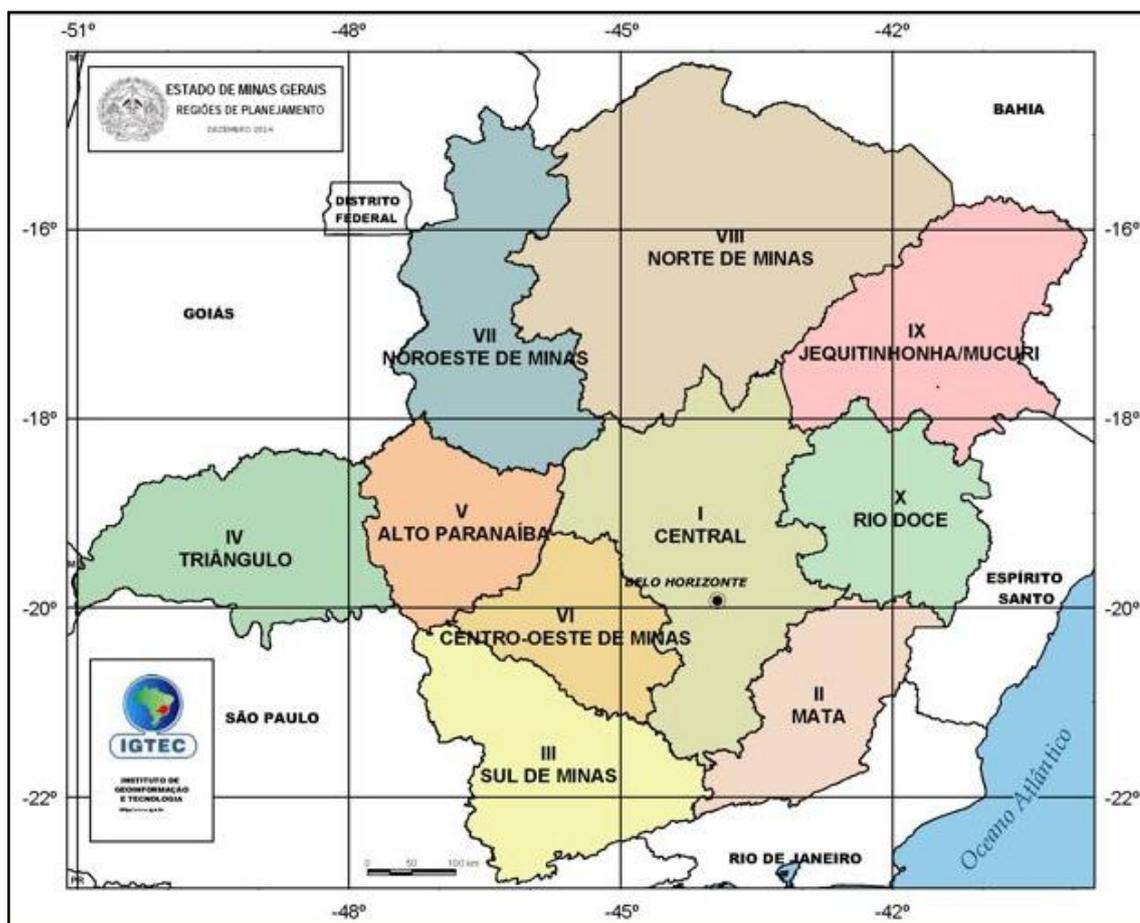


Figura 10 – Mapa da Região Central de Minas Gerais. Fonte: Governo de Minas Gerais, 2010.

Os produtores selecionados armazenam milho em espigas e em sacarias e forneceram as amostras em dois anos consecutivos, de julho de 2013 a janeiro de 2014, e de julho de 2014 a novembro de 2014. As amostras foram coletadas em propriedades rurais localizadas nos seguintes municípios: Esmeraldas (ESM), Fortuna de Minas (FOR), Funilândia (FUN), Inhaúma (INH) e Sete Lagoas (SET) (Tabela 7). As coletas foram feitas em quatro períodos, ao longo do armazenamento, em intervalos de dois meses. No ano de 2013 as coletas foram realizadas em seis propriedades (Produtores INH 01, INH 02, FOR 01, FUN 01, FUN 02 e SET 01), totalizando 23 amostras. No ano de 2014 foram coletadas 21 amostras em sete propriedades selecionadas (Produtores INH 02, FOR 01, SET 02, ESM 01, ESM 02, SET 03, ESM 03).

Tabela 7: Propriedade, local e data de realização das coletas.

2013/2014					
Propriedade	Local	Data da coleta			
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
INH 01	Inhaúma	11/6/2013	17/9/2013	26/11/2013	*
INH 02	Inhaúma	11/6/2013	17/9/2013	26/11/2013	28/1/2014
FOR 01	Fortuna de Minas	3/7/2013	19/9/2013	28/11/2013	28/1/2014
FUN 01	Funilândia	9/7/2013	20/9/2013	26/11/2013	30/1/2014
FUN 02	Funilândia	9/7/2013	20/9/2013	26/11/2013	30/1/2014
SET 01	Sete Lagoas	19/7/2013	19/9/2013	28/11/2013	29/1/2014
2014					
INH 02	Inhaúma	2/7/2014	18/9/2014	18/11/2014	*
FOR 01	Fortuna de Minas	25/7/2014	17/9/2014	19/11/2014	*
SET 02	Sete Lagoas	9/7/2014	22/9/2014	20/11/2014	*
ESM 01	Esmeraldas	3/7/2014	26/9/2014	21/11/2014	*
ESM 02	Esmeraldas	3/7/2014	26/9/2014	21/11/2014	*
SET 03	Sete Lagoas	9/7/2014	22/9/2014	20/11/2014	*
ESM 03	Esmeraldas	3/7/2014	26/9/2014	21/11/2014	*

* Ausência de amostra

Para caracterização das propriedades os produtores responderam a um questionário sobre as datas de plantio e colheita, tipo de semente, tratos culturais empregados e o período em que as espigas permaneceram no campo após a maturação (Tabelas 1A e 2A, Apêndice).

As amostras foram retiradas de cada paiol de acordo com os seguintes procedimentos (Figura 11):

1. Foram retiradas 100 espigas de milho, ao acaso, amostrando-se os quatro cantos e o centro do paiol. Não foram coletadas espigas localizadas na camada superficial de 20 cm;
2. As espigas foram debulhadas em debulhador manual e os grãos homogeneizados manualmente;
3. Retirou-se uma amostra de 2 kg de grãos que foi devidamente acondicionada em sacos de papel Kraft e posteriormente encaminhada para a Embrapa Milho e Sorgo;
4. Na Embrapa Milho e Sorgo as amostras foram subdivididas em duas partes iguais e encaminhadas para os Laboratórios de Micotoxinas e de Fitopatologia para as análises de micotoxinas e insetos praga, e de sanidade dos grãos, respectivamente.



Figura 11 – Ilustrações do processo de coleta das amostras: (A) espigas de milho armazenadas no paiol; (B) espigas de milho retiradas ao acaso; (C) debulhador manual; (D) amostra final com cerca de 2 kg de grãos.

3.2 Avaliação da incidência de insetos praga e índices de perdas

O percentual de grãos infestados foi determinado examinando-se individualmente 200 grãos retirados ao acaso da amostra, para cada amostra foram feitas duas repetições (Figura 12). Os grãos foram imersos em água por aproximadamente 24 horas, de modo a facilitar a execução do corte e assegurar uma observação acurada dos grãos que não se apresentavam aparentemente danificados.



Figura 12 – Imersão de grãos de milho em água para avaliar o percentual de infestação.

Neste exame, foram considerados infestados, além dos grãos que continham larva, pupa ou inseto adulto, todos os demais que apresentavam orifício de saída do inseto, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

O teor de água das amostras foi determinado utilizando-se método gravimétrico em estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas, com amostras de aproximadamente 100 g (Brasil, 2009). A massa específica aparente (ρ , kg m^{-3}) dos grãos de milho foi determinada em uma balança para peso hectolítrico de 1 L, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

3.3 Avaliação da sanidade dos grãos de milho

3.3.1 Massa de 1000 grãos

A massa de 1000 grãos foi determinada por meio da contagem de oito repetições de 100 grãos. Cada repetição foi posteriormente pesada em balança analítica OHAUS, modelo AR2140 e o cálculo foi realizado de acordo com as especificações contidas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

3.3.2 Incidência de grãos ardidos

O percentual de grãos ardidos (NGA) e massa dos grãos ardidos (MGA) foram determinados visualmente, com base no número e massa total de grãos das amostras. Os grãos considerados ardidos foram retirados das amostras, sendo posteriormente contados para se obter o NGA. Para determinação da MGA os grãos foram pesados em balança analítica OHAUS, modelo AR2140.

Foram considerados ardidos os grãos que apresentaram pelo menos um quarto de sua superfície com colorações variando de marrom-claro a roxo ou vermelho intenso (Figura 13).

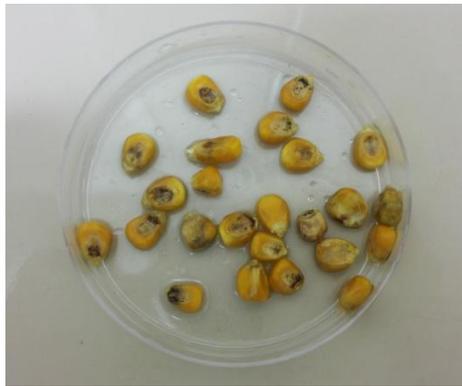


Figura 13 – Grãos considerados ardidos.

3.3.3 Identificação de fungos

Os testes de patologia dos grãos foram realizados empregando-se os grãos ardidos e 100 grãos sadios. Foi empregado o método do papel filtro com congelamento (Figura 14), sendo os grãos inicialmente desinfestados por meio da imersão em hipoclorito de sódio 2% durante 5 minutos. Em seguida, os grãos foram lavados duas vezes em água deionizada e, posteriormente, plaqueados em caixas tipo gerbox contendo papel filtro umedecido com ágar-água em 5% (Pinto, 2007). As caixas foram mantidas por 24 h em temperatura ambiente para estimular a germinação dos grãos, sendo, posteriormente, armazenadas em freezer a -5 °C por 24 h, para interromper o processo germinativo. Em seguida, as caixas foram colocadas em câmara de incubação a 24 °C, com fotoperíodo

ajustado para 12 h. Depois de 10 a 15 dias, foram feitas a identificação do gênero e a avaliação do número dos fungos associados aos grãos, com o auxílio de microscópio estereoscópico (Spenser, modelo 1031) e microscópio binocular (ZEISS, modelo 475200-9901).

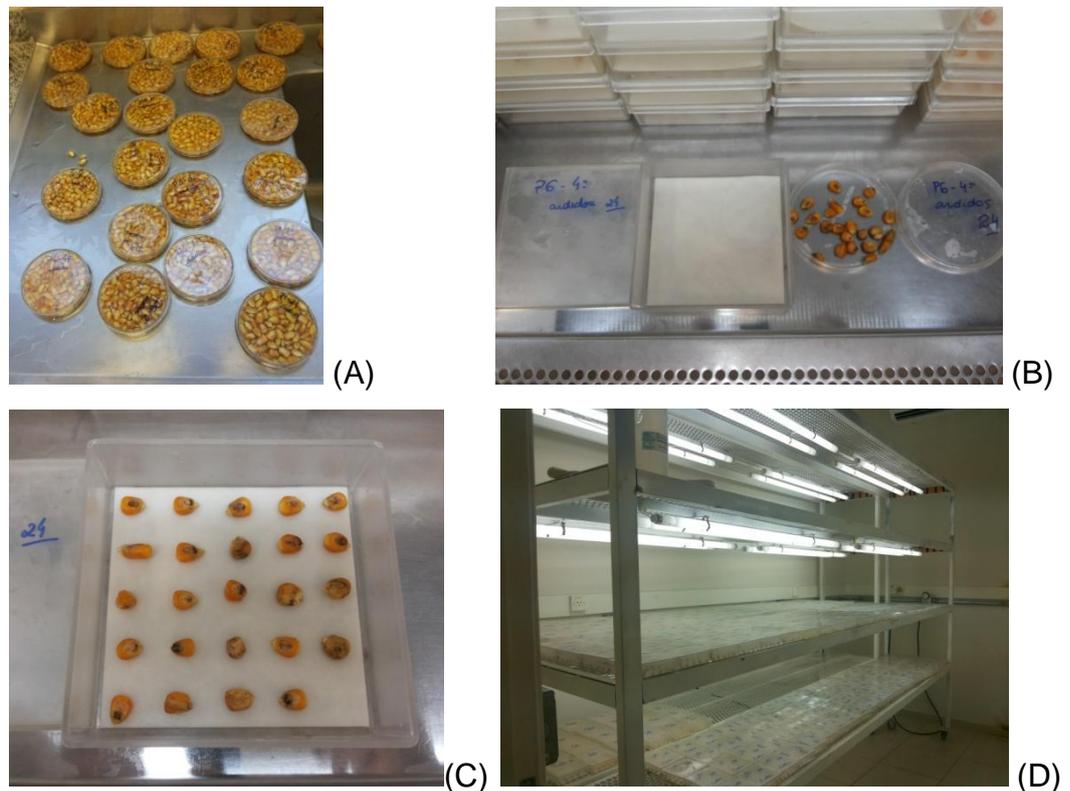


Figura 14 – Ilustrações do processo de identificação de fungos. (A) desinfestação dos grãos, (B) e (C) plaqueamento dos grãos em caixas tipo gerbox e (D) câmara de incubação.

3.4 Determinação de micotoxinas em grãos de milho armazenados (aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona)

As análises de fumonisinas e aflatoxinas foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas da Embrapa Milho e Sorgo. As análises de zearalenona foram realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria. Analisaram-se as micotoxinas em 44 amostras.

Para homogeneização do teor de água, as amostras foram colocadas em estufa a 65 °C, até massa constante. Após resfriamento, os grãos foram moídos

em moinho marca Trapp, modelo TRF300, com peneira com abertura de 3 mm. As amostras foram armazenadas em freezer a -18 °C até o momento das análises e homogeneizadas em quarteador antes da pesagem.

3.4.1 Detecção e quantificação de aflatoxinas

Foram pesadas 10 g de cada amostra, acrescentando-se 1 g de NaCl e 20 mL de solução metanol:água (80:20 v/v). As amostras foram agitadas por 2 min. em mesa agitadora (Nova Ética, modelo 109), a 200 rpm, procedendo-se à filtração em papel filtro (11 cm) qualitativo para retirada de impurezas. Em seguida retirou-se uma alíquota de 5 mL da amostra filtrada, a qual foram acrescentados 20 mL de água deionizada, realizando-se então nova filtração em filtro de microfibras de 11,0 cm/1,5 µm. Retirou-se uma nova alíquota de 10 mL que foi colocada em seringa acoplada à coluna de imunoafinidade Aflatest (Vicam®). A amostra eluiu naturalmente pela coluna por gravidade, desprezando-se o líquido (1-2 gotas/segundo). O sistema foi, então, lavado com 10 mL de água deionizada, desprezando-se o líquido (1-2 gotas/segundo). O sistema foi novamente lavado com 10 mL de água deionizada, desprezando-se o líquido, e foi completamente esvaziado com auxílio de um compressor de ar. Adicionou-se 1,0 mL de metanol grau HPLC, que eluiu lentamente (uma gota por segundo) pela coluna de imunoafinidade (Vicam®, modelo #G1024), coletando-se a amostra em cubeta de vidro. Posteriormente, adicionou-se 1 mL do revelador para aflatoxina à cubeta, fazendo-se a leitura da concentração no fluorímetro (Vicam®, modelo serie 4) depois de 1 min da adição do revelador, obtendo-se o resultado em ppb de acordo com a metodologia da Vicam® (Aflatest®, Immunoaffinity Column, USA).

