

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

**TESE**

**CONTAMINAÇÃO FÚNGICA TOXÍGENA E  
QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE SILAGENS  
DESTINADAS A ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS  
NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

**Luiz Antonio Moura Keller**

**2013**



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

**CONTAMINAÇÃO FÚNGICA TOXÍGENA E QUALIDADE  
MICOTOXICOLÓGICA DE SILAGENS DESTINADAS A ALIMENTAÇÃO  
DE BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

**LUIZ ANTONIO MOURA KELLER**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Carlos Alberto da Rocha Rosa**

*e Co-Orientações*  
**Lilia Renée Cavaglieri**  
**Ana Maria Dalcero**

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

**Seropédica, RJ**  
**Março de 2013**

636.2098161

K29c

T

Keller, Luiz Antonio Moura, 1979-

Contaminação fúngica toxígena e qualidade micotoxicológica de silagens destinadas a alimentação de bovinos no Estado de São Paulo / Luiz Antonio Moura Keller - 2013.

180 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Bovino - Alimentação e rações - São Paulo (Estado) - Teses. 2. Fungos - Contaminação - Teses. 3. Milho - Teses. 4. Sorgo - Teses. 5. Micotoxinas - Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

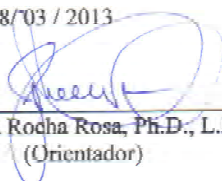
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**LUIZ ANTONIO MOURA KELLER**

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

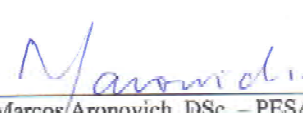
TESE APROVADA EM

18/03/2013

  
\_\_\_\_\_  
Carlos Alberto da Rocha Rosa, Ph.D., L.D. - UFRRJ  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Lilia Renée Cavaglieri, DSc. - UNRC - Argentina  
(Co-orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Fernando Queiroz de Almeida, DSc. - UFRRJ

  
\_\_\_\_\_  
Marcos Aronovich, DSc. - PESAGRO-RJ

  
\_\_\_\_\_  
Airton Antonio Castagna, DSc. - PESAGRO-RJ

  
\_\_\_\_\_  
Nelson Jorge Moraes Matos, DSc. - UFRRJ

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro, junto com os representantes do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Aos colegas Águida Aparecida de Oliveira, Tatiana Xavier de Almeida, Beatriz de Souza Monteiro, Lucila Maria Teixeira Nunes e tantos outros que passaram pelo Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas de nossa Universidade, pela alegria da convivência e trabalho em grupo.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e os vários amigos que fiz nesta instituição e que sempre me apoiaram nessa caminhada.

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

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

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

À todos vocês, o meu muito obrigado!

## **BIOGRAFIA**

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

Ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no primeiro período letivo de 2001. Realizou Iniciação Científica nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas desde 2003, onde desenvolveu e auxiliou os projetos das diferentes linhas de pesquisa desenvolvidas pelo grupo neste período. Monitor da disciplina Micologia Veterinária para graduação, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa, no período de 2004 a 2006. Concluiu o curso de Medicina Veterinária em julho de 2006. Tendo publicado trabalhos na área durante o período de estágio, bem como participação nos projetos e convênios mantidos pelo núcleo com a Universidade Nacional de Rio Cuarto (UNRC).

Em março de 2008, iniciou o Mestrado em Ciências Veterinárias da UFRRJ. Tendo concluído o mesmo e recebendo o grau de Mestre em Ciências Veterinárias em março de 2010. E no mesmo mês de 2010 iniciou o curso de Doutorado em Ciências Veterinárias na UFRRJ.

## RESUMO

KELLER, Luiz Antonio Moura **Contaminação fúngica toxígena e qualidade micotoxicológica de silagens destinadas a alimentação de bovinos no Estado de São Paulo**. 2013. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Apesar de ter o segundo maior rebanho do mundo a bovinocultura de corte brasileira, apresenta modestos índices de produtividade. O desempenho dos animais em pastagens é razoável durante a estação chuvosa, observando-se na estação seca deficiência alimentar, causada pela baixa disponibilidade e qualidade do pasto, o que resulta em perda de peso dos animais. Assim, alimentos ensilados são uma solução atualmente utilizada a esta situação no processo produtivo. A avaliação deste substrato alimentar é escassa tanto no Brasil quanto no restante da América Latina, assim, os objetivos deste trabalho foram os de estabelecer principalmente a frequência natural de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas em amostras de componentes vegetais e silagens destinadas ao consumo bovino, bem como de outros gêneros fúngicos presentes e detectar micotoxinas presentes nas mesmas (aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisina B<sub>1</sub>, deoxinivalenol e gliotoxina). Foram avaliados um total de 168 amostras de ensilados de milho e sorgo no período de janeiro 2009 a outubro 2012 (avaliado o material pré e pós-fermentado nesse período), provenientes de três fazendas criadoras de gado de corte no estado de São Paulo. Foi observado que em todos os substratos avaliados tiveram mais de 50% de amostras contaminadas acima dos limites recomendados para alimentação animal de  $1,0 \times 10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> (GMP, 2006). Sendo *Aspergillus flavus* a espécie de maior ocorrência nas amostras avaliadas, seguida por *A. niger agregado*, *A. fumigatus* e *A. parasiticus*. Detectou-se presença em níveis altos de toxinas produzidas por esses gêneros principalmente: aflatoxinas (níveis acima de 70 ppb), gliotoxina (níveis acima de 30 ppm) e ocratoxina A (níveis de até 10 ppm). O gênero *Fusarium* apresentou uma variabilidade baixa de espécies nas amostras avaliadas, mesmo em amostras pré-fermentadas onde ocorreram contagens maiores deste gênero, tiveram a ocorrência de apenas duas espécies *F. verticillioides* e *F. graminearum*. Junto a isso também tiveram a detecção de toxinas produzidas por esses gêneros em níveis baixos (níveis de 0,32-2 ppm), principalmente no milho pré-fermentado. Tais achados reforçam a avaliação mais ampla desse substrato que é base alimentar durante grandes períodos do ano para o nosso rebanho.

**Palavras chave:** milho, sorgo, micotoxinas, fungos.



## ABSTRACT

KELLER, Luiz Antonio Moura **Mycological and Mycotoxicology evaluation of silage intended to a food on cattle Farms in the state of Sao Paulo.** 2013. XXp. Tesis (Doctor Scientiae in Veterinary Sciences, Animal Health). Institute of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Microbiology and Immunology, University Federal Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Despite having the second largest cattle herd in the world. The Brazilian has low rates of productivity. The performance of the animals in pastures is reasonable during the rainy season, being in the dry food deficiency, caused by the low availability and quality of grass, which results in weight loss of animals. Thus ensiled foods are a recently solution to this situation in the production process. But we have a very few studies on the food substrate in Brazil and Latin America. The objectives of this study were primarily to establish the natural frequency of species of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* potentially produce mycotoxins in samples of vegetable and silage components intended for cattle and other fungal genera present and detect mycotoxins presents in the same (aflatoxins, ochratoxin A, fumonisin B<sub>1</sub>, deoxinivalenol and glyotoxin). We are evaluated a total of 168 samples of corn and sorgum silos, from Janerie 2009 to October 2012. These farms creators of beef cattle were located in the state of *São Paulo*. We evaluated the pre and post fermented samples during this period. In all substrates had evaluated more than 50% of samples contaminated above the recommended limits feed of  $1.0 \times 10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> (GMP, 2006). As in other studies the genera *Aspergillus* and *Penicillium* have high occurrence following related studies in the Americas and worldwide. *Aspergillus flavus* was the species of greatest occurrence in the samples evaluated, followed by *A. niger aggregate*, *A. fumigatus* and *A. parasiticus*. Presence was detected in high levels of toxins produced by these genera mainly: aflatoxins (up to 70 ppb), glyotoxin (up to 30 ppm) and ochratoxin A (up to 10 ppm). The *Fusarium* sp. showed a low variability of species in the samples evaluated, even in pre-fermented samples where counts were higher in this genera, had the occurrence of only two species *F. verticillioides* and *F. graminearum*. Next to it was also the detection of toxins produced by these genera at low levels (levels of 0.32-2 ppm). These observations creates the need to expand studies related to ensiled food, which the animals were feed during major periods of the year.

**Key words:** corn, sorgum, mycotoxins, fungal

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>TABELA 1:</b> Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Aspergillus</i> que contaminam produtos vegetais.	13
<b>TABELA 2:</b> Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Penicillium</i> que contaminam produtos vegetais.	16
<b>TABELA 3:</b> Potencial toxígeno das principais espécies de <i>Fusarium</i> que contaminam produtos vegetais.	17
<b>TABELA 4:</b> Características físicas do milho pré-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.	42
<b>TABELA 5:</b> Características físicas do milho pós-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.	42
<b>TABELA 6:</b> Temperatura, umidade relativa e pluviosidade média durante o período	43
<b>TABELA 07:</b> Contagem fúngica do milho pré-fermentado em diferentes meios de cultivo.	44
<b>TABELA 08:</b> Contagem fúngica do milho pós-fermentado em diferentes meios de cultivo.	44
<b>TABELA 09:</b> Percentual de amostras de milho contaminadas acima dos limites recomendados.	44
<b>TABELA 10:</b> ANOVA das contagens fúngicas comparando diferentes fazendas, milhos pré e pós-fermentados (meio) e setor dos silos avaliados.	44
<b>TABELA 11:</b> Média e desvio dos silos pré e pós-fermentados de milho.	45
<b>TABELA 12:</b> Percentual de amostras de milho contaminadas por <i>Aspergillus fumigatus</i> .	48
<b>TABELA 13:</b> Contaminação de <i>A. fumigatus</i> por camadas dos silos de milho.	49
<b>TABELA 14:</b> Produção de Gliotoxina, por cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> em milho.	50
<b>TABELA 15:</b> Média e desvio padrão dos níveis de AFs em milho quantificados através de CLAE.	51
<b>TABELA 16:</b> Média e desvio padrão dos níveis de fumonisina B <sub>1</sub> em milho quantificados através de ELISA.	52
<b>TABELA 17:</b> Média e desvio padrão dos níveis de deoxinivalenol em milho quantificados através de ELISA.	53
<b>TABELA 18:</b> Média e desvio padrão dos níveis de gliotoxina em milho quantificados através de CLAE.	54
<b>TABELA 19:</b> Características físicas do sorgo pré-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.	94
<b>TABELA 20:</b> Características físicas do sorgo pós-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.	94
<b>TABELA 21:</b> Contagem fúngica do sorgo pré-fermentado em diferentes meios de cultivo.	96
<b>TABELA 22:</b> Contagem fúngica do sorgo pós-fermentado em diferentes meios de cultivo.	96
<b>TABELA 23:</b> Percentual de amostras de sorgo contaminadas acima dos limites recomendados.	96
<b>TABELA 24:</b> ANOVA das contagens fúngicas comparando diferentes fazendas, milhos pré e pós-fermentados (meio) e setor dos silos avaliados.	96

<b>TABELA 25:</b> Média e desvio dos silos pré e pós-fermentados de sorgo.	<b>97</b>
<b>TABELA 26:</b> Percentual de amostras de sorgo contaminadas por <i>Aspergillus fumigatus</i> .	<b>100</b>
<b>TABELA 27:</b> Contaminação de <i>A. fumigatus</i> por camadas dos silos de sorgo	<b>100</b>
<b>TABELA 28:</b> Produção de Gliotoxina, por cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> em milho e sorgo.	<b>101</b>
<b>TABELA 29:</b> Média e desvio padrão dos níveis de AFs em sorgo quantificados através de CLAE.	<b>102</b>
<b>TABELA 30:</b> Média e desvio padrão dos níveis de fumonisina B1 em sorgo quantificados através de ELISA.	<b>103</b>
<b>TABELA 31:</b> Média e desvio padrão dos níveis de deoxinivalenol em sorgo quantificados através de ELISA	<b>104</b>
<b>TABELA 32:</b> Média e desvio padrão dos níveis de gliotoxina em sorgo quantificados através de CLAE.	<b>105</b>
<b>TABELA 31:</b> Contagem fúngica em ufc.g <sup>-1</sup> dos silos de milho em PVC.	<b>136</b>
<b>TABELA 32:</b> Contagem fúngica em ufc.g <sup>-1</sup> dos silos de Sorgo em PVC.	<b>136</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1:</b> Conidióforo de <i>Aspergillus</i> sp. bisseriado ( <i>A. ochraceus</i> ) e terminologias das estruturas usadas na classificação e identificação. Escala = 10 $\mu\text{m}$ .	12
<b>FIGURA 2:</b> “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, triverticilado; e, quaterverticilado. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada.	15
<b>FIGURA 3:</b> Estruturas químicas das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .	19
<b>FIGURA 4:</b> Estruturas químicas da Ocratoxina A.	21
<b>FIGURA 5:</b> Estruturas químicas da Gliotoxina.	23
<b>FIGURA 6:</b> Vista frontal do silo, após período de fermentação de $\pm$ 90 dias. Esquema dos pontos de coleta nos silos.	30
<b>FIGURA 7:</b> Esquema divisão linear dos silos com linhas de coletas.	31
<b>FIGURA 8:</b> Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (ufc g <sup>-1</sup> ).	33
<b>FIGURA 9:</b> Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero <i>Aspergillus</i> nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas.	34
<b>FIGURA 10:</b> Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero <i>Penicillium</i> a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C).	35
<b>FIGURA 11:</b> Esquema de incubação das cepas do gênero <i>Fusarium</i> nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final.	36
<b>FIGURA 12:</b> Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados no milho e sorgo pré e pós-fermentado.	46
<b>FIGURA 13:</b> Densidade relativa (%) de espécies de <i>Aspergillus</i> no milho pré e pós-fermentado.	47
<b>FIGURA 14:</b> Densidade relativa (%) de espécies de <i>Penicillium</i> no milho pré e pós-fermentado.	48
<b>FIGURA 15:</b> Densidade relativa (%) de espécies de <i>Aspergillus</i> no sorgo pré e pós-fermentado.	99
<b>FIGURA 16:</b> Densidade relativa (%) de espécies de <i>Penicillium</i> sp. no sorgo pré e pós-fermentado.	99
<b>FIGURA 17:</b> Gráfico de controle das velocidades de crescimento em milímetros, das cepas de <i>Aspergillus Fumigatus</i> .	134
<b>FIGURA 18:</b> Gráfico de Temperatura e níveis de produção de Gliotoxina em ppm das cepas de <i>Aspergillus Fumigatus</i>	134
<b>FIGURA 19:</b> Gráfico de Atividade Aquosa e níveis de produção de Gliotoxina em ppm das cepas de <i>Aspergillus Fumigatus</i>	135
<b>FIGURA 20:</b> Vista frontal do silo, após período de fermentação de $\pm$ 90 dias. Neste momento a pá mecânica retirava a quantidade de alimento fornecida aos bovinos.	154
<b>FIGURA 21:</b> Vista frontal do silo, após período de fermentação de $\pm$ 90 dias. Esquema dos pontos de coleta nos silos.	154
<b>FIGURA 22:</b> Localização geográfica dos pontos de coleta, no mapa brasileiro e no estado de São Paulo.	155
<b>FIGURA 23:</b> Condições dos silos de milho, com a utilização de lonas de alta desidade e revestimento duplo.	155

<b>FIGURA 24:</b> Avaliação das condições do milho pós-fermentado, com a utilização de lonas de alta desidade e revestimento duplo.	<b>156</b>
<b>FIGURA 25:</b> Avaliação das condições dos grãos de milho com a utilização de técnica de plaqueamento direto.	<b>156</b>
<b>FIGURA 26:</b> Avaliação das condições dos grãos de milho com a utilização de técnica de plaqueamento direto	<b>157</b>
<b>FIGURA 27 a:</b> Coinjeção de amostras e padrões de Gliotoxina.	<b>158</b>
<b>FIGURA 27 b:</b> Coinjeção de amostras e padrões de Gliotoxina.	<b>159</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AF</b>	Aflatoxina(s)
<b>AFB<sub>1</sub></b>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
<b>AFB<sub>2</sub></b>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
<b>AFG<sub>1</sub></b>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
<b>AFG<sub>2</sub></b>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
<b>Aw</b>	Atividade Aquosa
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CC</b>	Camada Central
<b>CI</b>	Camada Interna
<b>CS</b>	Camada Superior
<b>CL</b>	Camadas Laterais
<b>CAM</b>	Agar Leite de Coco
<b>CYA</b>	Agar Czapek com extrato de levedura
<b>Cz</b>	Agar Czapek
<b>DON</b>	Deoxinalenol
<b>DRBC</b>	Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
<b>MEA</b>	Agar Extrato de Malte
<b>SDA</b>	Agar Sabouraud Dextrose
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>SD</b>	Desvio Padrão
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>FB</b>	Fumonisinias
<b>FBI</b>	Fumonisina B1
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GLIO</b>	Gliotoxina
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>LOD</b>	<i>Limit of detection</i>
<b>LOQ</b>	<i>Limit of quantification</i>
<b>LSD</b>	<i>Least Square Difference</i>

$\bar{X}$	Média Aritmética
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>NPMM</b>	Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>ppb</b>	Partes por Bilhão ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
<b>ppm</b>	Partes por Milhão ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<b>PSA</b>	Projeto Sanidade Animal
<b>T</b>	Temperatura
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UFRRJ</b>	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
1.1 Hipótese	3
1.2 Objetivo geral	3
1.3 Objetivos específicos	4
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1 A bovinocultura brasileira	5
2.2 Tipos de silage	6
2.3 Os fungos	7
2.4 Micobiota toxígena em produtos vegetais, silagens e rações	10
2.5 Gênero <i>Aspergillus</i>	11
2.5.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
2.6 Gênero <i>Penicillium</i>	14
2.7 Gênero <i>Fusarium</i>	
2.8 Micotoxinas e micotoxicoses: características gerais	17
2.8.1 Aflatoxinas	18
2.8.1.1 Toxicidez das Aflatoxinas	20
2.8.2 Ocratoxinas	21
2.8.3 Citrinina	21
2.8.4 Gliotoxina	22
2.8.5 Fumonisinias e Deoxinivalenol	23
2.9 Métodos de detecção das micotoxinas	24



# **CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA TOXÍGENA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE SILAGENS DE MILHO.**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	27
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
2.1 Amostragem	31
2.2 Avaliação física das amostras	31
2.2.1 Percentual de matéria seca	31
2.2.2 Atividade de água ( $A_w$ ) e pH	31
2.3 Dados climatológicos e localização geográfica	32
2.4 Determinação da micobiota	32
2.5 Isolamento e identificação fúngica	33
2.6 Caracterização do perfil toxígeno das espécies	36
2.7 Detecção e quantificação de micotoxinas	36
2.7.1 Detecção e quantificação de aflatoxinas e ocratoxina a	38
2.7.2 Detecção e quantificação de fumonisina B <sub>1</sub> e deoxinivalenol	38
2.7.3 Detecção e quantificação de Gliotoxina	40
2.8 Análises Estatísticas	41
<b>3. RESULTADOS</b>	42
3.1 Amostragem	42
3.2 Avaliação física das amostras	42
3.2.1 Percentual de matéria seca	42
3.2.2 Atividade de água ( $A_w$ ) e pH	42
3.3 Dados climatológicos e localização geográfica	43
3.4 Determinação da micobiota	45
3.5 Isolamento e identificação fúngica	44
3.6 Caracterização do perfil toxígeno das espécies	48
3.7.1 Detecção e quantificação de aflatoxinas e ocratoxina a	48
3.7.2 Detecção e quantificação de fumonisina B <sub>1</sub> e deoxinivalenol	48
3.7.3 Detecção e quantificação de Gliotoxina	
3.8 Análises Estatísticas	54

<b>4. DISCUSSÃO</b>	55
<b>4. CONCLUSÕES</b>	61
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	63

## **CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA TOXÍGENA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE SILAGENS DE SORGO.**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	79
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	80
2.1 Amostragem	81
2.2 Avaliação física das amostras	83
2.2.1 Percentual de matéria seca	83
2.2.2 Atividade de água ( $A_w$ ) e pH	83
2.3 Dados climatológicos e localização geográfica	84
2.4 Determinação da micobiota	84
2.5 Isolamento e identificação fúngica	85
2.6 Caracterização do perfil toxígeno das espécies	88
2.6 Caracterização do perfil toxígeno das espécies	89
2.7.1 Detecção e quantificação de aflatoxinas e ocratoxina a	90
2.7.2 Detecção e quantificação de fumonisina B <sub>1</sub> e deoxinivalenol	92
2.7.3 Detecção e quantificação de Gliotoxina	93
2.8 Análises Estatísticas	93
<b>3. RESULTADOS</b>	94
3.1 Amostragem	94
3.2 Avaliação física das amostras	94
3.2.1 Percentual de matéria seca	95
3.2.2 Atividade de água ( $A_w$ ) e pH	96
3.3 Dados climatológicos e localização geográfica	96
3.4 Determinação da micobiota	96

3.5 Isolamento e identificação fúngica	97
3.6 Caracterização do perfil toxígeno das espécies	100
3.7.1 Detecção e quantificação de aflatoxinas e ocratoxina a	101
3.7.2 Detecção e quantificação de fumonisina B <sub>1</sub> e deoxinivalenol	102
3.7.3 Detecção e quantificação de Gliotoxina	104
3.8 Análises Estatísticas	104
<b>4. DISCUSSÃO</b>	106
<b>5. CONCLUSÕES</b>	112
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	111
<b>CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO.</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	130
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	131
2.1 Detecção e quantificação de gliotoxina em relação à ocorrência de <i>A. fumigatus</i>	131
2.2 Estudos da influência de fatores físicos sobre o crescimento fúngico e produção de gliotoxina pelas cepas isoladas de <i>A. fumigatus</i> em milho e sorgo ensilados.	131
2.3 Influência das condições físicas de cultivo para variação da microbiota e na produção de gliotoxina por cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> .	132
2.4 Análises Estatísticas	132
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	133
3.1 Detecção e quantificação de gliotoxina em relação à ocorrência de <i>A. fumigatus</i>	133
3.2 Estudos da influência de fatores físicos sobre o crescimento fúngico e produção de gliotoxina pelas cepas isoladas de <i>A. fumigatus</i> em milho e sorgo ensilados.	134
3.3 Influência das condições físicas de cultivo para variação da microbiota e na produção de gliotoxina por cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> .	135