A cada bateria de 20 amostras foi analisada uma amostra referência da Romer Labs Diagnostic GmbH com teor de $11,04 \pm 3,24 \mu\text{g kg}^{-1}$ e da Trilogy Analytical Laboratory com teor de $9,6 \pm 1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.4.2 Detecção e quantificação de fumonisinas

Foram pesadas 10 g de cada amostra, acrescentando-se 1 g de NaCl e 20 mL de solução metanol:água (80:20 v/v). As amostras foram agitadas por 2 min. em mesa agitadora marca Nova Ética modelo 109, a 200 rpm, procedendo-se à filtragem em papel filtro qualitativo para retirada de impurezas. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 5 mL da amostra filtrada, a qual foram acrescentados 20 mL de solução tampão PBS 0,1% Tween 20, realizando-se então nova filtragem em filtro de microfibras de 9,0 cm/1,0 µm. Retirou-se uma nova alíquota de 10 mL que foi colocada em seringa acoplada à coluna de imunoafinidade Fumonitest (Vicam®). A amostra eluiu naturalmente pela coluna por gravidade, desprezando-se o líquido (1-2 gotas/segundo). O sistema foi então lavado com 10 mL de solução tampão PBS 0,1% Tween 20 (1-2 gotas/segundo). O sistema foi novamente lavado com 10 mL de solução tampão PBS 0,1% Tween 20, desprezando-se o líquido, e foi completamente esvaziado com auxílio de um compressor de ar. Adicionou-se 1,0 mL de metanol grau HPLC, que eluiu lentamente (uma gota por segundo) pela coluna de imunoafinidade (Vicam®, modelo #G1060), coletando-se a amostra em cubeta de vidro. Posteriormente, adicionou-se 1 mL do revelador para fumonisinas à cubeta, fazendo-se a leitura da concentração no fluorímetro (Vicam®, modelo serie 4) depois de 4 min. da adição do revelador, obtendo-se o resultado em ppm (Fumonitest®, Immunoaffinity Column, Vicam®, USA). A validação da metodologia foi feita de acordo com Ribeiro et al. (2013). A cada bateria de 12 amostras foi analisada uma amostra referência da Vicam com teor $<3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e da Trilogy Analytical Laboratory com teor de $4,1 \pm 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Mostram-se, na Figura 15, ilustrações de alguns dos procedimentos empregados na detecção e quantificação de aflatoxinas e fumonisinas.

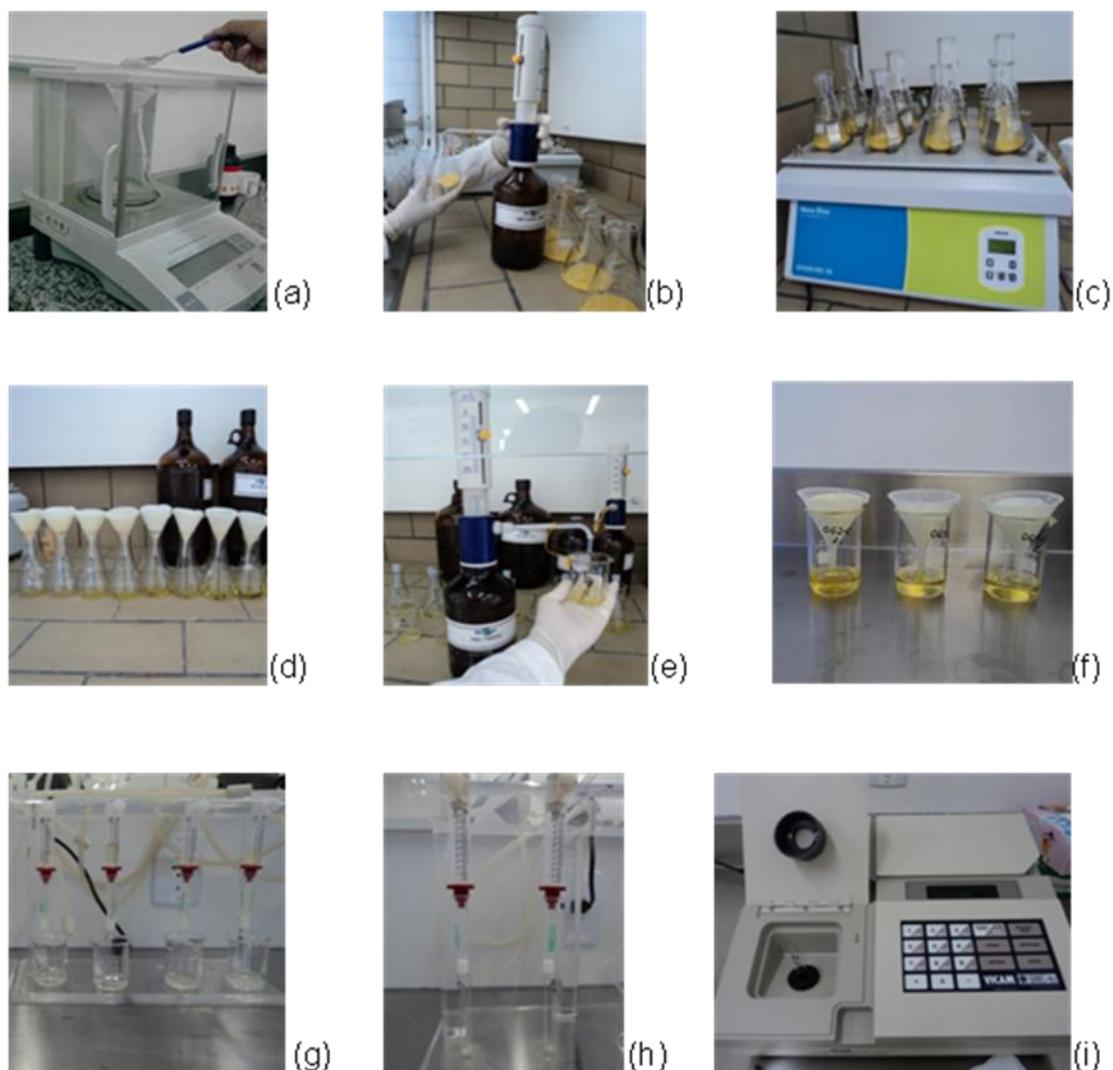


Figura 15 – Ilustrações do processo de análise e detecção de fumonisinas e aflatoxinas. (a) pesagem da amostra, (b) extração das micotoxinas, (c) agitação, (d) filtragem, (e) diluição, (f) filtragem, (g) eluição da amostra pela seringa, (h) eluição do metanol HPLC e (i) leitura em fluorímetro.

3.4.3 Detecção e quantificação de zearalenona

As análises foram realizadas no LAMIC da Universidade Federal de Santa Maria, RS, seguindo a metodologia desse Laboratório que preconiza o emprego de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um detector de massas (LC-MS/MS 400 API), com fonte de ionização operando no modo negativo. Após a moagem das amostras, foram pesados 3 g de cada amostra e adicionados 24 mL da solução metanol:água (70:30 v/v). As amostras foram agitadas por 20 min. em agitador de bancada (Marconi, modelo MA – 563),

procedendo-se então à filtragem e retirada de 10 mL do extrato. Em seguida diluiu-se 40 µL do extrato em 955 µL de diluente Fase aquosa:Fase orgânica (30:70 v/v). O extrato foi agitado e levado para análise pelo LCMS/MS. A micotoxina foi quantificada através da curva preparada com padrões de zearalenona (0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 e 10,0 µg L⁻¹), apresentando limite de quantificação de 20 µg kg⁻¹. Utilizou-se a coluna Eclipse XDB-C8, com dimensões de 4,6 mm x 250 mm e 5 µm de diâmetro, fase aquosa H₂O:AcNH₄ (995:5 v/v) e fase orgânica H₂O:MeOH:AcNH₄ (95:990:5 v/v). Para detecção de zearalenona foram utilizados os íons filhos 174,9 e 131,0 (317,0 →174,9; 317,0 →131,0).

3.5 Delineamento estatístico

Nas análises referentes às micotoxinas aflatoxinas e fumonisinas totais os resultados foram avaliados por análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey em 5% de probabilidade pelo programa SISVAR (Ferreira, 2010). Para as análises da incidência de insetos praga, índices de perdas, avaliação da sanidade dos grãos de milho e teores de zearalenona foram utilizadas análises descritivas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados pluviométricos

Os dados foram coletados com o auxílio de programas de precipitação por satélite, *Tropical Rainfall Measuring Mission* (TRMM) e *Multi-Satellite Precipitation Analysis* (TMPA) (Mantas et al., 2015). Foram quantificadas as médias mensais de precipitação entre o período de plantio até o fim do armazenamento dos grãos de milho nas propriedades analisadas durante os dois períodos (Tabela 8).

Observou-se que para as propriedades do primeiro ano de pesquisa (FOR, FUN, INH e SET) o período mais chuvoso ocorreu entre novembro/2012 a janeiro/2013, com valor variando de 95,9 a 251,8 mm. O período mais seco abrangeu o trimestre junho, julho e agosto/2013, com valores entre 3,0 e 6,8 mm.

Para o segundo ano de pesquisa (ESM, FOR, INH e SET), os meses de outubro, novembro e dezembro/2013 foram os mais chuvosos, com médias variando de 96,4 a 360,1 mm, e com valores de 3,1 a 8,2 mm para os períodos mais secos, que corresponderam aos meses de junho e agosto/2014.

De acordo com Ferreira (2006), o milho suporta pequenas deficiências hídricas no início do seu crescimento, não sendo muito exigente quanto à umidade, porém, essa deficiência pode ser fator crítico durante o período entre a floração e o enchimento de grãos, prejudicando assim a produtividade da cultura. De acordo com o autor o milho pode ser cultivado em regiões que apresentem

precipitações anuais de 250 mm a 5.000 mm, sendo que a quantidade de água consumida pela planta durante seu cultivo é por volta de 600 mm.

A produtividade do milho é maior quando as condições climáticas permitem que o plantio seja feito nos meses de setembro e outubro (Ferreira, 2006). Devido às condições climáticas, a maioria dos produtores atrasou o plantio do milho.

Tabela 8: Médias mensais dos dados pluviométricos dos municípios situados na Região Central de Minas Gerais em que foram coletadas as amostras de grãos de milho armazenados em paióis de produtores familiares (mm).

Período	Município				
	Esmeraldas	Fortuna de Minas	Funilândia	Inhaúma	Sete Lagoas
Outubro/2012	46,4	39,9	36,6	39,6	37,5
Novembro/2012	227,5	229,9	244,9	248,1	251,8
Dezembro/2012	133,1	113,6	95,9	106,1	98,8
Janeiro/2013	241,8	218	215,1	212,8	214,5
Fevereiro/2013	61,9	54,5	47,9	52,1	49,3
Março/2013	63,9	64,8	53,9	59,5	53,8
Abril/2013	82,5	67,1	66,4	65,2	61,1
Maio/2013	35,6	32,8	31,2	31,5	30,8
Junho/2013	8,0	6,8	5,2	6,4	5,7
Julho/2013	5,4	4,6	6,8	5,2	5,8
Agosto/2013	4,3	3,0	3,4	3,4	3,6
Setembro/2013	49,5	39,9	36,2	38,0	35,4
Outubro/2013	112,7	96,4	96,8	100,2	104,5
Novembro/2013	105,9	104,6	110,6	105,9	107,6
Dezembro/2013	360,1	311,9	322,8	296,3	300,3
Janeiro/2014	62,0	50,0	41,5	47,3	41,7
Fevereiro/2014	28,2	27,3	25,2	25,3	24,8
Março/2014	101,2	98,4	101,8	96,4	93,3
Abril/2014	94,1	70,5	33,7	53,2	38,9
Maio/2014	15,0	16,0	16,0	16,0	15,3
Junho/2014	8,2	7,0	5,3	6,7	5,6
Julho/2014	20,2	17,1	21,1	17,9	19,3
Agosto/2014	4,6	3,1	3,4	3,5	3,6
Setembro/2014	13,8	12,5	10,8	10,8	10,0
Outubro/2014	70,4	68,4	55,4	70,1	68,5
Novembro/2014	146,4	121,9	136,8	130,2	134,9
Dezembro/2014	108,9	95,4	102,5	92,7	94,3

A escassez de chuvas e a falta de mão de obra foram fatores que tiveram grande influência na dificuldade de encontrar produtores que estivessem disponíveis para colaborar com o presente trabalho, pois a maioria dos produtores da Região Central de Minas Gerais não fez o plantio da cultura. Para aqueles que o fizeram, os fatores mencionados, além do plantio tardio, influenciaram na produtividade e com quantidade inferior à esperada.

4.2 Avaliação da incidência de insetos praga, índices de perda e massa de 1000 grãos

4.2.1 Incidência de insetos praga

Para o primeiro ano de coleta detectou-se infestação por insetos praga em todas as amostras analisadas, com níveis variando de 0,3% a 34,8% (Figura 16). Observou-se infestação média total de 10,1% na primeira coleta, 7,1% na segunda, 14,7% na terceira e 23,6% na quarta, indicando que houve aumento na infestação em função do avanço no período de armazenamento, exceto na segunda coleta. As amostras apresentaram uma média total de infestação de 13,8%. Das 23 amostras analisadas, 15 (65,2%) apresentaram infestação acima dos níveis mostrados na Tabela 3, sendo, portanto, consideradas fora dos padrões de comercialização estabelecidos pela Normativa nº 60 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2011).

No segundo ano de coleta, observou-se que 20 das 21 amostras analisadas apresentaram infestação por insetos praga e os níveis encontrados variaram de 0,3 a 52,5% (Figura 17). A infestação média total das amostras foi de 2,4% na primeira coleta, 7,9% na segunda e 30,2% na terceira, indicando, novamente, aumento na infestação em função do período de armazenamento. As amostras apresentaram média total de infestação de 13,5%. Com relação ao padrão de comercialização, 11 amostras (52,4%) apresentaram grau de infestação acima dos níveis estabelecidos pela Normativa nº 60 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2011).

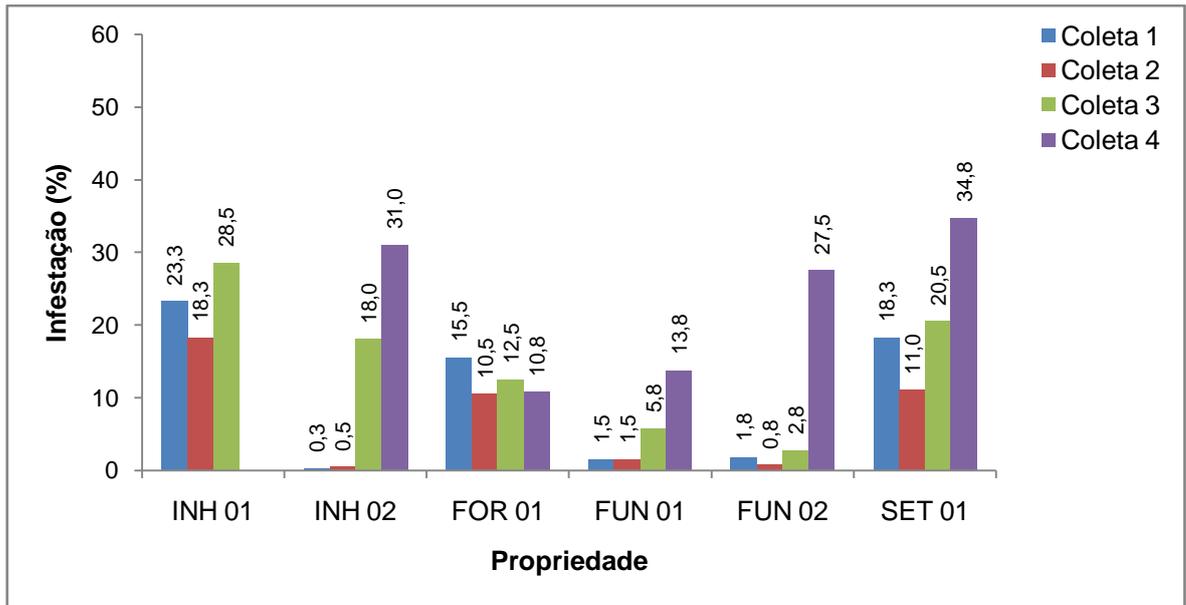


Figura 16 – Infestação por insetos praga em grãos de milho coletados em seis propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre junho de 2013 e janeiro 2014. Municípios: Inhaúma(INH); Fortuna de Minas (FOR); Funilândia (FUN); Sete Lagoas (SET).

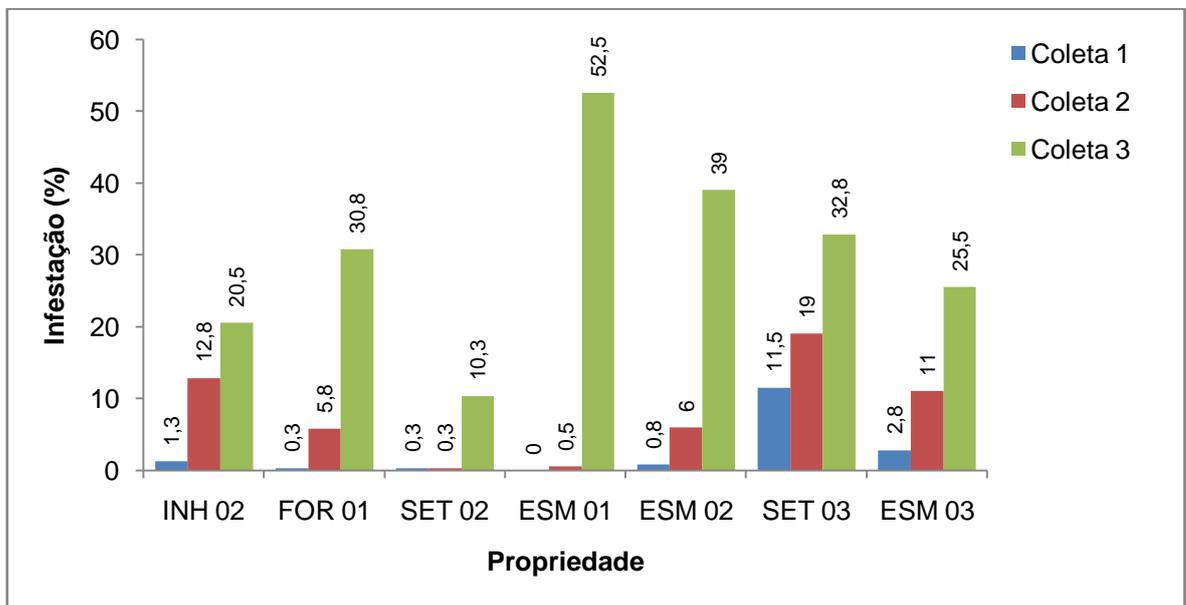


Figura 17 - Infestação por insetos praga em grãos de milho coletados em sete propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre os meses de julho e novembro de 2014. Municípios: Inhaúma(INH); Fortuna de Minas (FOR); Esmeraldas (ESM); Sete Lagoas (SET).

Quirino et al. (2013) observaram níveis de infestação entre 0,94% e 2,33%, consideravelmente inferiores aos verificados no presente trabalho. Nesse trabalho os grãos foram armazenados durante 5 meses, com umidade entre 13% e 14% b.u., e temperatura média de 23,6 °C. No entanto, a investigação foi feita em armazém aerado com ar natural, o que possivelmente contribuiu para o baixo grau de infestação. Antunes et al. (2011) armazenaram amostras de 600 g de grãos de milho em frascos de vidro fechados com tecido tipo *voile*, com grau de infestação inicial de 0,5% e observaram aumento para 3%, 10% e 34% ao longo de 30, 60 e 120 dias de armazenamento, respectivamente. O valor médio do grau de infestação foi de 12%, ou seja, os resultados foram semelhantes aos observados no presente trabalho. O aumento do grau de infestação em função do período de armazenamento foi também avaliado por Caneppele et al. (2003); ao infestarem amostras de 500 g de milho com 5, 15 e 50 adultos de *S. zeamais*, observaram grau de infestação de até 97% depois de 150 dias de armazenamento.

O elevado grau de infestação observado no presente trabalho pode ser o resultado da influência de diversos fatores. Em primeiro lugar, paiós são estruturas que favorecem naturalmente o ataque de insetos praga. De acordo com Albernaz et al. (2010), na região central de Minas Gerais o milho é armazenado principalmente em espigas empalhadas, normalmente em paióis de alvenaria (38%) ou de madeira (35%), galpão de alvenaria (12%) e silo subterrâneo (3%). Os que não possuem local próprio de armazenamento optam por terreiros cobertos com lona (6%) e outros não armazenam o milho na propriedade (6%). Além disso, a colheita tardia, a precariedade das estruturas e falta de cuidados no armazenamento podem potencializar as perdas por ataque de roedores e insetos. No presente trabalho, as propriedades eram dotadas predominantemente de paióis e a maioria dos produtores atrasou a colheita dos grãos de 30 a 90 dias (Tabela 1A), possibilitando assim um maior ataque de pragas e fungos.

Outro fator que contribuiu para a elevação do grau de infestação ao longo do armazenamento foi o fato de os produtores não utilizarem fungicidas e inseticidas quando a cultura ainda estava no campo ou inseticidas durante o armazenamento (Tabelas 1A e 2A). As exceções foram o produtor INH 02, que entre julho e novembro de 2014 aplicou inseticida quando a cultura ainda se

encontrava no campo e o produtor ESM 03 que utilizou inseticida no armazenamento. Contudo, é provável que essas aplicações não tenham contribuído de forma consistente para o controle de insetos praga, uma vez que o grau de infestação depois de cinco meses de armazenamento foi superior a 20%.

Ademais, o aumento do índice de infestação pode estar associado à presença de *S. zeamais* que é a principal praga do milho. Por se tratar de praga primária, que se alimenta do grão sadio e intacto, conseguindo romper seu tegumento e causando os danos mais representativos, a infestação por *S. zeamais* facilita a entrada e o desenvolvimento de insetos praga secundários, que não conseguem romper o tegumento do grão (Alencar et al., 2011).

Com relação ao teor de água dos grãos (Figura 18), observou-se que independente do grau de infestação por insetos praga, o valor permaneceu no intervalo entre 9,0 e 10,8% b.u. ao longo do armazenamento, sendo inferior ao limite máximo permitido para comercialização de grãos de milho no Brasil, de 14,5% b.u (BRASIL, 1976). Comportamento similar foi observado no segundo ano do experimento, em que o teor de água manteve-se entre 8,0% e 11,8% b.u. (Figura 19).

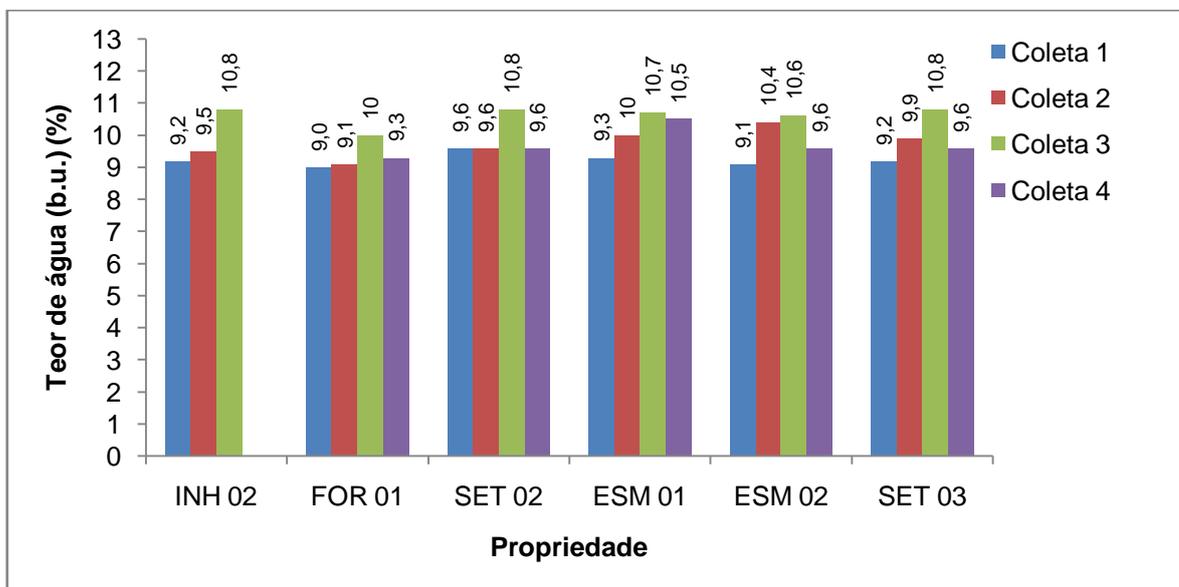


Figura 18 – Teor de água (% b.u.) das amostras de grãos de milho armazenados em propriedades familiares entre junho de 2013 e janeiro 2014.

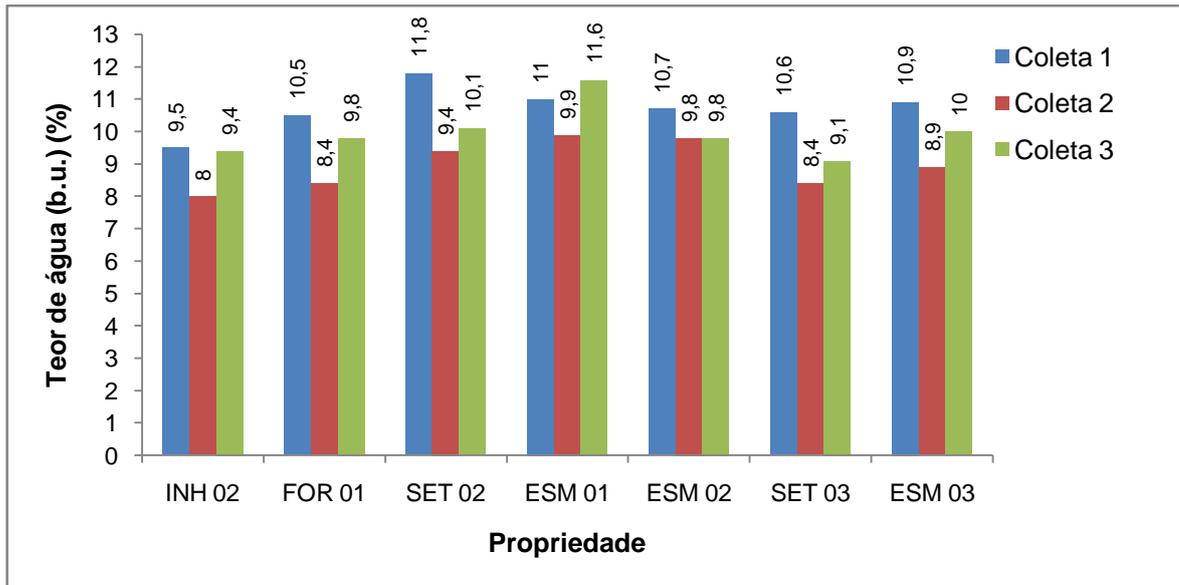


Figura 19 - Teor de água (% b.u.) das amostras de grãos de milho armazenados em propriedades familiares entre julho e novembro de 2014.

4.2.2 Índices de perda de massa específica aparente

Observa-se, na Figura 20, que entre junho de 2013 e janeiro de 2014 houve redução da massa específica aparente (ρ) do milho armazenado em todas as seis propriedades familiares, com valores variando de 813 a 723 kg m⁻³. Os valores médios de ρ nos quatro períodos de coleta foram 786, 771, 749 e 724 kg m⁻³, respectivamente. Mostra-se, na Figura 21, a redução no valor da massa específica aparente entre as coletas inicial e final para cada um dos produtores. Na maioria dos casos a redução no valor de ρ foi igual ou superior a 10%, com apenas dois casos em que a redução foi inferior a 5%. O percentual médio de redução na massa específica aparente durante o período de armazenamento foi de 8%. Os valores correspondentes para o segundo ano de observação foram 665 kg m⁻³ \leq ρ \leq 838 kg m⁻³ (Figura 22) e média de 9% de redução da massa específica aparente dos grãos durante o armazenamento (Figura 23).

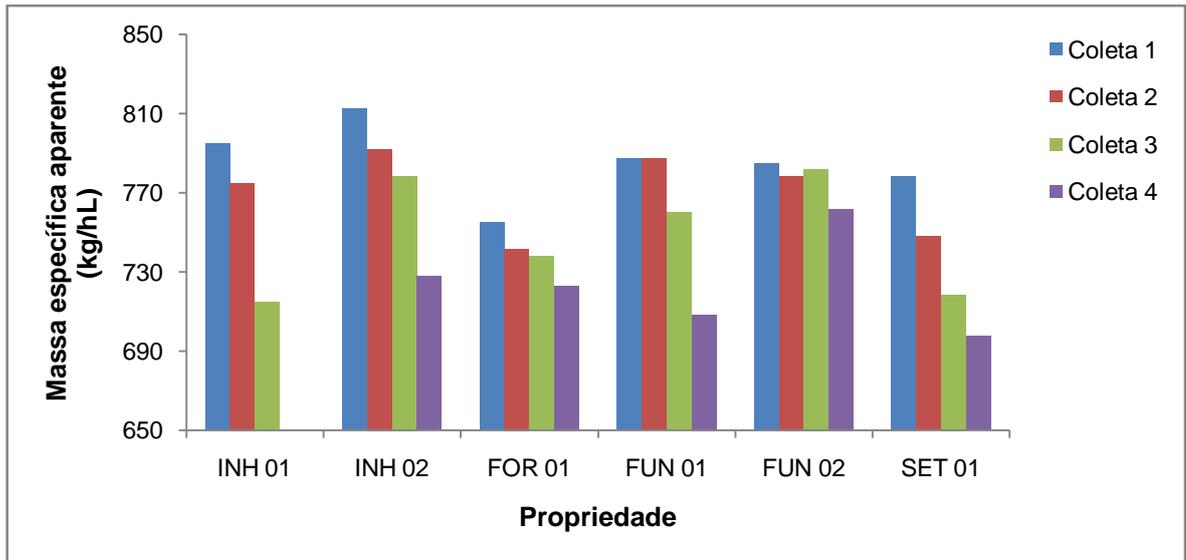


Figura 20 – Massa específica aparente do milho armazenado em seis propriedades familiares entre junho de 2013 e janeiro de 2014.

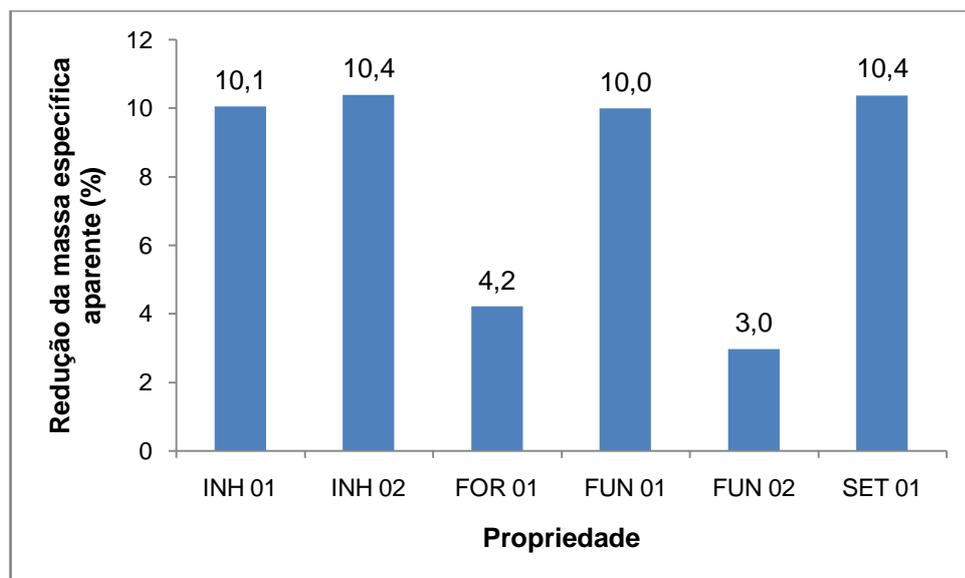


Figura 21 – Redução (%) da massa específica aparente de grãos de milho durante o armazenamento entre junho de 2013 e janeiro de 2014.