3.4 Análises Estatísticas	136
<b>4. CONCLUSÕES</b>	138
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	139
<b>1. ANEXO DE FIGURAS</b>	154

## 1 – INTRODUÇÃO GERAL

Os últimos censos agrícolas (IBGE 2006; 2010, EMBRAPA, 2006) mostram que a bovinocultura está presente em 5,2 milhões de propriedades rurais, ocupando 36,75% do território nacional, apresentando cerca de 212 milhões de cabeças, das quais 28 milhões foram abatidas em frigoríficos oficiais, para consumo interno e exportação. Mudanças na produção de bovinos destinados a produção de carne e leite implicam em mudanças na utilização dos alimentos, principalmente ensilados que envolvam novos insumos e rendimento destes alimentos. Para criação de bovinos destinados a produção de carne e leite, implica na utilização de alimentos ensilados que envolvam bons insumos e rendimento destes alimentos. Um dos principais problemas enfrentados pelos pecuaristas é o alto valor das rações e insumos. A suplementação na alimentação em épocas de seca quando a qualidade do pasto se torna inferior, é necessária para manutenção dos níveis nutricionais exigidos para manutenção dos níveis de produção. Alimentos ensilados, principalmente silagens de milho (*Zea mays L.*, variedades Crioula e Transgênica Bt) e sorgo (*Sorghum bicolor*, Variedade Crioulas) vêm sendo utilizados com essa finalidade, apesar dos grandes ganhos nutricionais para o rebanho com a utilização de silagens, problemas relacionados ao pouco cuidado no processamento, armazenamento e utilização, bem como o demorado tempo de uso extrapolando condições adequadas para conservação podem prejudicar o desempenho final do processo. Práticas muitas vezes inadequadas de manipulação destes alimentos podem favorecer a proliferação de microrganismos, onde destacamos a contaminação fúngica com a produção de micotoxinas.

A contaminação fúngica de alimentos destinados ao consumo animal com conseqüente formação de micotoxinas constitui um problema de grande importância em nível mundial. As micotoxinas podem produzir efeitos adversos tais como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, nefrotoxicidade e imunossupressão provocando ou modulando diversas patologias, gerando perdas nas áreas de agricultura e de produção animal com milhões de dólares gastos em problemas relacionados à saúde humana (IARC, 1993; VASANTHI; BHAT, 1998).

Considera-se que um dos aspectos mais importantes foi à mudança que a comunidade científica deu ao conceito de micotoxicose. O preocupante não é a contaminação por altos níveis de micotoxinas de ocorrência rara e esporádica, mas a ocorrência destes produtos tóxicos em pequenas quantidades em produtos vegetais básicos e seus de subprodutos. A ingestão diária e constante de pequenas quantidades destes compostos através de alimentos

básicos, sem dúvida, possui papel importante na indução ou modulação de patologias nos animais e no homem. As subdoses de micotoxinas têm sido consideradas imunossupressoras, teratogênicas e carcinogênicas, modulando e modificando mecanismos bioquímicos, alterando e inativando enzimas e a biossíntese de macromoléculas importantes no equilíbrio fisiológico do organismo animal (WHITLOW, 2007).

A magnitude do problema se manifesta na continua busca de medidas de prevenção e controle de micotoxinas presente em silagens (principalmente aflatoxinas, gliotoxina, citrinina e toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*), devido ao impacto negativo que podem exercer nos parâmetros produtivos como ganho de peso, conversão alimentar, microbiota ruminal, gerando assim grandes perdas no final da cadeia produtiva agropecuária. As estratégias de prevenção precisam ter como alvo primário minimizar a formação de micotoxinas no campo e durante armazenamento.

Assim, ganha importância a busca por melhorias visando maior controle na sanidade dos animais bem como qualidade no produto gerado. O controle de propágulos fúngicos constitui um indicador da condição higiênico sanitária de alimentos destinados ao consumo destes animais e não deve exceder o valor de  $1 \times 10^4$  ufc  $g^{-1}$  (GMP, 2008). Temos também que as espécies que aparecem com maior frequência nos cereais são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, com forte implicação toxicológica afetando parâmetros produtivos, com graves perdas econômicas e riscos para a saúde humana e animal. E que a gliotoxina, bem como demais micotoxinas tem papel importante por conta da sua contaminação na cadeia produtiva dos bovinos. A gliotoxina está intimamente relacionada com o *A. fumigatus* seu principal fungo produtor nos alimentos ensilados. Porém ainda existem poucos estudos de sua patogenicidade, mas os efeitos imunossupressores fortes são descritos e normalmente tem uma grande frequência em alimentos destinados a bovinos (BOUDRA; MORGAVI, 2005; RICHARD, 2008).

A legislação brasileira atual não fixa nenhum limite máximo tolerado, no que diz respeito à contaminação fúngica em alimentos para animais, considerando os fungos como simples agentes de deteriora, tendo apenas como recomendação a não utilização de substratos vegetais com níveis de contaminação maiores do que  $1 \times 10^5$  ufc  $g^{-1}$ . O Brasil possui legislação apenas para regular aflatoxinas, sendo o limite máximo permitido em alimentos pela resolução 7 de 09/11/1988, do Ministério da Agricultura e mais atualmente sendo internalizada a portaria das normas do MERCOSUL, GMC/RES/56/1994, estabelecendo que

para qualquer matéria prima a ser utilizada direta ou indiretamente em alimentos destinados ao consumo animal, o limite máximo de aflatoxinas é de 50 ppb.

Assim, este estudo busca determinar os níveis de contaminação, bem como a frequência de cepas e o risco destas serem potencialmente produtoras de micotoxinas em silagens de milho (*Zea mays L.*, variedades Crioula e Transgênica Bt) e sorgo (*Sorghum bicolor*, variedade Crioulas) destinadas à alimentação de gado bovino de corte de algumas propriedades no estado de São Paulo, buscando conhecer a qualidade micotoxicológica de silagens, bem como avaliar sobre que condições estas estarão sendo oferecidas e armazenadas, avaliando o risco a que estes animais que as consomem estão sendo submetidos e com isso propor em uso futuro, técnicas e/ou inócuos para silos que exerçam efeitos benéficos tanto para a conservação de diferentes tipos de silagens, bem como a melhora dos parâmetros de produtividade, objetivando melhoras no alimento que estes animais consumirão e ganhos na pecuária.

## **1.1 - HIPÓTESE**

Através de monitoramento e aplicações de medidas de controle as silagens e seus ingredientes, destinados à alimentação de bovinos de corte, podem oferecer um risco reduzido aos rebanhos destas regiões avaliadas que consomem este material.

## **1.2 - OBJETIVO GERAL**

Estabelecer a ocorrência natural de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* potencialmente produtoras de micotoxinas e determinar a presença de aflatoxinas (AFs) e ocratoxina A (OTA).

Determinar a frequência de isolados de *Aspergillus fumigatus* e incidência natural de gliotoxina presentes em silagens destinadas à alimentação de bovinos de corte.

Avaliar que condições possam influenciar no silo o crescimento e a produção de gliotoxina, visando à aplicação de métodos que possibilitem a melhora da conservação de milho e sorgo ensilados.

### 1.3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Isolar e identificar a microbiota toxígena em amostras de silagens de milho e sorgo;
- 2- Caracterizar o perfil toxígeno das principais espécies potencialmente produtoras isoladas das amostras, espécies dentro dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*;
- 3- Determinar a frequência de cepas de *A. fumigatus*, em relação às demais espécies do gênero *Aspergillus*, estabelecendo a distribuição das espécies produtoras de gliotoxina;
- 4- Determinar a ocorrência natural de gliotoxina em silagens (de milho e sorgo) destinadas à alimentação de bovinos de corte;
- 5- Determinar a influência de fatores físicos sobre o crescimento e produção de gliotoxina pelas cepas isoladas de *A. fumigatus* em milho e sorgo ensilados.



## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- A bovinocultura brasileira

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

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

As estatísticas para 2010, previam que o Brasil se tornaria o maior produtor e exportador mundial de carne bovina, e que a produção de leite comercializado sob supervisão oficial seria de 16 milhões de litros (IBGE 2006; 2010, EMBRAPA 2006).

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

Nos períodos de estiagem há escassez de forragem aliada ao baixo valor nutritivo das forrageiras, o que tem provocado, entre outros fatores, um prejuízo na engorda e manutenção do gado. Assim sendo, para atender às necessidades básicas de alimentação dos animais durante estes períodos faz-se necessário o uso de tecnologias para produção e

armazenamento de forragem, como a ensilagem e fenação. Em vários países, a utilização dessas técnicas mais apuradas são realizadas a partir do excedente de matéria prima do período chuvoso, e têm minimizado os danos aos animais no período de seca. Algumas plantas forrageiras como o sorgo, milho e capim elefante, entre outras, vêm sendo largamente utilizadas na produção de silagens (NEUMANN 2004; ALMEIDA, 2000).

Silagem é o resultado de um processo de anaerobiose, isto é, ausência de oxigênio, por acidificação do material verde vegetal. A ensilagem é o processo que dá origem a silagem e consiste no corte da planta na época ideal, o enchimento do silo (local destinado ao armazenamento da silagem), compactação da massa verde picada e vedação do silo (NEUMANN 2004; ALMEIDA, 2000). Destacam-se como benefícios da silagem, a manutenção de um maior número de animais por unidade de terra; a manutenção ou maximização da produção principalmente durante os períodos de escassez de alimentos; permite, através do confinamento, ofertar animais bem nutridos em épocas de melhor preço; permite armazenar grande quantidade de alimento (matéria seca) em pouco espaço.

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

## **2.2- Tipos de silagem**

Da mesma forma como a silagem pode ser feita com tipos diferentes de insumos, existem também diferentes maneiras de produção da silagem. Os materiais mais comumente ensilados no país segundo dados da Embrapa 2002 e 2006, são o milho (*Zea mays L.*, Variedades Crioula) e o sorgo (*Sorghum bicolor*, Variedades Crioulas). De acordo com Neumann e colaboradores (2004) e Almeida (2000); os silos mais comumente utilizados são:

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

Silagem de Parte Superior - É a silagem de milho ou sorgo semelhante à anterior; a diferença está no material aproveitado. Nesta, a planta é cortada metade para cima; o restante do processo como compactação e vedação é idêntico ao de uma silagem comum. Devido a

está restrição no corte, estas silagens possuem um menor percentual de fibra e conseqüentemente, maior digestibilidade.

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

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

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

Assim, os silos podem ser divididos em dois tipos: verticais aéreos e horizontais. Sendo os silos verticais aéreos normalmente fixos, e os de crescimento horizontal normalmente móveis, de estruturas temporárias. Atualmente, a grande maioria dos produtores tem construído os silos horizontais, em especial o tipo trincheira, pois como são de feitura simples e estrutura temporária, apresentam benefícios em custo, funcionalidade e durabilidade (NEUMANN 2004; ALMEIDA, 2000).

### **2.3- Os fungos**

Desde o tempo em que o homem primitivo começou a cultivar vegetais e a estocar alimentos, a contaminação fúngica tem demandado sua atenção. Os fungos vêm lentamente

invadindo, acidificando, fermentando, descolorindo e deteriorando os alimentos e, assim transformando nutritivos produtos agrícolas em produtos tóxicos e insalubres (MILLER, 1996).