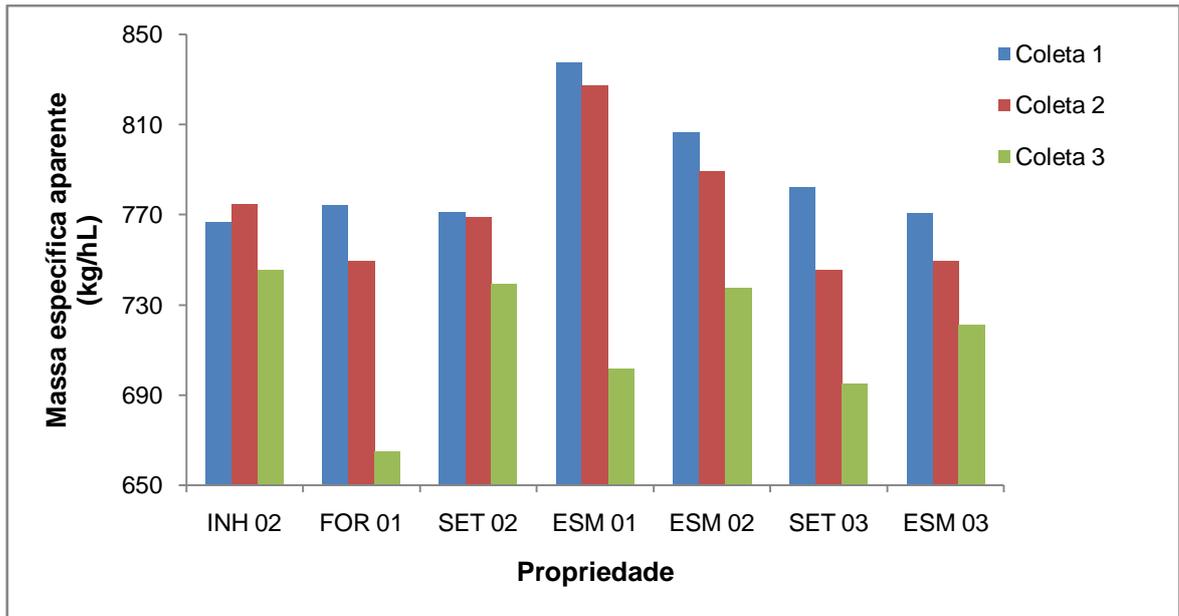


Figura 22 - Massa específica aparente do milho armazenado em sete propriedades familiares entre julho e novembro de 2014.

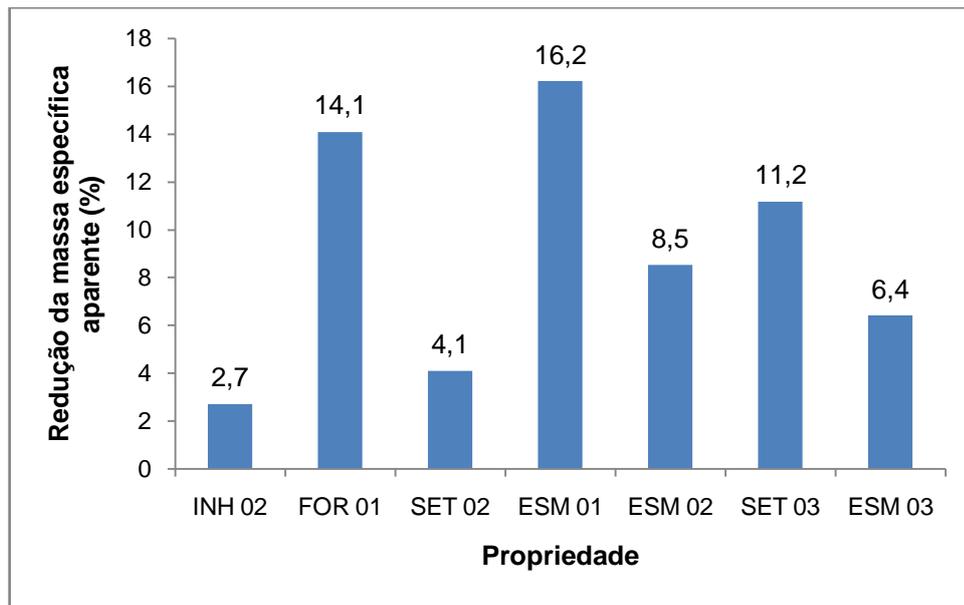


Figura 23 - Redução (%) da massa específica aparente de grãos de milho durante o armazenamento entre julho e novembro de 2014.

Usualmente, o aumento do grau de infestação ao longo do armazenamento está associado à redução da massa específica aparente, como se pode inferir comparando-se as Figuras 16 e 20 e as Figuras 17 e 22. Observe-se que, no primeiro período, as propriedades SET 01 e INH 02 (Figura 16)

apresentaram os maiores índices de infestação por insetos praga e também a maior redução de massa específica, com valor de 10,4% (Figura 21). No entanto, o percentual de redução de ρ entre o início e o fim do armazenamento não refletiu inteiramente o aumento no grau de infestação, principalmente entre junho de 2013 e janeiro de 2014, como é o caso da propriedade FUN 02, que apresentou elevado índice de infestação (27,5%), mas sua redução de massa específica foi a menor observada, ou seja, 3%. Entretanto, na segunda etapa do experimento, observa-se que maiores graus de infestação resultaram em maior redução de massa específica aparente, como mostram as Figuras 17 e 23. Na propriedade ESM 03 observou-se o maior dano por insetos, com índice de 52,5%, e também a maior redução de massa específica, ou seja, 16,2%.

Os resultados aqui observados quanto à relação entre nível de infestação e redução na massa específica aparente também foram constatados por outros pesquisadores. Almeida Filho et al. (2002) avaliaram diferentes cultivares de milho infestados com *S. zeamais* e *S. oryzae*, ao longo de 180 dias de armazenamento, e afirmaram que as perdas de massa estão correlacionadas com o aumento do número de insetos. Foram observadas reduções de massa específica aparente de 14% e 15%, provocadas por *S. oryzae* e *S. zeamais*, respectivamente. Resultados similares foram relatados por Caneppele et al.(2003), Alencar et al. (2011) e Antunes et al. (2011). Além dos danos causados por insetos praga, o elevado nível de perdas observado no presente trabalho pode ter sido decorrente de diversos outros fatores, principalmente danos físicos que ocorrem durante as operações de colheita, transporte e armazenagem e até mesmo pela respiração dos grãos (Smirdele et al., 2003).

4.2.3 Massa de 1000 grãos

Nas Figuras 24 e 25 são apresentados os valores da massa de 1000 grãos (m_{1000} , kg) de milho armazenado em propriedades familiares, ao longo dos períodos de junho/2013 a janeiro/2014 e julho a novembro/2014, respectivamente, com coletas realizadas em intervalos de dois meses.

Os resultados obtidos no primeiro período avaliado revelaram redução de massa ao longo do armazenamento, exceto nas propriedades FOR 01 e FUN 02

(Figura 24). A massa de 1000 grãos das amostras analisadas variou entre 215,61 e 335,08 g, com percentuais de redução ao longo do armazenamento de 5,8%, 3,1%, 9,4% e 4,7%, nas propriedades INH 01, INH 02, FUN 01 e SET 01, respectivamente.

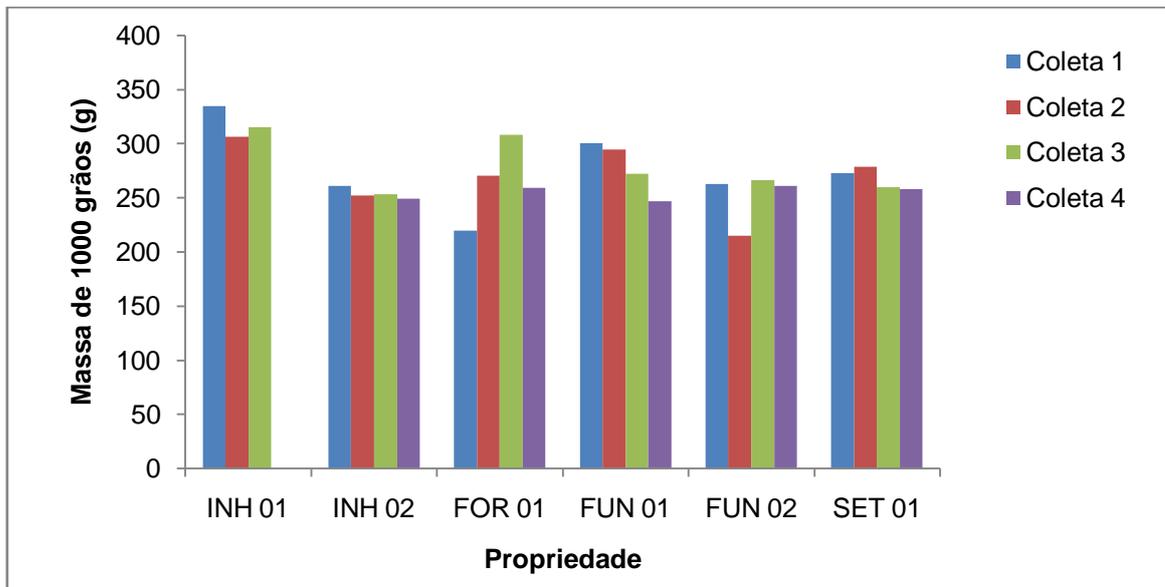


Figura 24 – Massa de 1000 grãos (g) de milho armazenados em paióis de produtores familiares durante o período de junho de 2013 a janeiro de 2014.

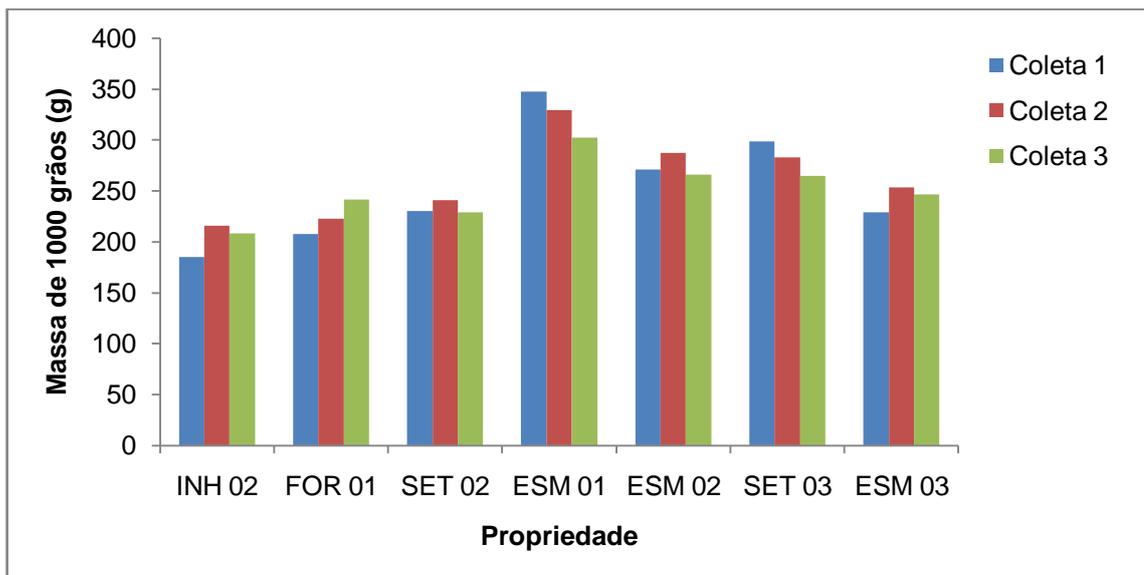


Figura 25 - Massa de 1000 grãos (g) de milho armazenados em paióis de produtores familiares durante o período de julho a novembro de 2014.

Na segunda etapa do experimento, reduções significativas na massa de 1000 grãos foram as exceções, ocorrendo apenas nas propriedades ESM 01 (13,0%) e SET 03 (11,3%), respectivamente (Figura 25). A massa de 1000 grãos das amostras analisadas variou no intervalo $185,05 \text{ g} \leq m_{1000} \leq 347,85 \text{ g}$. Marcondes (2012) analisou três híbridos de milho em dois locais distintos, Guarapuava – PR e Sete Lagoas – MG, e encontrou resultados próximos ao deste trabalho, com massa de 1000 grãos variando entre 236,56 e 390,94 g.

Antunes et al. (2011) armazenaram amostras de 600 g de milho por 120 dias e observaram redução de 13% na massa em função do ataque de insetos. No presente trabalho a associação entre redução de massa e grau de infestação ficou evidenciada na propriedade ESM 01, no segundo ano da pesquisa (Figura 23), em que se verificou que o maior percentual de infestação, 53%, resultou em 13% de redução de massa. Entretanto, Paraginski et al. (2015), ao analisarem amostras de milho produzidas em Santo Augusto, RS, e armazenadas em diferentes temperaturas ao longo de 12 meses, observaram redução de massa em temperaturas mais elevadas e ganho de massa em temperaturas mais amenas. Esse comportamento foi atribuído a alterações do teor de água.

Catão et al. (2010) avaliaram amostras de 17 variedades de milho crioulo coletadas em dois períodos distintos no município de Porteirinha, MG, e observaram que a massa de 1000 grãos variou nos intervalos $149,0 \text{ g} \leq m_{1000} \leq 385,3 \text{ g}$ e $114,1 \text{ g} \leq m_{1000} \leq 382,7 \text{ g}$, nos respectivos períodos de avaliação. Uma mesma variedade apresentou a menor massa de 1000 grãos nas duas avaliações, com redução de 24%, valor consideravelmente mais elevado que os obtidos no presente trabalho. Desta forma, os autores verificaram que a massa de 1000 grãos é um parâmetro que permite avaliar a qualidade final do produto armazenado, bem como o rendimento final da cultura.

4.3 Avaliação da sanidade dos grãos de milho

4.3.1 Incidência de grãos ardidos

O número e a massa de grãos ardidos encontram-se nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Observou-se que todas as amostras, quando positivas para

grãos ardidos, apresentaram incidência abaixo de 5%, sendo esse valor considerado o limite máximo para que um lote de milho não seja classificado como “fora de tipo” (MAPA, 2011).

Tabela 9: Percentual de grãos ardidos (% N.G.A) e massa relativa dos grãos ardidos (% M.G.A) em amostras de milho coletadas em paióis de produtores familiares no período de junho/2013 a janeiro/2014.

Propriedade	Coleta							
	1		2		3		4	
	N.G.A.	M.G.A.	N.G.A.	M.G.A.	N.G.A.	M.G.A.	N.G.A.	M.G.A.
INH 01	0,05	0,05	0,16	0,15	0,06	0,07	*	*
INH 02	0,45	0,36	0,30	0,21	0,32	0,21	0,35	0,29
FOR 01	0,11	0,15	0,00	0,00	0,10	0,10	0,03	0,04
FUN 01	0,75	0,71	0,54	0,51	0,04	0,02	0,13	0,08
FUN 02	0,00	0,00	0,17	0,12	0,04	0,02	0,00	0,00
SET 01	0,44	0,32	0,25	0,22	0,24	0,26	0,41	0,37

* Ausência de amostra.

Tabela 10: Percentual de grãos ardidos (% N.G.A) e massa relativa dos grãos ardidos (% M.G.A) em amostras de milho coletadas em paióis de produtores familiares no período de julho a novembro/2014.

Propriedade	Coleta					
	1		2		3	
	N.G.A.	M.G.A.	N.G.A.	M.G.A.	N.G.A.	M.G.A.
INH 02	0,00	0,00	0,04	0,20	0,04	0,40
FOR 01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SET 02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ESM 01	0,00	0,00	0,04	0,02	0,00	0,00
ESM 02	0,00	0,00	0,14	0,12	0,02	0,02
SET 03	0,06	0,03	0,00	0,00	0,03	0,02
ESM 03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

De todas as 44 amostras analisadas detectou-se incidência de grãos ardidos em 27 delas (61%), com níveis entre 0,03% e 0,75% e entre 0,02% e 0,14%, no primeiro e no segundo ano da pesquisa, respectivamente. De acordo com o MAPA (2011), Tabela 4, as amostras são consideradas do Tipo 1 quando apresentam incidência de grãos ardidos (% N.G.A.) inferior a 1%. Comportamento semelhante foi verificado com relação ao percentual, em massa, de grãos ardidos,

que variou entre 0,02% e 0,71% para o primeiro ano de coleta e entre 0,02% e 0,40% para o segundo ano.