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

Os produtos fúngicos têm ampliado cada vez mais sua importância no cenário mundial, com suas propriedades antibióticas, anabolizantes, estrogênicas, carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, bem como outras. Ao ponto das micotoxinas serem consideradas como "poluentes ambientais". Estas substâncias, produzidas por fungos, podem atingir principalmente órgãos como o fígado, rins e os sistemas nervoso, endócrino e imune (ROSA, 2002).

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certas espécies de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e que demonstram propriedades tóxicas em humanos e animais. Constituem um grupo diverso de substâncias químicas, de baixo peso molecular, sendo mais de 400 metabólitos secundários fúngicos identificados, no entanto, o número de micotoxinas que têm sido detectadas com frequência em alimentos é reduzido para cerca de 30. A principal via de exposição dos animais é através da ingestão de alimentos contaminados. As culturas agrícolas, especialmente os cereais, são susceptíveis ao ataque de fungos, no campo ou durante o armazenamento e os níveis de micotoxinas nos alimentos podem flutuar de acordo com as condições para o crescimento dos fungos produtores. Quando presentes em níveis elevados na dieta alimentar, estas toxinas podem levar a problemas agudos de saúde e até a morte; já a exposição prolongada a níveis baixos pode levar a manifestações ocultas (imunidade debilitada, atrasos no crescimento, susceptibilidade a doenças), e a problemas crônicos de saúde, o que gera preocupação por parte dos governos em todo o mundo.

Não se sabe quantas micotoxinas e metabólitos fúngicos tóxicos existam ao certo, apesar de ser possível fazer uma estimativa. Turner (1978) catalogou aproximadamente 1200 metabólitos secundários produzidos por fungos. Turner; Alderidge (1983) catalogaram mais de 2000 metabólitos produzidos por aproximadamente 1100 espécies, o que, em média, dá dois metabólitos únicos por espécie. Já Hawksworth (1991) estimou que existisse cerca de

69000 espécies fúngicas conhecidas, o que representa 5% das espécies fúngicas que se estima que existam no mundo, isto é, 1,5 milhões. Assumindo-se que existam dois metabólitos únicos por espécie, podem existir cerca de três milhões de metabólitos secundários produzidos por fungos. Porém apenas cerca de dez por cento dos metabólitos secundários descritos por Turner (1978) e por Turner; Alderidge (1983) foram classificados como sendo tóxicos por Cole; Cox (1981). Cole; Cox (1981) listaram aproximadamente 300 compostos tóxicos, mas estima-se que possam existir entre 20000 a 300000, bem como uma grande diversidade de mecanismos de ação. Existem, portanto, um número muito grande de metabólitos tóxicos e micotoxinas por descobrir.

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

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

A variabilidade na produção de toxinas em diferentes alimentos pode ser atribuída às características físicas e químicas do substrato. Os parâmetros físicos incluem disponibilidade de água, de oxigênio e a condutividade térmica no produto, o que influi sobre a temperatura nos grãos. Entre as características químicas, destacam-se o conteúdo de proteínas, gorduras, aminoácidos e minerais (MADHYASTHA, 1990). A produção de micotoxinas está também diretamente relacionada com as concentrações de gases atmosféricos. Esta é mais sensível do que o crescimento fúngico. As baixas concentrações de O<sub>2</sub> (< 0,1%) e/ou altas concentrações

de CO<sub>2</sub> previnem o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas na maioria dos casos (PASTER; BULLERMAN, 1988).

#### **2.4- Micobiota toxígena em produtos vegetais, silagens e rações**

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

Rosa (2002) estudou a micobiota toxígena de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de frangos de corte em quatro fábricas de ração do Estado do Rio de Janeiro e observou que o gênero *Aspergillus* foi o prevalente (41%), seguido do *Penicillium* (40%) e do *Fusarium* (15%), dentre outros. Outros autores colaboram para essa avaliação, encontrando frequências dos gêneros citados semelhantes com os demais estudos, como Fraga et al. (2007), com a avaliação de rações de frango de corte e camas de frango; Ribeiro et al. (2007) com avaliação de substratos para alimentação bovina (cevada, radícula); Keller et al. (2007) com avaliação de rações para equinos; Campos et al. (2008) avaliando rações para cães e ingredientes destas; Keller et al. (2008) avaliando substratos para alimentação de caprinos da região de Teresópolis, RJ; e mais especificamente Keller (2009) avaliou silos de milho, sorgo e cevada úmida nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, para alimentação de bovinos.

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

Em publicações européias Richard et al. (2006) e Boudra; Morgavi (2005) avaliaram a qualidade do material ensilado oferecido aos bovinos na França determinado que estes estavam acima de limites europeus de higiene e contaminação por micotoxinas. Richard et al. (2007, 2008), avaliaram também a qualidade do material ensilado continuando acima de limites europeus permitidos de higiene e contaminação por micotoxinas, juntamente a isso destacaram a contaminação por *A. fumigatus* e os riscos envolvidos deste contaminante na cadeia produtiva dos bovinos. Na Argentina, foram encontradas pesquisas como as de Amigot et al. (2006), que avaliou novos parâmetros de higiene e qualidade da silagem oferecida aos bovinos como alimento; González Pereyra et al. (2007), que avaliou parâmetros micológicos e toxicológicos de silos de milho de uma região específica daquele país; e Pereyra et al. (2008) que avaliou a presença de *A. fumigatus* e toxinas produzidas por essa espécie em silos de milho. Nos estudos da Argentina destacou-se à semelhança dos resultados encontrados na Europa onde a qualidade higiênica e contaminação por micotoxinas também estavam acima de limites estabelecidos. As perdas econômicas com micotoxinas são avaliadas em 25-50% da produção agrícola das diferentes regiões, de forma mais alarmante em regiões tropicais essa contaminação pode atingir cerca de 80% das culturas (ABDIN et al., 2010).

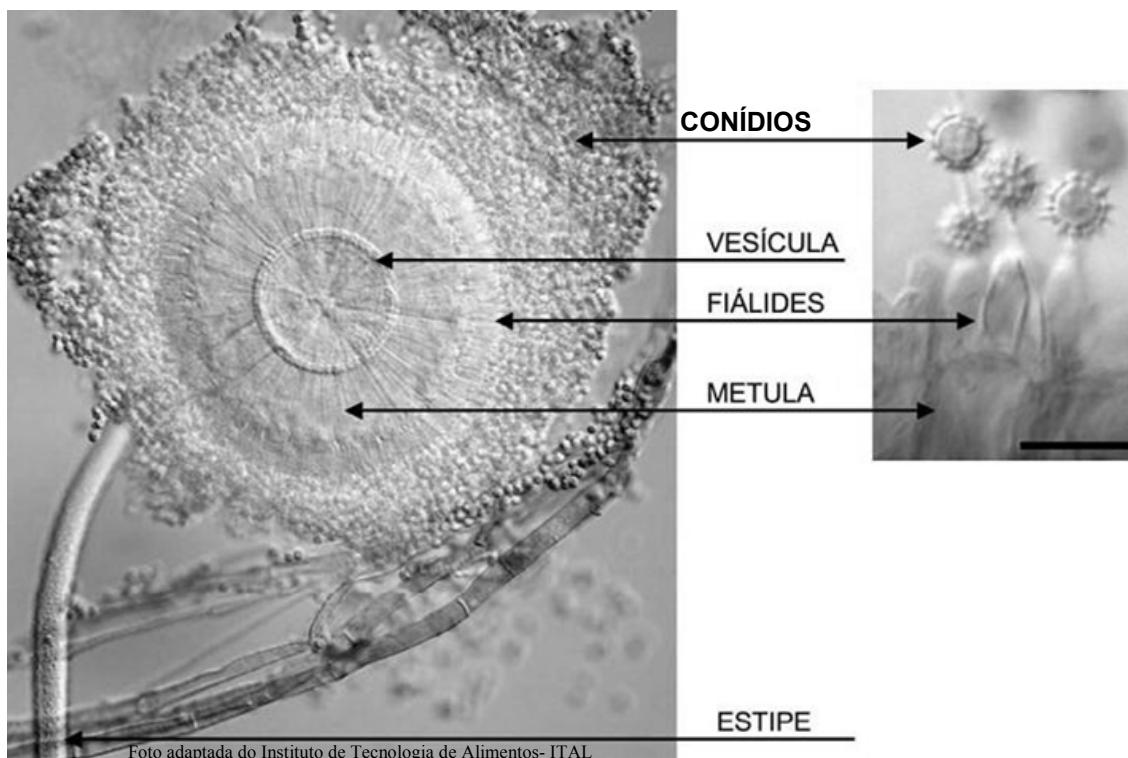
## **2.5- Gênero *Aspergillus***

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

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

A espécie *A. fumigatus* é a mais patogênica e afeta quase todos os órgãos, tecidos e sistemas do corpo, como por exemplo, causando oncomicosose, sinusite, aspergilose cerebral, meningite, endocardite, miocardite, aspergilose pulmonar, osteomielite, otomicose, endoftalmite, aspergilose cutânea, aspergilose hepato-esplênica, etc (CRUZ, 1996). São comuns as infecções respiratórias em aves e o aborto micótico em bovinos e ovinos causados principalmente por contaminação dessa espécie (ROSA, 2006).

As chaves de classificação atualmente utilizadas para a taxonomia de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram descritas por Samson et al. (1995); Klich; Pitt (2002) e mais recentemente Klich (2002). Segundo Klich (2002), para classificar as seções de *Aspergillus* sp. baseou-se nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas das colônias desenvolvidas nos meios agar extrato de malte (MEA), agar Czapek extrato de levedura (CYA), agar nitrato glicerol 25% (G25N) e agar Czapek extrato de levedura sacarose 20% (CY20S).



**FIGURA 01:** Conidióforo de *Aspergillus* sp. bisseriado (*A. ochraceus*) e terminologias das estruturas usadas na classificação e identificação. Escala = 10  $\mu$ m.

Segundo Klich (2002), as características macroscópicas mais importantes, do ponto de vista taxonômico, que devem ser observadas são: Cor e diâmetro das colônias; cor do micélio e do reverso da colônia; formação de esclerócios. E as características microscópicas mais



importantes do ponto de vista taxonômico e sistemático são: Conidióforo; vesícula e cabeça conidial; fiáldes e metulas; conídios, células de *Hülle* (Figura 1).

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

**TABELA 01:** Potencial toxígeno das principais espécies de *Aspergillus* que contaminam produtos vegetais.

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

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

### 2.5.1 *Aspergillus fumigatus*

Patógeno oportunista e contaminante de alimentos o *Aspergillus fumigatus* é a espécie que predomina em substratos processados de origem vegetal principalmente. Esta espécie

correlaciona-se com surtos de doenças em animais, bem como nos homens, em ambos os casos estes surtos normalmente são oriundos do contato com ambientes ou materiais contaminados (HIRSH; ZEE, 2003). São fungos que apresentam hifas septadas, conidióforos que são ramificações de hifas oriundas de uma borda celular presente no micélio vegetativo e terminando em uma vesícula expandida. Essa é coberta por uma ou várias camadas de fiárides, de onde emergem cadeias de conídeos pigmentados que são as unidades reprodutivas assexuadas que dão coloração a colônia fúngica. Quando em tecidos só é possível visualização do micélio, no entanto em cavidades que tem contato com o ar como vias respiratórias, podem aparecer conídeos (HIRSH; ZEE, 2003).

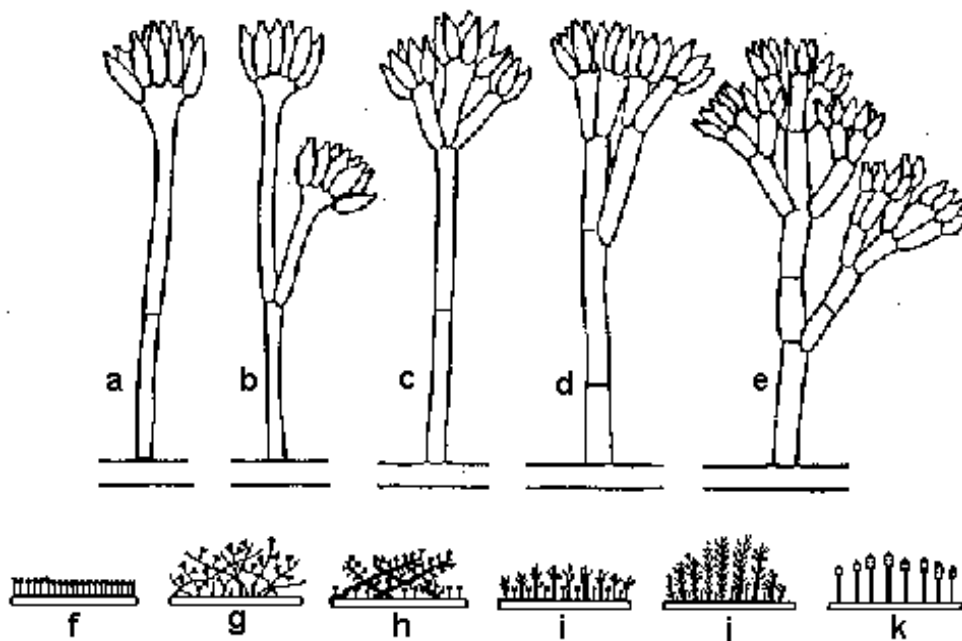
Grande parte dos indivíduos expostos não desenvolve patologias causadas pela exposição a esta espécie ou mesmo a demais outras espécies do gênero *Aspergillus*. As aspergiloses variam com manifestações de reações alérgicas até infecções generalizadas com risco de vida. A severidade da aspergilose é determinada por diversos fatores, e o mais relevante é o estado imunológico do indivíduo, quanto mais debilitado ou em condição de estresse este se encontra, mais propício é o surgimento de sintomas e ocorrência da patologia (HIRSH; ZEE, 2003). Assim resalta-se a importância do *A. fumigatus* como sendo a espécie mais frequente em infecções humanas e animais, bem como as mais graves, devido à patogenicidade das cepas (HIRSH; ZEE, 2003), seguido de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans* segundo Boudra e Morgavi (2005) e Denning (1998). A intensidade da exposição é uma característica significativa na aspergilose animal. Existem correlações de surtos de abortos bovinos relacionados a alimentos mofados (CRUZ, 1996), em frangos de corte a doença coincide com o reuso de cama com contaminação e também o estresse dos animais, devido ao manejo diário, mas principalmente durante o período gestacional, levam uma baixa de imunidade podendo ser mais frequentes surtos de aspergilose. (HIRSH; ZEE, 2003).

## **2.6- Gênero *Penicillium***

As espécies do gênero *Penicillium* também são saprófitas e tem ecofisiologia muito semelhante aos fungos do gênero *Aspergillus*. Da mesma forma muitas espécies são consideradas patogênicas, decompositoras, bem como podem ser utilizadas na produção de alimentos fermentados, como por exemplo, os conhecidos *P. roqueforti* e *P. camemberti* (PITT;HOCKING, 1997). Também podem produzir diversas classes de metabólitos secundários bioativos. São descritas também várias micotoxinas para esse gênero. Estes metabólitos são descritos como contaminante de grãos, alimentos e fluídos biológicos.

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

As chaves de classificação atualmente utilizadas para a taxonomia de espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* foram descritas por Pitt (1988), atualmente sendo utilizada principalmente em sua revisão proposta pelo mesmo autor Pitt; Hocking (1997). Onde apresentam várias espécies em sua forma anamórfica e associa-se com dois teleomorfos incluídos nos gêneros *Eupenicillium* e *Talaromyces*. Os autores definem as características macroscópicas mais importantes, do ponto de vista taxonômico, como: Diâmetro, textura, cor da colônia e seu reverso, bem como presença de exustado e pigmentos solúveis. Avalia-se também a formação de esclerócios, produção de gimnotécios ou cleistotécios.



**FIGURA 02-** “a – e”, tipos de ramificações do conidióforo: a e b, simples; c, biverticilado; d, triverticilado; e, quaterverticilado. “f – k”, tipos de colônias: f, aveludada; g, algodonosa; h, funicular; i - k, fasciculada. **Fonte:** Samson et al. (2000).

As características microscópicas mais importantes do ponto de vista taxonômico, segundo Pitt; Hocking (1997) são: caracterização do conidióforo; número e disposição das

métulas; forma das fiálides e a relação entre seu tamanho e das métulas; caracterização da estípede, conídios, ascos e ascosporos.

**TABLEA 02:** Potencial toxígeno das principais espécies de *Penicillium* que contaminam produtos vegetais.

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

**Fonte:** Pitt; Hocking (1997).

## 2.7- Gênero *Fusarium*

O *Fusarium* sp. é um fungo cosmopolita, compreendendo uma grande quantidade de espécies que são conhecidas por causar doenças em culturas de importância agrônômica, bem como patologias em humanos e animais. Juntamente com *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., o gênero *Fusarium* também é um dos contaminantes alimentares mais importantes. (SIDHU, 2002). Espécies do gênero *Fusarium* encontram-se amplamente distribuídas em plantas e no solo, sendo um importante fitopatógeno. Temos como exemplo a *Giberela*, causada pelo fungo *Gibberella zeae* (anamorfo *F. graminearum*), é uma doença de infecção floral sendo de importante diagnóstico para prevenção e combate nas lavouras de trigo e milho principalmente. Esse gênero cerca de vinte espécies, distribuídas em 12 seções. Pode-se

citar como espécies mais comuns o *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. chlamydosporum*. Liseola é a seção mais importante deste gênero, pois contém espécies potencialmente produtoras das micotoxinas mais frequentes, como o *F. verticillioides* e *F. graminearum*.

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

**TABLEA 03:** Potencial toxígeno das principais espécies de *Fusarium* que contaminam produtos vegetais.

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

**Fonte:** Adaptado de Bhatnagar et al., 2003.

## 2.8- Micotoxinas e micotoxicoses: características gerais

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

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

### **2.8.1- Aflatoxinas**

De acordo com Blount (1961), a aflatoxicose foi primeiramente detectada em 1960, sendo denominada de “Doença X dos perus”. O uso do farelo de amendoim de origem brasileira contaminado com esta micotoxina em rações para perus determinou a morte de aproximadamente 100.000 dessas aves na Inglaterra. Mais tarde foi descoberto que a causa dessa misteriosa doença ocorreu devido à presença de compostos que apresentavam fluorescência sob luz UV e cuja produção foi atribuída à espécie fúngica contaminante denominada *Aspergillus flavus*, dando lugar ao nome aflatoxinas (ASPLIN; CARNAGHAN, 1961).

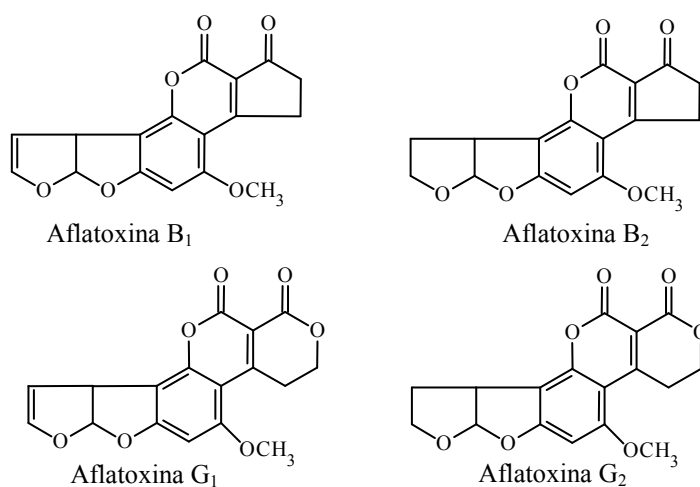
As aflatoxinas (AFs) são produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*. A AFB<sub>1</sub>, mais freqüente e mais tóxica, é reconhecida como o mais potente hepatocarcinógeno de origem biológica para o homem e os animais (IARC, 1993). Estas toxinas são encontradas como contaminantes naturais de cereais e rações e mesmo em baixas concentrações produzem alterações sobre o metabolismo, provocando danos à saúde e a produtividade do animal. Os efeitos mais freqüentemente observados pela ingestão desta toxina são a diminuição da velocidade de crescimento e da eficiência alimentar, causados pela redução do metabolismo protéico e absorção de gorduras e a supressão da resposta imune (IARC, 1993).

Há mais de 20 tipos de moléculas de AFs e seus derivados isolados, porém os principais tipos estudados continuam sendo a B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 2). Possuem uma estrutura química muito semelhante, bi-furanóide. As AFs da série B apresentam um anel ciclopentanona na molécula, enquanto que as da série G apresentam um anel lactona. Assim como outros compostos heterocíclicos, são substâncias fluorescentes com características próprias. Tanto a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) como a aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) apresentam uma

fluorescência azul, enquanto que a G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e a aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) apresentam uma fluorescência verde amarelada sob luz ultravioleta (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Produtos de origem animal também podem apresentar teores residuais de AFs biotransformadas através do sistema misto oxidase hepático do animal que as ingeriu, tais como a aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), o aflatoxicol (AFL), a AFB<sub>2</sub>, além da própria AFB<sub>1</sub>. Estas substâncias têm sido detectadas em leite e derivados; ovos e derivados; fígado, músculo e derivados cárneos (ROSA, 2002), (PEREIRA, 2005).

As AFs atuam no DNA levando à morte celular ou sua transformação em tumor. Devido à transferência de aflatoxina para o leite (transferência de 1,7% de AFB<sub>1</sub> da dieta para AFM<sub>1</sub> no leite), a maioria dos países regulamentou limites legais máximos na dieta (PEREIRA, 2005). A legislação brasileira (MAPA, 1988) admite um nível de contaminação máximo por aflatoxinas totais equivalente a 50 ppb; válido para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente em rações destinadas ao consumo animal. Porém o limite estabelecido pela comunidade europeia para rações animais é de menos de 20 ppb (GMP, 2006), menos da metade limite praticado em nosso país.



Fonte: Hussein e Brasel (2001).

**Figura 03:** Estruturas químicas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

Pode-se classificar as AFs como compostos de natureza cristalina, termoestáveis até temperaturas muito elevadas e solúveis em solventes polares, como o clorofórmio e metanol. São reativas a valores de pH menores que 3 e maiores que 10, e quando são expostas à luz UV em presença de oxigênio. São destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito (OPS, 1983).