Marcondes (2012) analisou três híbridos de milho em Guarapuava, PR e Sete Lagoas, MG, em duas épocas distintas, e também obteve médias de número e massa de grãos ardidos inferiores a 5%. O autor atribuiu o resultado à colheita antecipada, mostrando que essa prática pode auxiliar na manutenção da qualidade do grão, podendo reduzir a incidência de grãos ardidos.

Entretanto, Duarte et al. (2009) avaliaram a incidência de grãos ardidos em 24 híbridos de milho com e sem aplicação de fungicida. Os resultados apontaram para elevada incidência de grãos ardidos. Nas amostras de milho sem aplicação de fungicidas a incidência variou de 4,5% a 31,0%, valores que ultrapassam os limites estabelecidos para comercialização dos grãos. Apenas um híbrido ficou abaixo do limite de 5%. Porém, as amostras com aplicação de fungicida apresentaram incidência de 1,5% a 17,2%, mostrando uma redução quando comparadas com as amostras não tratadas. As médias totais obtidas foram de 13,0% e 8,4%, nas amostras sem e com aplicação de fungicida, respectivamente. Em função do elevado número de grãos ardidos nas amostras, os autores ressaltaram a importância da utilização de fungicidas nas práticas agrícolas a fim de reduzir a infecção e melhorar a qualidade dos grãos. Os grãos ardidos, além de causarem perdas econômicas, estão associados a doenças em seres humanos, e embora as amostras dos produtores familiares deste trabalho não tenham apresentado altos índices de grãos ardidos, os produtores não aplicaram nenhum tipo de fungicida, conforme mostra a Tabela 1A (Apêndice), o que é preocupante. Segundo Lanza et al. (2012) deve-se considerar o tipo de fungicida, o número de aplicações, a cultivar e a época de plantio.

Costa et al. (2014) avaliaram amostras de 13 linhagens e de 25 híbridos de milho e constataram que a incidência e a massa de grãos ardidos foram relativamente baixas, inferiores a 5%. Os autores compararam também amostras de milho bem e mal empalhadas, e observaram que as espigas mal empalhadas apresentaram maior incidência de grãos ardidos que aquelas bem empalhadas.

4.3.2 Identificação de fungos

O percentual de grãos ardidos com ocorrência de fungos patogênicos variou de 0 a 100% nos dois períodos avaliados (Tabelas 11 e 12). Houve incidência de *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Stenocarpella* nas 27 amostras analisadas.

Tabela 11: Frequência da incidência de grãos ardidos contendo fungos patogênicos em grãos de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de junho/2013 a janeiro/2014.

Prop.	<i>Fusarium</i> spp.				<i>Penicillium</i> spp.				<i>Arpergillus</i> spp.				<i>Stenocarpella</i> spp.			
	Coleta															
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
INH 01	100,	100	100	**	0	20	0	**	0	0	0	**	0	0	0	**
INH 02	90,9	93,8	87,5	100	18,2	12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FOR 01	100	*	100	100	0	*	0	0	0	*	0	0	0	*	0	0
FUN 01	100	100	100	83,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FUN 02	*	100	100	*	*	0	0	*	*	0	0	*	*	0	100	*
SET 01	81,8	83,3	83,3	75	27,3	0	33,3	20,8	27,3	0	0	4,2	0	0	0	25

* A amostra não apresentou incidência de grãos ardidos.

** Ausência de amostra.

Tabela 12: Frequência da incidência de grãos ardidos contendo fungos patogênicos em grãos de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de julho a novembro/2014.

Prop.	<i>Fusarium</i> spp.			<i>Penicillium</i> spp.			<i>Arpergillus</i> spp.			<i>Stenocarpella</i> spp.		
	Coleta											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
INH 02	*	50	50	*	50	0	*	0	0	*	0	0
FOR 01	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
SET 02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ESM 01	*	100	*	*	0	*	*	0	*	*	0	*
ESM 02	*	100	0	*	0	100	*	0	0	*	0	0
SET 03	50	*	100	50	*	0	0	*	0	0	*	0
ESM 03	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* A amostra não apresentou incidência de grãos ardidos.

Fungos do gênero *Fusarium* foram os principais patógenos associados aos grãos ardidos, incidindo em praticamente todas as amostras, com ocorrência

de 50 a 100%, exceto naquela referente a 3ª coleta na propriedade ESM 02 (2º ano). Em termos quantitativos, fungos do gênero *Penicillium* vêm a seguir, tendo sido observados em oito amostras que apresentaram incidência de grãos ardidos e sua ocorrência variou de 18,2% a 100%. As espécies de *Aspergillus* foram encontradas em apenas duas amostras de milho provenientes da mesma propriedade (SET 01), com incidência de 27,3% e 4,2%, nas coletas 1 e 4, respectivamente. O gênero *Stenocarpella* também apresentou pouca ocorrência. Sua presença foi identificada somente em duas amostras, com incidência de 25% e 100%.

A incidência de fungos em grãos assintomáticos no primeiro e segundo ano da pesquisa encontra-se nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. Pode-se notar que, assim como nos grãos ardidos, espécies do gênero *Fusarium* foram as preponderantes, com presença em todas as amostras analisadas e média de contaminação de 66% no primeiro e de 47,2% no segundo período. No primeiro ano de pesquisa as contaminações variaram entre 23% e 95%, e no segundo ano entre 6% e 69%. Fungos do gênero *Penicillium* foram observados em 22 amostras no primeiro ano, com incidência variando de 1% a 25%, e em 16 amostras no segundo ano, com variação entre 1% e 21%. As espécies de *Aspergillus* ocorreram em quatro e cinco amostras, no primeiro e no segundo ano, respectivamente, com variação entre 1% e 6% no primeiro, e 1% e 3% no segundo ano. Fungos do gênero *Stenocarpella* foram identificados em apenas quatro amostras no segundo ano da pesquisa, com contaminação variando de 1% a 4%.

Normalmente, a incidência de fungos nos grãos ocorre devido a fatores que favorecem a infecção da espiga, como injúrias causadas por insetos, clima favorável e mau empalhamento (Duarte et al., 2009). Além da infestação por insetos praga, a alta incidência de fungos pode estar relacionada também à escassez de chuva, que favorece a dispersão desses patógenos no ar (Denti e Reis, 2003). Observa-se, na Tabela 8, que os períodos mais chuvosos (novembro, dezembro e janeiro/2012 e outubro, novembro e dezembro/2013) ocorreram na fase de crescimento e desenvolvimento da planta, com precipitação média mensal inferior a 300 mm, mostrando que não houve excesso de chuva.

Tabela 13: Frequência da incidência de fungos patogênicos em grãos sadios de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de junho/2013 a janeiro/2014.

Propriedade	<i>Fusarium</i> spp.				<i>Penicillium</i> spp.				<i>Arpergillus</i> spp.			
	Coleta											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
INH 01	87	84	94	**	3	8	6	**	0	0	1	**
INH 02	78	93	23	51	17	0	2	9	0	0	0	0
FOR 01	95	64	75	56	10	13	1	10	1	0	0	0
FUN 01	78	58	63	44	12	25	1	4	0	0	0	0
FUN 02	43	46	46	41	5	13	4	3	0	0	0	0
SET 01	70	82	74	73	7	3	3	13	6	0	0	2

** Ausência de amostra.

Tabela 14: Frequência da incidência de fungos patogênicos em grãos sadios de milho coletados em paióis de propriedades familiares no período de julho a novembro/2014.

Propriedade	<i>Fusarium</i> spp.			<i>Penicillium</i> spp.			<i>Arpergillus</i> spp.			<i>Stenocarpella</i> spp.		
	Coleta											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
INH 02	50	50	22	2	6	1	2	2	0	0	0	0
FOR 01	54	58	30	21	9	12	0	0	3	0	0	0
SET 02	62	66	34	2	7	0	0	2	0	0	0	0
ESM 01	57	41	6	0	1	0	0	1	0	0	1	0
ESM 02	32	63	33	4	2	1	0	0	0	0	0	0
SET 03	55	44	66	11	8	5	0	0	0	0	0	1
ESM 03	69	53	47	1	9	0	0	0	0	4	1	0

Segundo Ferrari Filho (2011), os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* contaminam os grãos depois da colheita e têm a capacidade de viver associados a grãos com baixo teor de água. No presente trabalho, verificou-se que as espécies de *Fusarium* foram capazes de colonizar os grãos mesmo com baixo teor de água e em condições de armazenamento (Figuras 18 e 19).

Resultados semelhantes ao deste trabalho têm sido encontrados na literatura. De acordo com Ramos et al. (2010), a incidência de *Fusarium* e *Penicillium* como os fungos mais presentes nos grãos, seguidos de *Aspergillus* e *Stenocarpella* parece ser padrão para o milho brasileiro. Outra afirmação que possivelmente pode explicar a alta frequência de *Fusarium* nos grãos de milho é que um microrganismo que se apresenta em maior número ou maior adaptação ao substrato tem vantagem sobre os demais, pois os fungos possuem um

antagonismo passivo em que o crescimento é inibido pela competição do espaço e nutrientes fundamentais ao desenvolvimento. Nesse sentido, o *Fusarium* é um forte competidor em relação ao *Aspergillus* (Motta et al., 2015).

Abreu et al. (2013) analisaram três cultivares de milho, em diferentes épocas de colheita, no município de Sete Lagoas, MG, e encontraram níveis elevados de incidência de *Fusarium* em todas as amostras analisadas, com variação entre 30,7% e 100%. Concluíram que o atraso na colheita influenciou no aumento da incidência de grãos ardidos. A incidência de fungos tanto em grãos ardidos quanto nos assintomáticos revelou que houve elevada ocorrência de *Fusarium* e que as espécies do gênero *Stenocarpella* apresentaram maior ocorrência nos grãos ardidos. Esses resultados são similares aos obtidos no presente trabalho, em que se observou elevada ocorrência de *Fusarium* spp, fungos que podem estar presentes tanto nos grãos ardidos quanto nos grãos assintomáticos (Abreu et al., 2013). Segundo Juliatti et al. (2007) e Marcondes (2012), as podridões das espigas e os grãos ardidos são causados principalmente por fungos do gênero *Stenocarpella*. Sendo assim, pode-se relacionar a baixa incidência desse fungo com a baixa incidência de grãos ardidos encontradas neste trabalho.

Para Silva et al. (2011) são necessárias medidas de controle eficaz para redução da incidência de fungos no campo e, conseqüentemente, da incidência de grãos ardidos e da produção de micotoxinas. Ao avaliarem 20 cultivares de milho com aplicação de inseticidas, em Sete Lagoas, MG, verificaram a prevalência de *Fusarium* spp. em relação aos demais fungos encontrados. As médias de contaminação foram de 91,0%, 4,3% e 2,0%, para *Fusarium* spp., *Stenocarpella* spp e *Penicillium* spp., respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, evidenciando os principais gêneros de fungos encontrados nos grãos de milho.

Lanza et al. (2012) analisaram amostras de milho com diferentes aplicações de fungicidas e também constataram que fungos do gênero *Fusarium* foram os principais patógenos associados aos grãos, independente se ardidos ou assintomáticos, seguidos de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp.

Diferindo dos resultados aqui apresentados, Stefanello et al. (2012) avaliaram amostras de milho em duas épocas de semeadura, safra e safrinha, nos municípios de Dourados e Rio Brillhante, MS. Os resultados apontaram maior

incidência de *Penicillium* spp. nas duas épocas de semeadura, seguido de *Fusarium* spp. De acordo com aqueles autores, a época de semeadura e o uso de fungicidas durante o cultivo do milho não influenciaram na incidência de *Aspergillus* e *Penicillium*, porém tiveram efeito sobre a ocorrência de *Fusarium*, resultando em menor incidência desse fungo. A alta incidência de *Fusarium* apresentada neste trabalho pode estar relacionada a não utilização de fungicidas pelos produtores. Desta forma, os resultados mostram que o controle químico pode minimizar a incidência de *Fusarium*, porém, outras estratégias para controle dos fungos devem ser utilizadas, como uso de cultivares resistentes e colheita precoce.

4.4 Análises de micotoxinas

4.4.1 Aflatoxinas totais

Apresenta-se, nas Tabelas 15 e 16, resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade, da época das coletas e da interação entre esses dois fatores sobre o teor de aflatoxinas totais nos dois períodos de estudo, respectivamente. Observa-se que ambos os fatores, assim como sua interação, foram significativos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 15: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de aflatoxinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre junho/2013 e janeiro/2014.

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	Sig.
Propriedade	5	364,3536	72,8707	379,192	0,0000*
Coleta	3	97,8976	32,6325	169,807	0,0000*
Produtor X coleta	14	380,8949	27,2068	141,574	0,0000*
Resíduo	23	4,4200	0,1922		
CV(%)	8,91				
Total	45	847,5661			

* Significativo em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 16: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de aflatoxinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre julho e novembro/2014.

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	Sig.
Propriedade	6	3193,0045	532,1674	385,551	0,0000*
Coleta	2	1328,5235	664,2618	481,252	0,0000*
Produtor X coleta	12	7014,6913	584,5576	423,507	0,0000*
Resíduo	21	28,9858	1,3803		
CV(%)	19,11				
Total	41	11565,2053			

* Significativo em nível de 5% de probabilidade.

Os teores de aflatoxinas totais em amostras de milho coletadas no primeiro (junho/2013 a janeiro/2014) e no segundo (julho a novembro de 2014) período de estudo, estão apresentados nas Tabelas 17 e 18. Os teores de aflatoxinas totais das amostras de referência ($8,84 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $8,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram comparáveis aos valores padrão ($11,04 \pm 3,24 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $9,6 \pm 1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$) validando a exatidão e a precisão da metodologia de imunoafinidade.

Observou-se que 100% das amostras analisadas no primeiro ano encontravam-se contaminadas por aflatoxinas, com níveis variando de 2,5 a 21,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e média total de contaminação de 4,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Apesar de todas as amostras estarem contaminadas, apenas uma, correspondente a 4ª coleta na propriedade SET 01 (Tabela 17) encontrava-se acima do limite de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ estabelecido pela ANVISA (2011). Esse resultado compromete o consumo desse milho, pois a aflatoxina pode causar sérios danos à saúde. O milho armazenado pelo produtor INH 01 apresentou o nível mais baixo de contaminação por aflatoxinas na 1ª coleta, apresentando aumento conforme o período de armazenamento. Houve aumento significativo, porém não gradual, da contaminação por aflatoxinas totais em função do armazenamento apenas para o milho armazenado nas propriedades INH 01 e FOR 01. Esse resultado também pode ser observado na propriedade SET 01, porém essa apresentou o nível mais alto de contaminação com teores de 21,50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na 4ª coleta, diferindo estatisticamente das demais propriedades com média total de 11,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 17: Aflatoxinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em paióis de propriedades familiares da região Central de Minas Gerais (junho/13 a janeiro/14).

Propriedade	Aflatoxinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$)								Médias	
	Coleta									
	1	2	3	4						
INH 01	2,50	Bb	4,55	Aab	4,05	Aa	*			3,70 b
INH 02	3,85	Ab	4,40	Aab	2,55	Bb	3,40	ABc		3,55 b
FOR 01	3,10	Bb	3,35	Bb	3,35	Bab	4,85	Ab		3,66 b
FUN 01	3,45	Bb	4,75	Aa	2,80	Bab	3,25	Bc		3,56 b
FUN 02	3,65	ABb	4,55	Aab	3,15	Bab	3,35	ABc		3,67 b
SET 01	15,00	Ba	4,75	Ca	2,95	Dab	21,50	Aa		11,05 a

Valores seguidos de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* Ausência de amostra.

Tabela 18: Aflatoxinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em paióis de propriedades familiares da região Central de Minas Gerais (julho a novembro/14).