Apesar das maiores concentrações serem encontradas em grãos que estão mal armazenados em ambientes quentes e úmidos, também é possível detectar concentrações significantes de AFs no campo, antes da colheita (PITTET, 1998). O milho e o amendoim continuam sendo as maiores fontes de contaminação principalmente na Índia e América do Sul, porém outros cereais produzidos em clima tropical bem como seus subprodutos também são susceptíveis à contaminação por esta micotoxina (MOSS, 1998).

### **2.8.1.1 - Toxicidade das Aflatoxinas**

A presença de AFs nos alimentos e rações tem sido objeto de grande preocupação no mundo científico, desde a sua descoberta. Particularmente a AFB<sub>1</sub>, têm despertado um grande interesse devido à existência de suficientes dados experimentais que indicam sua atividade tóxica, carcinogênica, teratogênica e mutagênica em animais de experimentação, além de diversos estudos epidemiológicos que indicam que a AFB<sub>1</sub> está envolvida na ocorrência de neoplasias gastrointestinais e hepáticas em países da África e China, entre outros (KEEHN; FRANK-STROMBORG, 1991). O carcinoma hepatocelular (CHC) é, mundialmente, um dos tipos mais comuns de câncer e diversos autores têm reportado a presença de AFs no soro e em biópsias de fígado de pacientes com câncer hepático (RUSTOM, 1997).

Com base nos estudos disponíveis, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) concluiu que existem evidências suficientes para considerar a AFB<sub>1</sub> como fator etiológico do câncer hepático em populações humanas, sendo então classificada no grupo 1 (IARC, 1993), além de ser considerada o mais potente carcinógeno de origem biológica conhecido (BENNETT; KLICH, 2003).

A absorção das AFs ocorre no trato gastrointestinal e a sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de função mista oxidase, associadas ao citocromo P-450 (BIEHL; BUCK, 1987). A AFB<sub>1</sub> é considerada uma das substâncias mais tóxicas para o fígado, sendo este o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990).

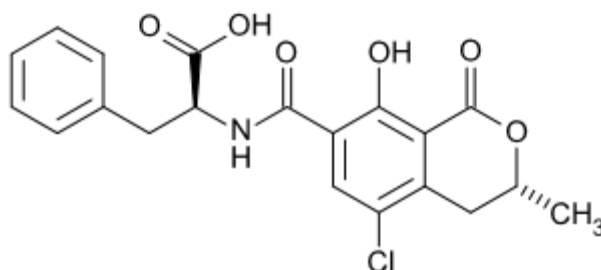
Embora o fígado seja o alvo primário, em muitos casos, lesões cancerígenas foram observadas nos rins, cólon, pulmão e glândulas lacrimais de vários animais alimentados com rações contaminadas por AFs (STOLOFF, 1977). Os efeitos metabólicos das AFs incluem inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, redução na atividade enzimática, depressão no metabolismo das glicoses, inibição da síntese de lipídios (incluindo fosfolipídeos, ácidos



graxos livres, triglicerídios e colesterol) e depressão da síntese de fatores de coagulação (BUSBY; WOGAN, 1984).

### 2.8.2- Ocratoxinas

As ocratoxinas são importantes toxinas de armazenamento. Presentes em regiões de clima temperado bem como tropical. A OTA A (Figura 3) é a mais importante das ocratoxinas sendo produzida por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, principalmente por *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. niger* agredado e *A. carbonarius* (MAGNOLI et al., 2005). O efeito primário da OTA em todas as espécies animais é a nefrotoxicidade, mas também relatam-se teratogênese, carcinogênese, imunossupressão. Porém tem sido demonstrado que a OTA afeta ruminantes, mas é rapidamente degradada em um rúmen com bom funcionamento, acreditando-se que tenha conseqüências menores do que outras micotoxinas, porém em níveis elevados podem prejudicar seu funcionamento pela degradação dos microrganismos presentes no suco ruminal (ROSA et al., 1985; CRUZ et al., 1985).



**Figura 04:** Estruturas químicas da Ocratoxina A.

### 2.8.3 - Citrinina

É uma importante micotoxina nefrotóxica para o homem, bovinos, eqüinos, cães, e principalmente para suínos e aves. Produzida por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, destacando-se entre estes, o *A. niveus*, *A. terreus*, *P. citrinum*, *P. verrucosum* e *P. viridicatum*. (ROSA et al., 1985; CRUZ, 1997).

A Nefropatia Micotóxica Suína (NMS) é uma patologia renal caracterizada por degeneração dos túbulos e conseqüente inibição de sua atividade. Extensos estudos

etiológicos têm revelado que a OTA é a maior causa de nefropatia em suínos (KROGH, 1992), embora outros fatores tais como a micotoxina citrinina possam estar envolvidos (ROSA et al., 1985). A patologia, tanto a de ocorrência natural como a experimentalmente induzida, tem sido amplamente estudada com relação aos aspectos clínicos, anátomo-histopatológicos e bioquímicos (FRIIS; HASSELAGER; KROGH, 1969; ELLING; MOLLER, 1973).

#### **2.8.4 – Gliotoxina e outros metabólitos produzidos por *A. fumigatus***

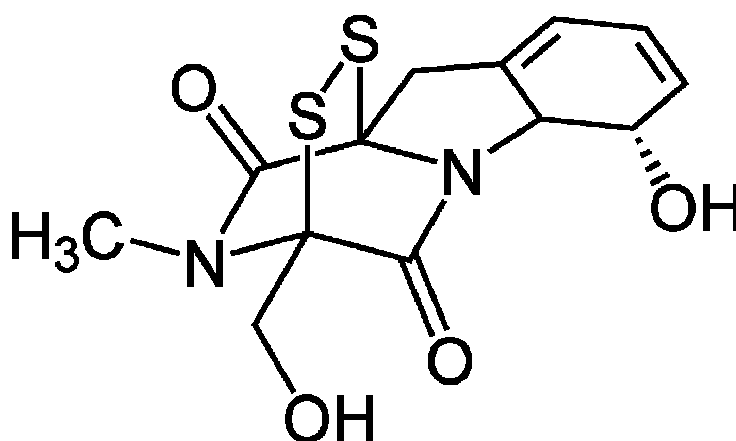
A gliotoxina, tripacidina, verruculogeno, tremórgenos e as fumigaclavinas são metabólitos correlacionados com a conidiogênese, crescimento e colonização do substrato. Neste sentido sua presença correlaciona-se a fatores de patogenicidade das cepas (PARKER e JENNER, 1968; KHOUFACHE et al., 2007; LATGE, 1999; RICHARD et al., 1996; LEWIS et al., 2005).

Tremórgenos são um grupo de toxinas produzidas por diferentes fungos: o fungo endofítico *Acremonium lolii*, que produz o lolitremo B e comumente infecta o azevém, produzindo o quadro conhecido como cambaleio por azevém. O *Claviceps paspali* é um ergot de cor pálida, globóide e rugoso que produz paspalitremo A e B, paspalanina e ácido lisérgico e parasita o paspalum. *P. crustosum*, *P. cyclospium*, *P. palitan* e *P. puberulum* produzem penitrem A.

Estas micotoxinas são caracterizadas por uma molécula de indol, que é parte de uma estrutura anelar complexa que inclui o ácido lisérgico. Os derivados do ácido lisérgico estão associados com a redução da concentração ou da função dos aminoácidos inibitórios (GABA e glicina), podendo ocorrer aumento da liberação de neurotransmissores e despolarização prolongada, e facilitação da transmissão sináptica no final da placa motora. Um segundo mecanismo potencial é a vasoconstrição dos vasos cerebrais o que pode levar a anóxia cerebral. Os efeitos observados incluem tremores leves de cabeça e pescoço, rigidez, ataxia, hipermetria, opistótonos e convulsões. Alguns animais podem tornar-se hostis ferindo-se a si próprios ou a outros. A morbidade é tipicamente alta, mas a mortalidade é baixa.

A gliotoxina normalmente mais predominante em grande parte das cepas e com efeitos mais descritos na literatura (KWON-CHUNG E SUGUI, 2009; RICHARD et al. 2009; SANTOS et al., 2006) é o metabólito mais estudado, produzido por cepas de *A. fumigatus*.

Não sendo esta espécie a única a produzir este metabólito, mas muitas leveduras principalmente do gênero *Candida* apresentam capacidade de produção. Pertence à família das epipolítiodioxopiperazinas (Figura 4), que se caracterizam pela presença de uma ponte dissulfeto em um anel de piperazina que é essencial para sua toxicidade (GARDINER; HOWLETT, 2005). A gliotoxina atua em várias vias metabólicas, promovendo fatores imunossupressivos (inibição da fagocitose por macrófagos, inibição da proliferação das células T ativadas por mitógenos e a resposta citotóxica dessas células, além da apoptose de macrófagos) segundo Yamada et al., 2000; Stanzani et al., 2005. Estudos recentes demonstraram que mais de 95% dos isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* produziram essa toxina, demonstrando sua importância como biomarcadoras principalmente em situações onde se avaliam casos de populações imunossuprimidas (KUPFAHL et al., 2008).



**Figura 05:** Estruturas químicas da Gliotoxina.

### 2.8.5- Fumonisinias e Deoxinivalenol

Diversas micotoxinas de *Fusarium* podem co-ocorrer em um ingrediente particular ou em rações comerciais. Em geral, combinações de toxinas deste gênero resultam em efeitos aditivos; interações de sinergismo e/ou potencialização e representam grande preocupação para a saúde e produtividade dos animais domésticos (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999). Não há regulamentação específica no Brasil, com relação aos limites máximos admissíveis para estas classes de micotoxinas. Estudo realizado pela Food and Agriculture Organization of the United Nations mostrava que apenas 6 países no mundo inteiro já haviam fixado seus valores limites (FAO, 2007).

Encontradas em várias culturas entram na cadeia produtiva através de ingredientes contaminados. Podem entrar nas dietas de ruminantes através dos concentrados ou forragens e são parcialmente metabolizados no rúmen. A FB1, a mais prevalente das fumonisinas, é metabolizada no rúmen de forma bastante lenta e baixa. Apesar disso, a fumonisina não parece afetar o metabolismo do rúmen. Nos ruminantes os órgãos alvo são o fígado e o rim. No entanto DON também será metabolizada no rúmen, no entanto afetando o metabolismo digestivo do bovino, promovendo emese e posteriormente perda do apetite, gerando perda de peso pelo animal, diminuindo sua capacidade produtiva. Os bovinos de corte e ovinos são mais tolerantes a FB1 e DON do que os bovinos leiteiros, sendo os efeitos associados mais comuns os de: redução do consumo de alimentos, ganho de peso, produção de leite, promovendo diarreia, emese e chegando a casos mais graves a gastroenterite e lesões intestinais. (SASSAHARA et al, 2003; MANSFIELD et al., 2005).

## **2.9 - Métodos de detecção das micotoxinas**

Métodos para a detecção e quantificação de micotoxinas têm sido desenvolvidos para análises de amostras de diversas origens. Metodologias de detecção rápida, com grande confiabilidade, bem como outras que tem maior sensibilidade e especificidade, buscando sempre garantir de forma segura os níveis presentes no material avaliado.

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

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

Procedimentos combinados têm sido os mais aplicados na rotina. A combinação de técnicas como CCD, ELISA, CLAE e Espectrometria de Massa (MS) ou Ressonância

Magnética nuclear (RMN) (RAMOS et al., 2002; NIEMINEN et al., 2002), são importantes para garantir técnicas de triagem confiáveis, bem como rapidez e segurança nos resultados finais.

A CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE MS/MS) tem sido muito utilizada para determinações quantitativas de micotoxinas e a grande vantagem é que estes métodos permitem a determinação simultânea de micotoxinas (avaliação multitoxina) presentes em uma amostra (SULYOK et al., 2006), essa tecnologia analítica permite a obtenção de resultados precisos e confiáveis.

Métodos imunológicos também são comumente utilizados, devido à sua sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade e baixo custo. Estes se utilizam de anticorpos específicos para isolar e/ou detectar as micotoxinas nos alimentos (VAN EGMOND, 1991). A interação entre antígenos (toxinas fúngicas) e anticorpos específicos são a base destes métodos imunológicos. Entre os métodos imunológicos utilizados na dosagem das micotoxinas os mais utilizados são o ELISA, sigla utilizada para denominar o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, aprovado como um método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para triagem de aflatoxinas, RIA (*Radio Imuno Assay*) ou radioimunoensaio e IAC (*Imuno Assay Colum*) ou colunas de imunoafinidade (MORTIMER et al., 1987).

O ELISA tornou-se um dos métodos oficiais de análises para micotoxinas, uma vez que permite a detecção com limites de quantificação mais baixos, é de mais fácil e rápida aplicação e, portanto mais econômico. A IAC tornou-se um método eficiente de triagem, já que as colunas contêm anticorpos seletivos imobilizados, assim o procedimento para o pré-tratamento da amostra total foram reduzidos a uma única extração em fase sólida constituindo-se em método extremamente sensível e adequado a detecção de micotoxinas, principalmente em líquidos, fluidos e tecidos biológicos (ROSA, 2002; MORTIMER et al., 1987).

## **CAPÍTULO I**

### **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA TOXÍGENA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE SILAGENS DE MILHO.**

## 1- INTRODUÇÃO

A suplementação na alimentação em épocas de seca quando a qualidade do pasto se torna inferior, é necessária para manutenção dos níveis nutricionais exigidos para continuidade dos índices de produção. Alimentos ensilados, principalmente silagens de milho (*Zea mays L.*, variedades Crioula e Transgênica Bt) vêm sendo utilizadas com essa finalidade. Os ganhos nutricionais para o rebanho com a utilização de silagens, com base de milho, são importantes para garantir a manutenção da produção, por ser uma forrageira importante e de alto valor nutricional para os animais. Porém problemas relacionados ao pouco cuidado no processamento, armazenamento e utilização deste material, bem como o demasiado tempo de uso extrapolando condições adequadas para conservação podem prejudicar o desempenho final do processo. Mudanças nos parâmetros de produção no desenvolvimento de bovinos destinados a carne e leite implicam na utilização de alimentos advindos das mais diferentes fontes de proteínas e carboidratos, principalmente ensilados, para garantir sua conservação e posterior uso. A utilização de novos insumos, principalmente resíduos do processamento industrial, tem por intenção promover com estes alimentos um melhor rendimento e destinação.

A contaminação fúngica de alimentos destinados ao consumo animal com conseqüente formação de micotoxinas constitui um problema de grande importância em nível mundial. As micotoxinas podem produzir efeitos adversos tais como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, nefrotoxicidade e imunossupressão provocando ou modulando diversas patologias, gerando perdas nas áreas de agricultura e de produção animal com milhões de dólares gastos em problemas relacionados à saúde humana (IARC, 1993; VASANTHI; BHAT, 1998). Considera-se que um dos aspectos mais importantes foi a mudança que a comunidade científica deu ao conceito de micotoxicose. O preocupante não é a contaminação por altos níveis de micotoxinas de ocorrência rara e esporádica, mas a ocorrência destes produtos tóxicos em pequenas quantidades em produtos vegetais básicos e seus de subprodutos. A ingestão diária e constante de pequenas quantidades destes compostos através de alimentos básicos, sem dúvida, possui papel importante na indução ou modulação de patologias nos animais e no homem. As subdoses de micotoxinas têm sido consideradas imunossupressoras, teratogênicas e carcinogênicas, modulando e modificando mecanismos bioquímicos, alterando e inativando enzimas e a biossíntese de macromoléculas importantes no equilíbrio fisiológico do organismo animal (WHITLOW, 2007).

Assim, este estudo busca determinar os níveis de contaminação, bem como a frequência de cepas e o risco destas serem potencialmente produtoras de micotoxinas em silagens de milho (*Zea mays L.*, variedades Crioula e Transgênica Bt) destinadas à alimentação de gado bovino de corte de algumas propriedades no estado de São Paulo. Buscando conhecer a qualidade micotoxicológica de silagens, bem como avaliar sobre que condições estas estarão sendo oferecidas e armazenadas, avaliando o risco a que estes animais que as consomem estão sendo submetidos e com isso propor em uso futuro, objetivando melhoras no alimento que estes animais consumirão e ganhos na pecuária.



## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Amostragem

Foram coletadas um total de 120 amostras de silagens de milho, amostradas de um total de 30 silos de milho no período de janeiro 2009/2010/2011 a outubro 2009/2010/2011. Todos os silos de onde foram coletadas as amostras estavam localizados em fazendas criadoras de gado de corte nos Estados de São Paulo, nos Municípios de Marília, Vera Cruz e Ourinhos sendo avaliados o milho e sorgo pré e pós-fermentado.

A coleta das amostras pré-fermentadas foi realizada durante a compactação, ou seja, logo após o material ser moído. Já as amostras de material pós-fermentado foram coletadas após o período de fermentação dos silos ( $\pm 90$  dias), coincidindo com o início do uso do silo a ser coletado.

As dimensões totais dos silos eram de aproximadamente 30 metros de comprimento X 15 metros de largura X 5 metros de altura. Para garantir uma amostragem correta desse material cada silo sofreu uma divisão linear imaginária em seu comprimento em 3 partes iguais; e de cada parte desta foram coletadas amostras (500g) das camadas superior (CS), inferior (CI), laterais (CL) e central (CC). Estas camadas estavam equidistantes em 2 metros uma das outras, em largura e altura (KELLER, 2009).

O material pré-fermentado foi colhido no decorrer da compactação. Foram, portanto, retiradas de CS, CI, CL e CC alíquotas de 500 gramas dos seguimentos. Após o fim das coletas foram obtidas um total de 24 sub-amostras por silo, totalizando três kilogramas por camada. Sendo então estas sub-amostras homogeneizadas, quarteadas e retirada uma alíquota única de cada camada dos seguimentos de cada silo. Este processo foi repedido mais duas vezes e restaram amostras de 500 gramas das camadas de cada silo.

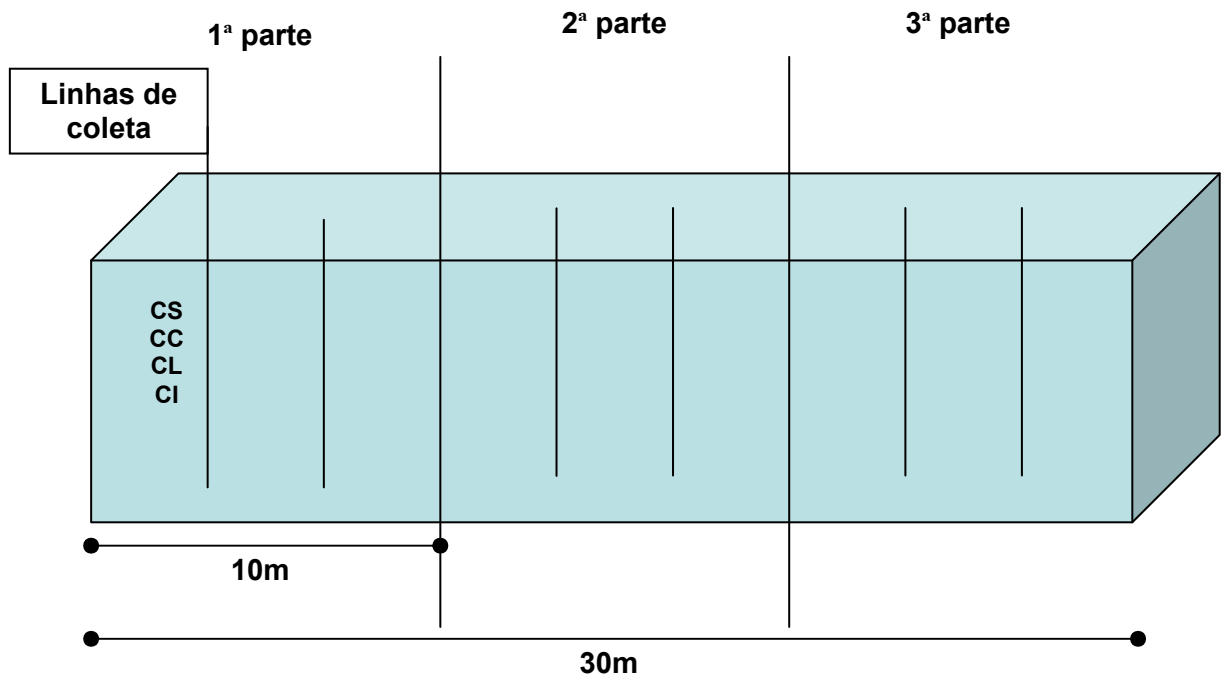
Após o período de 90 dias, tendo os silos fermentado iniciou-se uma nova coleta, agora com material pós-fermentação. Com a abertura dos silos para uso na propriedade, uma pá mecânica retira a porção oferecida aos bovinos é nesse momento em que a estrutura começa a ser rompida que foram retiradas as alíquotas da mesma forma que a etapa de pré-fermentação, com divisão linear igualitária do comprimento dos silos e retirada de amostras de 500 gramas das camadas propostas. Ao final do processo também foram obtidas 24 sub-amostras por silo analisado, realizando-se o processo de homogeneização e quarteamento semelhante até obtenção da amostra final.

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



Fonte: Arquivo pessoal

**FIGURA 06:** Vista frontal do silo, após período de fermentação de  $\pm$  90 dias. Esquema dos pontos de coleta nos silos.



**FIGURA 07:** Esquema divisão linear dos silos com linhas de coletas.

## 2.2- Avaliação física das amostras

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

### 2.2.1- Percentual de matéria seca

Foram levados 100 gramas de amostra, para uma estufa com circulação de ar, onde este material passou por um processo de secagem por 72 hs a 65°C. Após esse período, com o resultado obtido, foi calculada a diferença entre os pesos percentualmente (NEUMANN 2004; OHYAMA; MASAKI; HARA, 1975).

### 2.2.2- Atividade de água ( $A_w$ ) e pH

Para a determinação da atividade de água ( $A_w$ ) foi utilizado o equipamento AquaLab® modelo CX 2 (Decagon, Devices, Inc. USA), com o procedimento descrito a seguir. Primeiramente o aparelho foi ligado por cerca de 1 hora, para a estabilização da temperatura. A calibração foi feita através da utilização de uma solução de NaCl 6M, de atividade de água

0,760 e água destilada, cuja a atividade de água é igual a 1. Cada amostra foi colocada em um recipiente próprio, preenchendo cerca de 1/3 de sua capacidade, sendo efetuadas duas leituras. Calculando-se a média aritmética das leituras, foi obtida a atividade de água das amostras.