Propriedade	Aflatoxinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						Médias
	Coleta						
	1	2	3				
INH 02	0,0	Ac	0,24	Ad	0,0	Aa	0,08 e
FOR 01	18,0	Aa	13,0	Bb	1,75	Ca	10,92 b
SET 02	9,70	Ab	0,30	Bd	0,0	Ba	3,33 c
ESM 01	0,04	Ac	0,07	Ad	0,20	Aa	0,10 de
ESM 02	0,11	Ac	0,0	Ad	1,70	Aa	0,60 de
SET 03	0,12	Bc	77,0	Aa	0,0	Ba	25,70 a
ESM 03	0,50	Bc	6,25	Ac	0,13	Ba	2,29 cd

Valores seguidos de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No segundo ano da pesquisa observou-se incidência de aflatoxinas totais em 76% das amostras, ou seja, em 16 das 21 analisadas. Os níveis variaram entre 0 e $77,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, com média total de contaminação de $6,15 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabela 18). Verificou-se que o milho armazenado no paiol da propriedade SET 03 apresentou o maior teor de aflatoxinas, $77,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor que ultrapassa consideravelmente o limite máximo tolerado para essa micotoxina ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). O nível mais baixo de aflatoxinas foi encontrado na amostra do produtor ESM 01. Não foi possível inferir, para cada uma das sete propriedades, qualquer relação entre nível de contaminação por aflatoxinas e período de armazenamento. Nas

propriedades SET 02 e SET 03, por exemplo, os níveis de contaminação são reduzidos de $9,70 \mu\text{g kg}^{-1}$ (1ª coleta) e $77 \mu\text{g kg}^{-1}$ (2ª coleta) para zero, na 3ª coleta, respectivamente.

De todas as 44 amostras analisadas durante os dois anos de pesquisa, 39 (88,6%) apresentaram contaminação por aflatoxinas, sendo que apenas duas (4,5%) ultrapassaram o limite máximo tolerado para consumo ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Apesar de as aflatoxinas serem, normalmente, produzidas no armazenamento, os resultados encontrados podem ser, provavelmente, explicados por condições não favoráveis ao desenvolvimento dos fungos produtores dessas micotoxinas nos períodos avaliados. O teor de água é um dos fatores que favorecem esse crescimento e desenvolvimento e, como pode ser observado nas Figuras 18 e 19, esses teores encontravam-se abaixo do limite de 14,5% (b.u.) (Brasil, 1976). Christensen e Kaufmann (1976) afirmam que as melhores condições para o crescimento de *A. flavus* em grãos correspondem a teores de água em equilíbrio com umidades relativas entre 85% e 90%. Em cereais como trigo, milho, sorgo e arroz, essas condições correspondem a teores de água entre 18,5% e 20,0% b.u.

Assim como no presente trabalho, Ferreira et al. (2010) encontraram baixa ocorrência de aflatoxinas em grãos de milho armazenados em paióis de produtores familiares em três municípios (Funilândia, Esmeraldas e Pedro Leopoldo) de Minas Gerais. Das 40 amostras analisadas, apenas duas apresentaram contaminação por aflatoxinas, com níveis de 0,91 e $7,85 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os autores ressaltaram que a dificuldade de se ter uma amostragem homogênea no armazenamento de milho em espigas, pode ser fator relevante para a detecção da presença de aflatoxinas.

Bento et al. (2012) avaliaram 84 amostras de grãos de milho, provenientes de diversas unidades armazenadoras localizadas nos municípios das regiões norte, sul, leste e oeste do Mato Grosso. Os resultados mostraram 21,4% de contaminação, correspondendo a 18 amostras positivas para aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2). Os níveis variaram de 1 a $84,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, valores similares aos encontrados neste trabalho, ou seja, teores de aflatoxinas acima do limite estabelecido em algumas amostras.

Ferrari Filho (2011) analisou amostras de milho armazenado ao longo de nove meses em silos secadores em Eldorado do Sul, RS, e detectou contaminação por aflatoxinas em todas elas. Entretanto, Pezzini et al. (2005)

obtiveram resultados diferentes dos mencionados anteriormente em propriedades rurais localizadas em Erebangó e Getúlio Vargas, RS. Ao analisarem amostras de milho armazenadas em dois tipos de silo, com e sem controle de temperatura e de aeração, no início do armazenamento e depois de 113 dias, verificaram a incidência de aflatoxina B1 em apenas duas amostras do mesmo silo. Ambas as amostras apresentaram contaminação de $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ do início ao fim do armazenamento. As temperaturas em ambos os silos permaneceram abaixo das ideais para o desenvolvimento dos fungos, o que explica o fato dos níveis se manterem inalterados. Esses resultados diferem dos apresentados no presente trabalho, indicando que boas condições de armazenamento são essenciais para parar ou retardar o desenvolvimento de fungos.

Santin et al. (2009) analisaram a incidência de aflatoxinas em três lavouras de milho cultivadas em Passo Fundo, RS, e nos grãos armazenados em silos por 112 dias. Foram encontradas aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) tanto na colheita quanto no armazenamento, com níveis variando de 1 a $192 \mu\text{g kg}^{-1}$. Nesse caso, embora o armazenamento tenha sido em silos, ou seja, com melhor controle das condições externas, esse fato não impediu o desenvolvimento de fungos produtores dessas micotoxinas.

Rocha (2010) analisou a ocorrência de aflatoxinas em 200 amostras de grãos de milho provenientes de São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Bahia e obteve resultados diferentes daqueles obtidos no presente trabalho. Houve contaminação por aflatoxinas B1 em 21 (10,5%), por B2 em sete (3,5%) e por G1 e G2 em apenas uma amostra (0,5%). O autor relacionou a baixa ocorrência de aflatoxinas com a elevada incidência do fungo *F. verticillioides*, uma vez que esses fungos podem apresentar uma relação de antagonismo passivo.

No presente trabalho, embora em apenas duas amostras as concentrações de aflatoxinas estivessem acima do limite máximo estabelecido, a elevada ocorrência de aflatoxinas merece atenção, pois a maioria dos produtores familiares utiliza esses grãos para consumo próprio e para alimentação de animais.

4.4.2 Fumonisinas totais

Apresenta-se, nas Tabelas 19 e 20, resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade, da época da coleta e da interação entre esses dois fatores sobre o teor de fumonisinas totais nos dois períodos de estudo, respectivamente. Observa-se que ambos os fatores, assim como sua interação, foram significativos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 19: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de fumonisinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre junho/2013 e janeiro/2014.

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	Sig.
Propriedade	5	41,5287	8,3057	168,326	0,0000*
Coleta	3	3,5050	1,1683	23,678	0,0000*
Propriedade X coleta	14	21,8262	1,5590	31,595	0,0000*
Resíduo	23	1,1349	0,0493		
CV(%)	14,37				
Total	45	67,9948			

* Significativo em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 20: Resumo da análise de variância referente aos efeitos da propriedade e da época da coleta sobre o teor de fumonisinas totais em milho armazenado em propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais, entre julho e novembro/2014.

Fontes de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F	Sig.
Propriedade	6	3,4472	0,5745	25,494	0,0000*
Coleta	2	0,1562	0,0781	3,467	0,0500*
Propriedade X coleta	12	2,3460	0,1955	8,675	0,0000*
Resíduo	21	0,4733	0,0225		
CV(%)	21,84				
Total	41	6,4226			

* Significativo em nível de 5% de probabilidade.

Os teores de fumonisinas totais em amostras de milho coletadas no primeiro (junho/2013 a janeiro/2014) e no segundo (julho a novembro de 2014)

período de estudo, estão apresentados nas Tabelas 21 e 22. Os teores de fumonisinas totais das amostras de referência medidos pela coluna de imunoafinidade ($1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $4,35 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram comparáveis aos valores padrão ($< 3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $4,1 \pm 0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) validando a exatidão e a precisão da metodologia de imunoafinidade.

Tabela 21: Fumonisinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em propriedades familiares da região central de Minas Gerais (junho/13 a janeiro/14).

Propriedade	Fumonisinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Médias
	Coleta				
	1	2	3	4	
INH 01	490 ABbc	865 Ade	150 Bd	*	502 c
INH 02	2.800 Aa	1.600 Bc	2.500 Ab	1.150 Bb	2.012 b
FOR 01	1.030 ABb	645 BCe	1.350 Ac	31 Cc	764 c
FUN 01	2.500 Ba	4.650 Aa	1.045 Dc	1.750 Cb	2.486 a
FUN 02	120 Bc	1.400 Acd	220 Bd	170 Bc	474 c
SET 01	2.250 Ba	2.500 Bb	3.700 Aa	2.650 Ba	2.775 a

Valores seguidos de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* Amostra indisponível.

Tabela 22: Determinação de fumonisinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em milho armazenado em propriedades familiares (julho a novembro/14).

Propriedade	Fumonisinas totais ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Médias
	Coleta			
	1	2	3	
INH 02	1.300 Aa	860 Bab	235 Cc	860 ab
FOR 01	200 Ac	575 Abc	525 Abc	575 bc
SET 02	705 Ab	640 Abc	450 Ac	640 bc
ESM 01	1.750 Aa	1.150 Ba	950 Bab	1.150 ab
ESM 02	595 Abc	625 Abc	640 Aabc	625 bc
SET 03	660 Bbc	530 Bbc	1.050 Aa	530 bc
ESM 03	185 Ac	275 Ac	535 Abc	275 c

Valores seguidos de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observa-se, na Tabela 21, que todas as amostras no primeiro ano do experimento estavam contaminadas por fumonisinas, com níveis variando de 31 (propriedade FOR 01, 4ª coleta) a 4.650 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (propriedade FUN 01, 2ª coleta), e valor médio de 1.537 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Não se observou aumento significativo na contaminação por fumonisinas totais em função do armazenamento em amostras de nenhuma das seis propriedades. Ao contrário, houve redução (propriedades INH 02, FOR 01 e FUN 01) ou manutenção (propriedades INH 01, FUN 02 e SET 01) da contaminação ao final do período de armazenamento.

No segundo ano, assim como no primeiro, observou-se contaminação de fumonisinas totais em todas as 21 (100%) amostras analisadas, com níveis de contaminação variando de 185 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (propriedade ESM 03, 1ª coleta) a 1750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (propriedade ESM 01, 1ª coleta) e média de 682 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A propriedade SET 03 foi a única em que houve aumento na contaminação por fumonisinas no milho armazenado em função do período de armazenamento. Nas demais houve predominância da manutenção dos níveis de contaminação. Esse resultado deve-se, provavelmente, ao fato de as fumonisinas serem micotoxinas produzidas por fungos que se desenvolvem nas condições de campo (Hermans et al., 2006). Desta forma, infere-se que os grãos de milho já se encontravam contaminados com fumonisinas antes do período de armazenamento.

Naturalmente, a alta incidência de fumonisinas nas amostras de milho está associada à alta incidência de fungos do gênero *Fusarium*. De acordo com as análises de identificação de fungos (Tabelas 11 e 12) *Fusarium* foi o gênero que mais acometeu os grãos de milho, com incidência variando de 0 a 100% nos grãos ardidos e com médias acima de 80% nos grãos considerados sadios (assintomáticos).

Embora tenham sido encontradas amostras com altos níveis de contaminação, nenhuma delas superou o limite de 5.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, estabelecido pela ANVISA para milho não processado (Brasil, 2011). Porém, para a União Europeia, o limite desta micotoxina para consumo humano é de 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (European Commission, 2007) e das 44 amostras analisadas no presente trabalho, 19 (43,2%) se encontraram acima desse limite, sendo 15 (34,1%) no 1º e 4 (9,1%) no 2º ano de coleta. Esses resultados podem comprometer a saúde do consumidor, visto que o milho armazenado em propriedades familiares é também utilizado para consumo humano, nas formas de fubá e farinha de milho.

Queiroz et al. (2012) analisaram amostras de milho armazenadas em paióis de 10 propriedades familiares de Minas Gerais, em quatro épocas de coleta, e constataram que todas as 40 amostras se encontravam contaminadas com fumonisinas. Os níveis dessa micotoxina variaram entre 230 e 6.450 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 2.339 $\mu\text{g kg}^{-1}$, resultado superior aos encontrados nesse trabalho, cujas médias foram entre 665 e 1.502 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Tais diferenças podem ser explicadas pelos tipos de paióis, épocas de colheita, condições climáticas e cultivares de milho, que foram distintos nos dois estudos. Porém, os resultados de Queiroz et al. (2012) são similares aos deste trabalho quanto à incidência das fumonisinas, que apresentaram contaminação em 100% das amostras, o que comprova que esta é uma das micotoxinas com maior ocorrência em milho.

O Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria analisou, em 2011, amostras de milho procedentes principalmente da região Sul do Brasil, durante o período de 1996 a 2011, e constatou que das 26.291 amostras analisadas, 76,3% encontravam-se contaminadas por fumonisinas, com média de 1.910 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valor que se aproxima do apresentado no primeiro ano desse trabalho, com média geral de 1.502 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LAMIC, 2011).

Pinto et al. (2007) avaliaram a incidência de fumonisinas B1 na fase de pré-colheita de 36 cultivares de milho e verificaram, também, que todas as amostras apresentaram contaminação, com níveis variando de 2.200 a 7.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, considerados elevados de acordo com os limites tolerados para consumo humano. Ferrari Filho (2011) analisou amostras de grão de milho ao longo de nove meses de armazenamento em silos secadores em Eldorado do Sul, RS, e também detectou contaminação por fumonisinas em todas elas. Barroso (2013) analisou 240 amostras de grãos de milho (transgênicos e convencionais) recém-colhidos, no município de Cruzália, SP. As análises revelaram contaminação por fumonisina B1 em 222 (92,5%) amostras e B2 em 113 (47,1%). Das amostras contaminadas com fumonisina, 71 (29,6%) estavam com teores acima de 2.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esses dados confirmam a alta incidência desta micotoxina e demonstram estar correta a preocupação a respeito dos níveis de fumonisina geralmente encontrados em milho armazenado no Brasil. Outros resultados que comprovam o alto grau de contaminação de milho por fumonisinas são apresentados por Santin et al. (2009), que analisaram a incidência de FB1 e FB2 em três lavouras de milho cultivadas na Universidade de Passo Fundo, RS, com armazenamento em silos

por 112 dias. Todas as amostras analisadas, tanto no período de colheita, quanto ao final do armazenamento estavam contaminadas por fumonisinas.

4.4.3 Zearalenona

A metodologia empregada indicou a presença de traços de zearalenona em todas as amostras de milho, ou seja, o grau de contaminação foi inferior ao limite de detecção, $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 1A – Apêndice), e, portanto, dentro do estabelecido pela legislação brasileira atual de $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ANVISA, 2011). Essas informações indicam que os grãos de milho, provavelmente, já estavam contaminados antes do período de armazenamento, partindo do pressuposto de que os fungos produtores de zearalenona são, normalmente, encontrados no campo, e que as condições ambientais dos locais de armazenamento não foram favoráveis para a produção desta micotoxina.

Queiroz et al. (2012) analisaram amostras de milho armazenadas em paióis de dez propriedades familiares de Minas Gerais, em quatro épocas de coleta e detectaram contaminação por zearalenona em 38 das 40 amostras analisadas. Os níveis encontrados variaram entre 1,8 e $99,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, e não houve indícios de aumento da contaminação durante o armazenamento. Pezzini et al. (2005) analisaram amostras de milho logo após a colheita e depois de 113 dias de armazenamento em dois tipos de silos, com e sem controle de temperatura de aeração, em Erebangó e Getúlio Vargas, RS, e não encontraram zearalenona nas amostras analisadas. Porém, foram encontrados fungos do gênero produtor desta micotoxina, indicando que o controle da temperatura pode ter sido fator imprescindível para evitar sua produção, uma vez que choques térmicos são fatores que propiciam a ocorrência de zearalenona (Pereira e Santos, 2011). Marques et al. (2009) analisaram amostras de milho coletadas em Astorga, PR, durante os períodos de outono/inverno (safrinha) e verão (safra), e não foram detectados quaisquer traços de contaminação por zearalenona. Maziero e Bersot (2010) também informam que estudos realizados no Brasil mostraram baixos índices de contaminação de milho por zearalenona.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

- Todas as amostras analisadas apresentaram infestação por insetos praga, com médias de 13,8% e 13,5% para os dois anos de pesquisa, os níveis ultrapassaram o limite máximo tolerado para comercialização, classificando-os como “Fora de tipo”;
- O teor de água das amostras manteve-se em níveis reduzidos, com valores variando entre 9% e 10,8% b.u. no primeiro período avaliado e entre 8% e 11,8% b.u. no segundo;
- Houve redução de 2,7% a 16,2% na massa específica aparente ao longo dos períodos de armazenamento, comportamento que pode estar associado ao elevado nível de infestação;
- Houve também redução na massa de 1000 grãos, com valores variando até 9,4% e 13,0% no primeiro e segundo períodos avaliados, respectivamente, indicando, também, a perda de qualidade em função da infestação por insetos praga;

- As amostras, quando positivas para grãos ardidos (61%), apresentaram níveis abaixo do limite máximo tolerado de 5%;
- A identificação de fungos revelou prevalência do gênero *Fusarium*, tanto nos grãos ardidos quanto nos assintomáticos, com até 100% de ocorrência, seguido de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Stenocarpella*. Os resultados evidenciaram que *Fusarium* é o fungo que mais acomete o grão de milho;
- As aflatoxinas foram encontradas em 89% das amostras, com níveis variando de 0 a 77,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Dentre as 11 propriedades avaliadas, em apenas três verificaram-se aumentos na contaminação por aflatoxinas ao longo do armazenamento. Apenas duas amostras apresentaram níveis de contaminação acima do limite máximo estabelecido de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$;
- Todas as amostras estavam contaminadas com fumonisinas, mas em nenhuma delas o teor encontrava-se acima do limite máximo estabelecido pela ANVISA, ou seja, 5.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para milho não processado. No entanto, diversas amostras apresentaram contaminação superior ao limite máximo de 1.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ estabelecido pela União Europeia para consumo humano;
- Na avaliação da incidência dos fungos observou-se influência da presença de *Fusarium* nos índices de fumonisinas e, no entanto, o mesmo não ocorreu para as aflatoxinas, cuja presença não pode ser correlacionada à baixa incidência de *Aspergillus*;
- Foram encontrados apenas traços de zearalenona no milho armazenado;

Sendo assim, conclui-se que houve elevada incidência de insetos praga, fungos e fumonisinas nas amostras de milho armazenadas em paióis de produtores familiares na região central de Minas Gerais. O alto índice de infestação causa preocupação, visto que o ataque de insetos proporciona perdas econômicas e nutricionais, além de facilitar a disseminação de fungos. Dessa forma, é relevante enfatizar a necessidade do emprego de métodos de controle de pragas e de boas práticas agrícolas como formas de reduzir os índices de

perda. Os níveis de aflatoxinas presentes no milho, em sua maioria, foram inferiores ao limite máximo estabelecido, porém diversas amostras estavam contaminadas com fumonisinas acima do estabelecido para o consumo humano, o que pode expor os consumidores a riscos de saúde. Monitoramento da ocorrência e formas de mitigação da contaminação são mecanismos que devem ser adotados, visando à boa qualidade sanitária dos grãos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albernaz, W. M.; Cruz, J. C.; Pereira Filho, I. A.; Matrangolo, W. J. R.; Noce, M. A.; Chaves, F. F.; Carvalho, D. O.; Sobrinho, J. G. B. (2010) Concurso de produtividade de grãos na cultura do milho na região Central de Minas Gerais: safra 2009/2010. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 28.; Simpósio Brasileiro sobre a lagarta do cartucho, 4, Goiânia: ABMS, 1 CD-ROM.

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias do Milho: Milho – Brasil – Oferta e demanda do milho do Brasil – 2014. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatistica/oferta_e_demanda> Acesso em 20/09/2014.

Abreu, M. I. A; Costa, R. V., Cota, L. V., Silva, D. D. (2013) Atraso na colheita e incidência de grãos ardidos em cultivares de milho. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/962012/1/Atrasocolheita.pdf>> Acesso em 20/08/2015.

- Alencar, E. R., Faroni, L. R. D'A., Ferreira, L. G., Costa, A. R., Pimentel, M. A. G. (2011) Qualidade de milho armazenado e infestado por *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*. *Engenharia na agricultura*, Viçosa, 19 (1): 9-18.
- Almeida Filho, A. J., Fontes, L. S., Arthur, V. (2002) Determinação da perda de peso do milho (*Zea mays*) provocada por *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*. *Revista Ecosystema* 27 (1): 41-44.
- Almeida, A. V. A. F., Botura, M. B., Abreu, R. D., Bittencourt, T. C. C., Batatinha, M. J. M. (2009) Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no Estado da Bahia. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 76 (3): 353-358.
- Alves, E. N. T. D., Costa, R. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Silva, O. A. (2012) Alternativas de controle para redução de grãos ardidos na cultura do milho. *Anais do XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, 29, Águas de Lindóia. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 587 – 592.
- Antonello, L. M., Muniz, M. B., Brand, S. C., Vidal, M. D., Garcia, D., Ribeiro, L., Santos, V. (2009) Qualidade de sementes de milho armazenadas em diferentes embalagens. *Ciência Rural*, Santa Maria, 39 (7): 2191-2194.
- Antunes, L. E. G., Viebrantz, P. C., Gottardi, R., Donello, R.G. (2011) Características físico-químicas de grãos de milho atacados por *Sitophilus zeamais* durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, 15 (6): 615-620.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 fev. 2011. Seção1, p.66.

- Barroso, V. m. (2013) Microbiota e ocorrência de fumonisinas em diferentes genótipos de milho transgênico (Bt). Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo, 88p.
- Bento, L. F., Caneppele, M. A. B., Albuquerque, M. C. F., Kobayasti, L., Caneppele, C., Andrade, P. J. (2012) Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 71 (1):44-49.
- Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., Vleggaar, R. (1988) Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 743-745.
- Boeira, S. P. (2012) *Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Itaqui – RS, Universidade Federal do Pampa, 101 p.
- BRASIL (1976) Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Abastecimento. Comissão Técnica de Normas e Padrões. Normas de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do milho. Brasília, DF, 12p.
- BRASIL (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- BRASIL (2010) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº4 de 06/01/2010. Especificações para padronização, classificação e comercialização interna do milho. Diário Oficial, Brasília.
- BRASIL (2011) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico do Milho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 246. Seção 1, p. 3-5a.

- Butkeraitis, P. (2003) *Efeitos da fumonisin B₁ em codornas poedeiras (Coturnix coturnix japonica)*. Dissertação (Mestrado em Nutrição animal) – Pirassununga – SP, Universidade de São Paulo, 108p.
- Byaruhanga, Y. B., Atukwase, A. Risk of mycotoxins in sorghum and millet grains. In: TAYLOR, J.; STADING, M. (Ed.). *Traditional grains review*. [S.l: s.n.], (2011). Disponível em: <http://www.sik.se/traditionalgrains/workshop/proceedings/Yusuf_Byaruhanga_proc.pdf> Acesso em 21/11/2014.
- Cancellier, L. L., Afféri, F. S., Adorian, G. C., Rodrigues, H. V. M., Melo, A. V., Pires, L. P. M., Cancellier, E. L. (2011) Adubação orgânica na linha de semeadura no desenvolvimento e produtividade do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 32 (2) : 527-540.
- Caneppele, M. A. B., Caneppele, C., Lázari, F. A., Lázari, S. M. N. (2003) Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47 (4): 625-630.
- Casa, R. T., Reis, E. M., Zambolim, L. (2006) Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. *Fitopatologia Brasileira*, 31 (5): 427 – 439.
- Castro, F. L. F. (2011) *Interação entre fungos toxigênicos (Aspergillus flavus e Fusarium verticillioides) e carunchos (Sitophilus zeamais) em amostras de grãos de milho*. Tese (Doutorado em Microbiologia) – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo, USP, 111 p.
- Catão, H. C. R. M., Costa, F. M., Valadares, S. V., Dourado, E. R., Brandão Junior, D. S., Sales, N. L. P. (2010) Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de milho crioulo produzidas no norte de Minas Gerais. *Ciências Rurais*, Londrina, 40 (10): 2060-2066.

- Chalfoun, S. M.; Batista, L. R. (2003) *Fungos associados a frutos e grãos de café Aspergillus & Penicillium*. Brasília, DF: Embrapa, 69 p.
- Coitinho, R. L. B. C., Oliveira, J. V., Gondim Junior, M. G. C., Câmara, C. A. G. (2006) Efeito Residual de inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. em milho armazenado. *Revista Caatinga*, Mossoró, 19 (2): 183-191.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Conab). 7º Levantamento de grãos - safra agrícola 2014/2015. (2015). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_10_09_22_05_boletim_graos_abril_2015.pdf> Acesso em 28/04/2015.
- Costa, F. D., Verzeletti, F. B., Wagner, R. (2014) Isolamento e Identificação das aflatoxinas B1 e B2 de *Aspergillus parasiticus* em alimentos. *Cadernos da Escola de Saúde*, Curitiba, 11: 65-78.
- Christensen, C. M.; Kaufmann, H. H. (1976) Grain storage: The role of fungi in quality loss. Minneapolis: University of Minnesota Press, 153p.
- Cruz, J. V. S. (2010) *Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na Região de Pirassununga, Estado de São Paulo*. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Pirassununga – SP, Universidade de São Paulo, 88p.
- Cruz, C. S. A. (2013) *Emprego de óleos vegetais e glicerina no controle do gorgulho do milho*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Campina Grande – PB, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, 88 p.
- Damasceno, C. L. (2012) *Potencial de Penicillium citrinum para o controle de Aspergillus niger, agente causal da podridão vermelha do sisal*. Monografia (Graduação em Biologia) – Cruz das Almas – BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, 69p.

- Denti, E. A., Reis, E. M. (2003) Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação dos danos em lavouras de milho do Planalto Médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, 28 (6): 585 – 590.
- Dias, I. E. (2012) *Crescimento micelial e produção de toxinas por fungos de armazenamento associados a grãos de milho sob diferentes níveis de restrição hídrica*. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 58p.
- Dilkin, P., Mallmann, C. A., Santurio, J. M., Hickmann, J. L. (2000) Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de alfatoxinas em híbridos de milho. *Ciência Rural*, 30 (1) : 137-141.
- Duarte, R. P., Juliatti, F. C., Lucas, B. V., Freitas, P. T. (2009) Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 25 (4) : 112-122.
- EMBRAPA. Pereira Filho, I. A.; Cruz, J. C.; Silva, A. R.; Costa, R. V.; Cruz, I. Milho Verde. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fy779fnk02wx5ok0pvo4k3c1v9rbg.html>> Acesso em: 21 de maio de 2015.
- Embrapa Milho e Sorgo (2006) Controle de pragas durante o armazenamento de milho: 84. Sete Lagoas, Minas Gerais.
- European Commission. (2007). Commission Regulation (EC) No. 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *World Mycotoxin Journal*, 1: 209-220.

- Faroni, L. R. D'A., Silva, J.S. (2000) Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: Silva, J.S., *Secagem e armazenagem de produtos agrícolas*. Viçosa, MG: Ed. Aprenda Fácil, p. 371 – 405.
- Ferrari Filho, E. (2011) *Métodos e temperaturas de secagem sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento*. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 95 p.
- Ferreira, D. B. (2006) *Relações entre a variabilidade da precipitação e a produtividade agrícola de soja e milho nas regiões Sul e Sudeste do Brasil*. Dissertação (Mestrado em Meteorologia) – São José dos Campos – SP, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, INPE, 125p.
- Ferreira, D. F. (2010). SISVAR – Sistema de análise de variância. Versão 5.3, Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras, UFLA.
- Ferreira, P.; Queiroz, V. A. V; Alves, G. L. O.; Saraiva, J. S. C.; Conceição, R. R. P; Mendes, S. M.; Costa, R. V.; Guimarães, L. J.; Ribeiro, P. E. A. (2010) Teores de aflatoxinas totais em milho armazenado em paióis da Região Central de Minas Gerais. *Anais do XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, Goiânia, 840-845.
- FIESP (2015) Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. Safra Mundial de Milho 2015/2016 – 3º Levantamento do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Informativo do Departamento de Agronegócio.
- Figueira, E. L. Z.; Coelho, A. R.; Ono, E. Y. S.; Hirooka, E. Y. (2003) Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 24 (2): 359 – 378.
- Food Ingredients Brasil (2009) *As micotoxinas*. Disponível em < www.revista-fi.com > Acesso em 03/05/2015.

- Freire, F. C. O., Vieira, I. G. P., Guedes, M. I. F., Mendes, F. N. P. (2007) *Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal*. 1. ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 48p.
- Freitas, M. B., Ribeiro, J. M. M., Perin, A., Silva Junior, H. R., Silva, A. (2009) Produtividade e incidência de grãos ardidos em híbridos de milho cultivados no Sudoeste de Goiás. *Agrarian*, 2 (4): 73-81.
- Frias, A. G. (2014) *Caracterização de isolados de Fusarium oxysporum f.sp. lactucae obtidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 56 p.
- Galon, L., Tironi, S. P., Rocha, A. A., Soares, E. R., Concenço, G., Alberto, C. M. (2010) Influência dos fatores abióticos na produtividade da cultura do milho. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, 4, (3): 18-38.
- Gasperini, A. M. (2011) *Biocontrole de Fusarium verticillioides em milho*. Monografia (Graduação em Tecnologia em Alimentos) – Francisco Beltrão – PR, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, 55p.
- Gomes, K. R., Amorim, A. V., Ferreira, F. J., Filho, F. L. A., Lacerda, C. F., Gomes-Filho, E. (2011) Respostas de crescimento e fisiologia do milho submetido a estresse salino com diferentes espaçamentos de cultivo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, 15 (4): 365–370.
- Governo de Minas Gerais (2010) Regiões de Planejamento. Disponível em: <<https://www.mg.gov.br/governomg/portal/c/governomg/conheca-minas/geografia/5671-regioes-de-planejamento/69548-as-regioes-de-planejamento/5146/5044>> Acesso em: 13/08/2015.

- Guimarães, C. G., Tavares, W. S., Moreira, C. O., Teixeira, M. F. F., Mahmoud, H. A. F. H., Ribeiro, R. C., Petacci, F. (2010) *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) em grãos de milho com extratos botânicos do cerrado, CD-ROM dos *Anais do XXVIII do Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, Goiânia, GO, Brasil.
- Hermanns, G., Pinto, F. T., Kitazawa, S. E., Noll, I. B. (2006) Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimento*, Campinas, 26 (1):7-10.
- IBGE. Censo Agropecuário - Agricultura Familiar 2006. Comunicação Social, 30 de setembro de 2009. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1466> Acesso em 22 de fevereiro de 2014.
- Jay, J. M. (2005) *Microbiologia de alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 711p.
- Juliatti, F. C., Zuza, J. L. M. F., Souza, P. P., Polizel, A. C. (2007) Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 23 (2): 34-41.
- Kawashima, L. M. (2004) *Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 110p.
- Kawashima, L. M., Soares, L. M. V. (2006) Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 26 (3): 516-521.
- Kuhnem Júnior, P. R.; Stumpf, R.; Spolti, P.; Del Ponte, E. M. (2013) Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, 43 (4): 583 – 588.

LAMIC (Laboratório de Análises micotoxicológicas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Metodologias LAMIC. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/web/?q=node/53>> Acesso em 18 de março de 2015.

LAMIC (Laboratório de Análises micotoxicológicas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Tabelas de resultados 2011. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br>> Acesso em 12 de maio de 2014.

Lanza, F. E., Corrêa, C. L., Costa, R. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Marcondes, M. M., Nicoli, A., Costa, G. M. C., Ramos, T. C. D. A., Moura, L. O. (2012) Eficiência do Controle Químico na Redução da Incidência de Grãos Ardidos em Milho. *Anais do XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, 29, Águas de Lindóia. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 657 – 664.

Lorini, I. (2009) Armazenamento do milho safrinha. *Anais do X Seminário Nacional do milho safrinha*, Rio Verde. Goiás, p. 106 – 121.

Maciel, C. G. (2012) *Fusarium sambucinum* associados a sementes de *Pinus elliotii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle. Dissertação (Mestrando em Engenharia Florestal) – Santa Maria – RS, Universidade de Santa Maria, UFSM, 94 p.

Malmann, A. O., Marchioro, A., Oliveira, M. S., Minetto, L., Wovst, L. R. S., Rauber, R. H., Dilkin, P., Mallmann, C. A. (2013) Dois planos de amostragem para análise de fumonisinas em milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, 43 (3): 551-558.

Mantas, V.M., Liu, Z., Caro, C., Pereira, A. J. S. C. (2015) Validation of TRMM multi-satellite precipitation analysis (TMPA) products in the Peruvian Andes. *Atmospheric Research*, 163: 132 – 145.

- Marcondes, M. M. (2012) *Incidência de podridão de colmo e grãos ardidos em híbridos de milho sob diferentes densidades de plantas e épocas de colheita*. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Guarapuava – PR, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro – PR, 76p.
- Marques, O. J., Vidigal Filho, P. S., Dalpasquale, V. A., Scapim, C. A., Pricinotto, L. F., Machinski Júnior, M. (2009) Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, 31 (4): 667-675.
- Martins, M. K. (2005) *Variabilidade genética de isolados de Fusarium spp. e estudo da interação com a planta hospedeira*. Tese (Doutorado em Agronomia) Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 110 p.
- Matrangolo, W. J. R. (2011) Os agentes de controle biológico e o produtor rural: percepção e potencialidades, 1 CD-ROM dos *Anais do Simpósio de controle biológico - Mudanças climáticas e sustentabilidade: quebra de paradigmas -*: Sociedade Entomológica do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.
- Maziero, M. T., Bersot, L. S. (2010) Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, 12 (1): 89-99.
- Mendes, M. C. (2009) Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a grãos ardidos em híbridos de milho. Tese (Doutorado em Agronomia) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 120 p.
- Mendes, M. C., Pinho, R. G. V., Pinho, E. V. R. V., Faria, M. V. (2012) Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, Guarapuava, 8 (2): 275-292.

- Menezes, J. P.; Lupatini, M.; Antonioli, Z. I.; Blume, E. J.; Manzoni, C. G. (2010) Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 34 (1): 132 – 139.
- Milanesi, P. M. (2012) *Aspectos biológicos da interação Fusarium spp. e Trichoderma spp. em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Santa Maria – RS, Universidade de Santa Maria , UFSM, 133p.
- Minami, L.; Meirelles, P. G.; Hirooka, E. Y.; Ono, E. Y. S. (2004) Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 25 (3) 207-224.
- Monteiro, M. C. P. (2012) *Identificação de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium em solos preservados do cerrado*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Lavras, MG, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 77p.
- Motta, T. P., Frizzarin, A., Martins, T., Miranda, M. S., Arcaro, J. R. P., Ambrósio, L. A., Pozzi, C. R. (2015) Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35 (1): 23 – 28.
- Nascimento, V. R. G., Queiroz, M. R., Marchi, V. C., Aguiar, R. H. (2012) Desempenho de estratégias de aeração de milho armazenado: Fungos e condutividade elétrica. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, 16 (1): 113-121.
- Nicolau, M. C. (2014) *Biocontrole de Fusarium verticillioides em milho e trigo*. Monografia (Graduação em Tecnologia de alimentos) – Londrina – PR, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, 40 p.

- Nogueira, J. H. C. (2009) *Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (Ageratum conyzoides) no crescimento de Aspergillus flavus e da produção de aflatoxina*. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança alimentar e ambiental no Agronegócio) – São Paulo – SP, Instituto Biológico, 73p.
- Oliveira, L. S. F., Koller, F. F. C. (2011) Ocorrência de *Aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim *in natura* e paçocas. *Revista de Ciências Ambientais*, Canoas, 5 (1): 57-68.
- Paes, M. C. D. (2006) Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Circular Técnica, Sete Lagoas, 75: 1-6.
- Paes, M. C. D. (2008) Manipulação da composição química do milho: impacto na indústria e na saúde humana. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Milho/Index.htm> Acesso em 19/01/2015 página mantida pela Infobibos.
- Paraginski, R. T., Rockenbach, B. A., Santos, R. F., Elias, M. C., Oliveira, M. (2015) Qualidade de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, 19 (4): 358-363.
- Pedro, R. O. (2013) *Síntese de novos derivados de quitosana para aplicação como biofungicida contra os fungos Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus*. Dissertação (Mestrado em Química) – São José do Rio Preto – SP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, 93p.
- Pereira, K. C., Santos, C. F. (2011) Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, Brasília, 15 (4): 147-165.
- Pezzini, V., Valduga, E., Cansian, R. L. (2005) Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 64 (1):91-6.

- Pinto, N. F. J. A. (2005) Grãos ardidos em milho. Circular Técnica, Sete Lagoas, 66: 1-6
- Pinto, N. F. J. A. (2007) Reação de cultivares com relação à produção de grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 144, 4p.
- Pozzi, C. R., Arcaro, J. R. P., Arcaro J., Fagundes, H., Correa, B. (2002) Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. *Ciência Rural*, 32(5):901-907.
- Queiroz, V. A. V., Alves, G. L. O., Ferreira, P., Conceição, R. R. P., Mendes, S. M., Costa, R. V., Ribeiro, P. E. A. (2011) Fumonisin incidence in maize stored in family farms cribs in the Central Region of the State of Minas Gerais. *Ciosta Cigr V Conference*, Viena, 34 :116-118.
- Queiroz, V. A. V., Alves, G. L. O., Ferreira, P., Conceição, R. R. P., Guimarães, L. J. M., Mendes, S. M., Ribeiro, P. E. A., Costa, R. V. (2012) Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control*, 28: 83-86.
- Quirino, J. R., Melo, A. P. C., Veloso, V. R. S., Albernaz, K. C., Pereira, J. M. (2013) Resfriamento artificial na conservação da qualidade comercial de grãos de milho armazenados. *Bragantia*, Campinas, 72 (4): 378-386.
- Ramos, C. R. B. A., Brasil, E. M., Geraldine, R. M. (2008) Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivado em três regiões do estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 38 (2): 95-102.
- Ramos, A. T. M., Moraes, M. H. D., Carvalho, R. V., Camargo, L. E. D. (2010) Levantamento da micoflora presente em grãos ardidos e sementes de milho. *Summa Phytopathologica*, 36 (3): 257 -259.

- Reis, T. A., Zorzete, P., Pozzi, C. R., Silva, V. N., Ortega, E., Corrêa, B. (2010) Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 90: 1445-1451.
- Ribeiro, P. E. A., Queiroz, V. A.V., Costa, C. L. S., Costa, R.V. (2013) Validação de métodos para determinação de zearalenona e fumonisinas totais por fluorimetria em amostras reduzidas de milho. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo*, 86.
- Rocha, L. O. (2010) *Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém colhidos e variabilidade das cepas de Fusarium verticillioides e Aspegillus flavus isoladas*. Tese (Doutorado em Microbiologia) – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo, USP, 174p.
- Sandoval, C. M. R. (2010) *Reconocimiento taxonómico preliminar de Fusarium roseum (clasificación pendiente) responsable de la pudrición basal del clavel comercial en la sabana de Bogotá*. Monografia (Graduação em Biologia) – Bogotá, Universidad Militar Nueva Granada, 114 p.
- Santana, M. C. A. (2012) Principais tipos de micotoxinas encontradas nos alimentos de animais domésticos. *Revista eletrônica de veterinária*, 13 (7):1-18.
- Santin, J. A., Reis, E. M., Matsumura, A. T. S., Moraes, M. G. (2004) Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 3 (2): 182-192.
- Santin, J. A., Gutkoski, L. C., Eichelberger, L., Portella, J. A., Durigon, A. (2009) Qualidade microbiológica de grãos de milho armazenados em silos de alambrado e secados com ar natural forçado. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 8 (2): 131-144.

- Santos, J. P. (2008) Controle de Pragas Durante o Armazenamento de Milho. *In: Cruz, J. C.; Karam, D.; Monteiro, M. A. R.; Magalhães, P. C. A cultura do milho*. 1. ed. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p.25-302.
- Silva, D. D.; Costa, R. V. Cota, L. V. (2011) Resistência genética e aplicação de fungicidas para o controle de grãos ardidos. *XI Seminário Nacional de Milho Safrinha*, 509-515.
- Silva, R. R., Theodoro, G. F., Libório, C. B., Pessoa, L. G. A. (2012) Influência da densidade de cultivo de dois genótipos de milho na severidade da mancha de cercospora e no rendimento de grãos na 'safrinha'. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 33 (4) : 1449-1454.
- Silva, F. C.; Chalfoun, S. M.; Batista, L. R.; Santos, C.; Lima, N. (2015) Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção *flavi*: uma revisão. *Revista Ifes Ciência*, 1(1): 18 – 40.
- Siqueira, C. S. (2013) *Transmissão e desempenho de sementes de milho portadoras do complexo Stenocarpella sob condições controladas*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 131p.
- Smiderle, O. J., Gianluppi, D., Mourão Junior, M. (2003) Tratamento e qualidade de sementes de milho durante o armazenamento em Roraima. *Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais*, Curitiba, 1 (4): 75-83.
- Stefanello, J., Bachi, L. M. A., Gavassoni, W. L., Hirata, L. M., Pontim, B. C. A. (2012) Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, 42 (4): 476-481.

- Teixeira, L. C. (2010) Efeitos da zearalenona em leitoas pré-púberes e eficácia de aditivo anti-micotoxina na prevenção da micotoxicose. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curitiba – PR, Universidade Federal do Paraná, UFPR, 101p.
- Turner, P. C., Nikiema, P., Wild, C. P. (1999) Fumonisin contamination of food progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research*, Amsterdam, 443: 81-93.
- Vicam (A Waters Company), Análise de Micotoxinas. Disponível em: <<http://www.solcampo.com.br/produtos.htm>> Acesso em 20 de maio de 2015.
- Wild, C.P., Gong, Y.Y. (2010) Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31: 71–82.

APÉNDICE

Tabela 1A – Informações sobre plantio, colheita e práticas agrícolas na produção de milho em 11 propriedades que praticam agricultura familiar na Região Central de Minas Gerais.

Propriedade	Município	Data do plantio	Data da colheita	Número de dias do plantio à colheita**	Semente	Adubação	Irrigação	Fungicida	Inseticida	Herbicida	As espigas continuaram no campo após maturação
2013/2014											
INH 01	Inhaúma	29/12/12	10/5/2013	131	Transgênico	*	*	*	Não	*	*
INH 02	Inhaúma	14/11/12	20/5/2013	186	Transgênico	*	*	*	*	*	*
FOR 01	Fortuna de Minas	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
FUN 01	Funilândia	out/2012	jul/2013	280	*	*	*	*	*	*	*
FUN 02	Funilândia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
SET 01	Sete Lagoas	out/2012	mai/2013	210	Variedade Al Bandeirantes	*	*	*	*	*	*
2014											
INH 02	Inhaúma	12/11/13	mai/2014	180	Transgênico/ Al Bandeirantes	Sim	Não	Não	Sim	Sim	60 dias
FOR 01	Fortuna de Minas	nov/2013	jul/2014	240	*	Sim	Não	Não	Não	Não	90 dias
SET 02	Sete Lagoas	17/12/13	03/06/14	166	Híbrido BR 206	Sim	Não	Não	Não	Sim	30 dias
ESM 01	Esmeraldas	out/2013	abr/2014	180	Híbrido Semeali	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
ESM 02	Esmeraldas	nov/2013	jun/2014	210	*	Sim	Não	Não	Não	Não	60 dias
SET 03	Sete Lagoas	3/12/2013	fev/2014	60	*	Não	Não	Não	Não	Não	Não
ESM 03	Esmeraldas	20/10/13	mai/2014	210	Híbrido SHS 4070	Sim	Não	Não	Não	Não	30 dias

* Dados não informados.

** Para as condições da Região Central de Minas Gerais, e para as épocas de plantio (de outubro a dezembro), decorrem cerca de 120 dias do plantio à colheita do milho verde. Fonte: EMBRAPA.

Tabela 2A – Informações sobre estruturas e práticas de armazenamento de milho em 11 propriedades que praticam agricultura familiar na Região Central de Minas Gerais.

Propriedade	Tipo da estrutura	Dimensões da estrutura (m)	Estrutura elevada	Quantidade de milho armazenado (t)	Inseticida	Raticida	Separação do milho armazenado
2013/2014							
INH 01	Tábua	7,5 x 5,5 x 2,5	Sim	3,0	Não	Não	*
INH 02	Alvenaria	5 x 4 x 2,5	Sim	4,0 - 5,0	*	*	*
FOR 01	Tábua/ Tela	3 x 2 x 2	Sim	*	*	*	*
FUN 01	*	*	*	3,0	*	*	*
FUN 02	*	*	*	*	*	*	*
SET 01	*	5 x 4,5 x 2,3	Não	2,0	Não	Não	*
2014							
INH 02	Alvenaria	5 x 4 x 2,5	Sim	2,0	Não	Não	Não
FOR 01	Tábua / Tela	3 x 2 x 2	Sim	*	Não	Não	Não
SET 02	Bambu	3,5 x 2,3 x 2,1	Não	1,5	Não	*	Sim - empalhamento
ESM 01	Sacaria	*	*	12,5	Não	Não	Não
ESM 02	Sacaria	*	*	1,8	Não	Não	Não
SET 03	Tábua /Telha amianto	4,5 x 2,5 x 1,9	Sim	*	Não	Não	Não
ESM 03	Alvenaria	4 x 3 x 2	Sim	1,0	Sim	Não	Não

* Dados não informados.




LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS
CCR & CCS DMVP & DACT FATEC
Coordenação: CARLOS AUGUSTO MALLMANN
Prédio 44, 3º andar, Ala Norte CEP 97105-900, Santa Maria - RS
Fone: (55) 3220-8445 | Cel: (55) 9961-4377 - www.lamic.ufsm.br

Santa Maria, 31 de Dezembro de 2014.

Relatório do Ensaio

Identificação		Código
Requisitante:	EMBRAPA - SETE LAGOAS.	6673/2014 
Responsável:	valeria.vieira@embrapa.br	
E-mail:	valeria.vieira@embrapa.br	
Endereço:	RODOVIA MG-424, KM 65, CEP 35702-098, Sete Lagoas - MG	
Telefone/Fax:	(31) 3027-1220	
Observação da Solicitação:		
Observação do Laudo:	Descrição da amostra fornecida pelo cliente.	

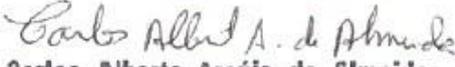
Amostra: 6673/2014 Matriz: Milho Apresentação: Moído Descrição: Milho moído, amostra nº:01, lote 1, armazenamento: -15°, safra: 2012/13, data da coleta: 11/06/2013.

Resultados Micotoxinas em µg/kg(ppb)	
ZEA	<LQ

Legenda: 1 - Zearalenona

Informações			
LAMIC - Laboratório de ensaio acreditado pela CGCRE de acordo com a ISO/IEC 17025 (CRL 0189). O LAMIC também é aferido pelo controle de qualidade analítico do Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), da Inglaterra.			
Análise	Técnica/Procedimento	Limite de Quantificação (LQ) / Coeficiente de Recuperação (CR)	Estimativa de Incerteza
1	LC-MS/MS POP 42 (Rev.05)	20 µg/kg/85,0%	20 µg/kg (1,93 µg/kg)
A responsabilidade do plano e procedimento de amostragem é do cliente. Os resultados restringem-se tão somente à amostra analisada. Este certificado não poderá ser reproduzido parcialmente. Ensaio adicional disponível para esta amostra: www.lamic.ufsm.br			
Caro Cliente, com a preocupação em melhorar cada vez mais nossos serviços, solicitamos que preencha a nossa Pesquisa de Opinião conforme o link http://goo.gl/forms/T2zKwFRU6u			

Chave para validação: F7-80-1B-84-24-45-D6-0C-9D-D8-C5-A0-1C-B2-F5-36 Para validar este Laudo acesse: www.lamic.ufsm.br



Carlos Alberto Araujo de Almeida
 Responsável Técnico - CRF/RS 4332
 LAMIC



Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann
 COORDENADOR
 Laboratório de Análises Micotoxicológicas

Figura 1A – Laudo da análise de Zearalenona em milho armazenado em paíóis de propriedades familiares da Região Central de Minas Gerais.