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

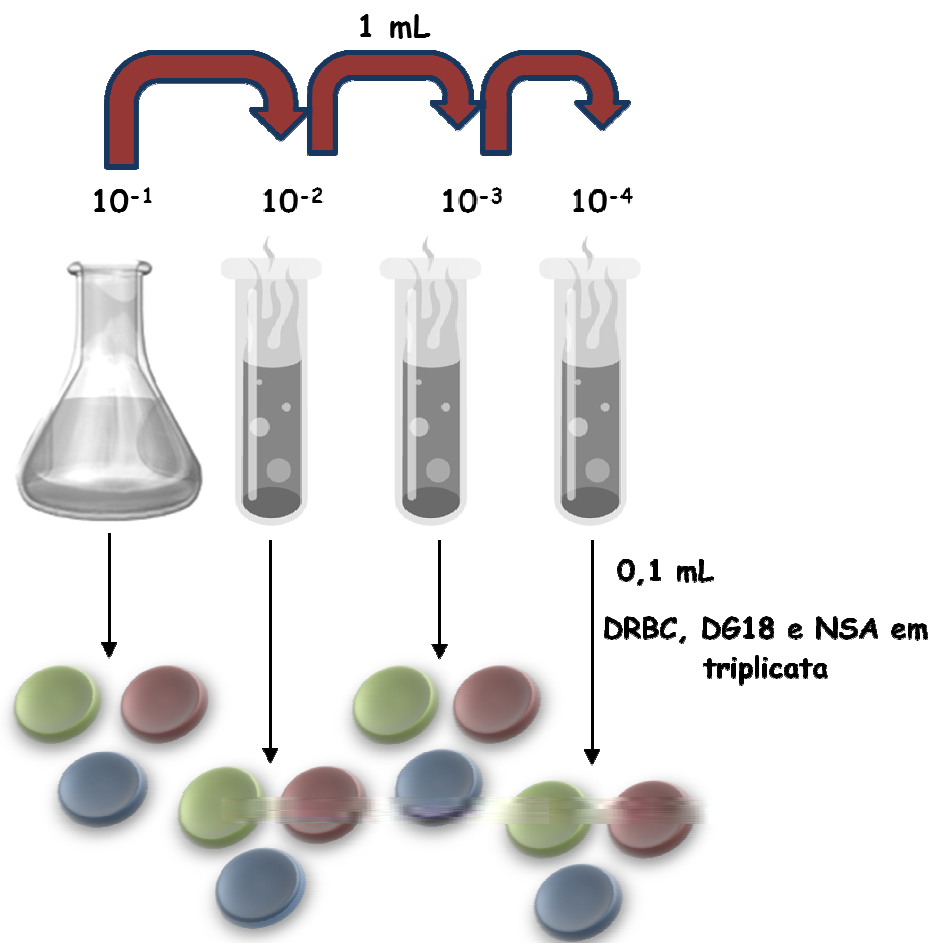
### **2.3- Dados climatológicos e localização geográfica**

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

### **2.4- Determinação da Micobiota**

A enumeração quantitativa de fungos filamentosos em unidades formadoras de colônias por grama de alimento (ufc g<sup>-1</sup>) foi realizada segundo a metodologia de diluição decimal seriada em placas descrita por Pitt; Hocking (1997), conforme a seguir: Agitou-se 10 gramas da amostra em 90 mL de água destilada estéril. A partir desta diluição inicial (10<sup>-1</sup>) prepararam-se diluições decimais seriadas até 10<sup>-4</sup>. Inoculou-se (em triplicata) alíquotas de 0,1 mL de cada uma das diluições em três meios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (PITT; HOCKING, 1997); agar dicloran glicerol a 18% (DG18) (HOCKING; PITT, 1980) e o Nash Snyder agar (NSA) (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983) (Figura 3). As placas foram incubadas a 25° C por cinco a sete dias em estufas microbiológicas com controle eletrônico de temperatura. Todas as placas foram

observadas diariamente, selecionando-se para enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 ufc g<sup>-1</sup>.



**FIGURA 08:** Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (ufc g<sup>-1</sup>).

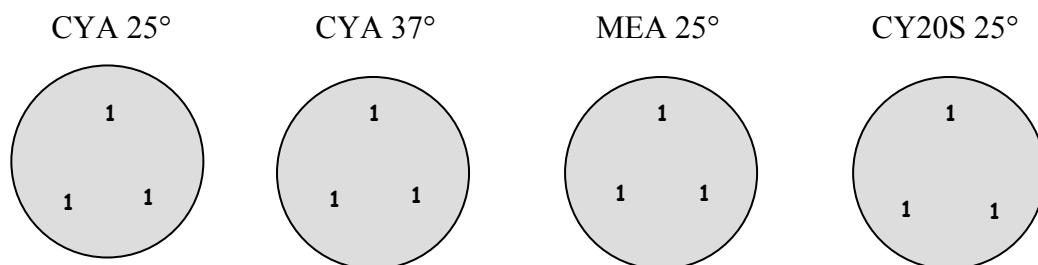
## 2.5 Isolamento e identificação fúngica

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

As cepas de fungos isoladas foram então identificadas segundo as chaves taxonômicas apropriadas de cada grupo particular: Klich (2002) para o gênero *Aspergillus*, Pitt (1988) para

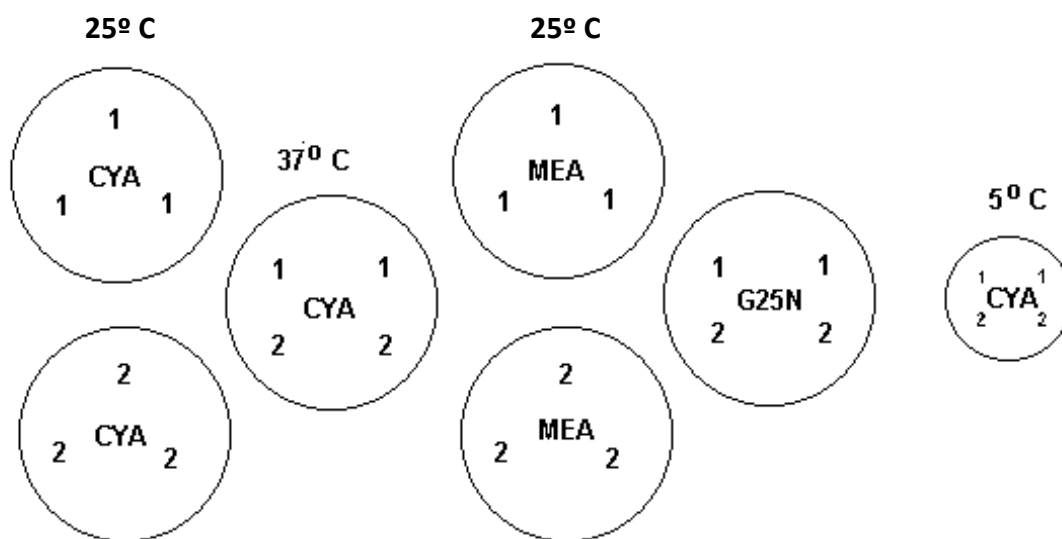
o gênero *Penicillium* e Nelson; Toussoun; Marasas (1983), com modificações, para espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.

A classificação de *Aspergillus* spp. foi baseada na semeadura padrão em três meios básicos (Figura 09): CYA; CY20S e MEA. Foi preparada uma suspensão de conídios a partir de cada cepa, em 0,5 mL de meio agar soft (0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80<sup>TM</sup>, distribuído em tubos Eppendorf, esterilização por autoclavação a 120°C por 15 minutos). A seguir, introduziu-se uma alça de platina em forma de agulha na suspensão de conídios inoculando-a nos meios de cultivo.



**FIGURA 09:** Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas. **Fonte:** Adaptado de Klich (2002)

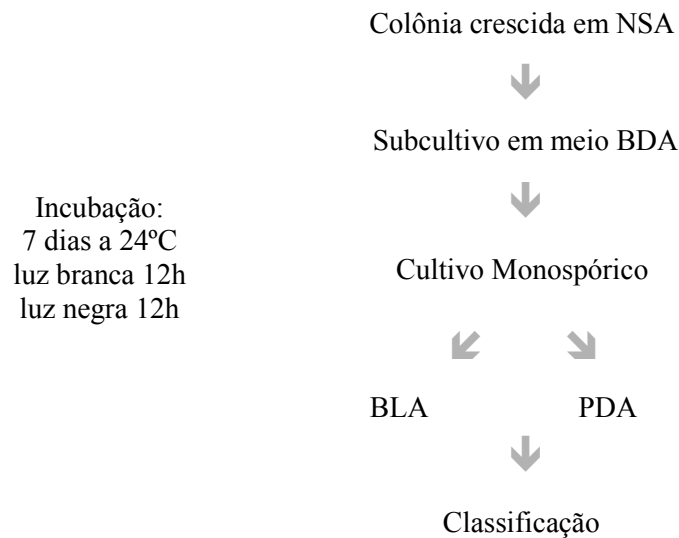
A chave proposta para *Penicillium* spp., foi baseada na semeadura em três meios básicos como: CYA; MEA e G25N (Figura 10); para maior eficiência e aproveitamento do sistema, inoculou-se as placas de Petri com duas cepas diferentes a serem testadas; a preparação do inóculo e inoculação nos meios de cultivo foi igual a utilizada para *Aspergillus* spp..



**FIGURA 10:** Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C). **Fonte:** PITT (1988).

As colônias de *Fusarium* spp. foram semeadas após cultivo monospórico nos meios BLA, modificando a metodologia original que utiliza o meio agar folhas de cravo (CLA) e no meio, em tubo inclinado, agar batata dextrose (BDA). As colônias foram incubadas por 7 dias a 24°C obedecendo foto período de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra (Figura 11), segundo metodologia descrita por Nelson; Toussoun; Marasas, (1983).

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



**FIGURA 11:** Esquema de incubação das cepas do gênero *Fusarium* nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final. **Fonte:** Adaptado de Nelson; Toussoun; Marasas (1983).

### 3.5.1- Determinação da frequência de distribuição de *A. fumigatus* em relação ao total de espécies fúngicas e espécies do gênero *Aspergillus*.

Determinou-se a densidade relativa, de forma percentual de *A. fumigatus* em relação ao total de espécies do gênero *Aspergillus* e segundo micobiota total isolada segundo Pereyra et al. (2008).

### 3.6- Caracterização do perfil toxígeno das espécies

As cepas fúngicas identificadas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CYA, agar extrato de levedura sacarose (YES) e agar leite de coco (CAM), segundo Lin; Dianese (1976).

Para fungos produtores de OTA foi utilizada a técnica descrita por Teren et al. (1996). Foram analisadas quanto a presença de fluorescência e capacidade toxígena por cultivo em YES, em placas de Petri de 90mm. As placas foram examinadas no sexto e sétimo dias em Cromatovisor Prodicil<sup>MR</sup> equipado com lâmpada de radiação ultravioleta de 30 watts com comprimento de onda de 365 nm, quando foi verificada ou não a presença de halo de fluorescência característica no meio, ao redor da colônia. No décimo dia foram retirados 3 plugs de 5 mm de diâmetro. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio previamente filtrado e



posteriormente centrifugado a 4000 rpm. Recolhido o sobrenadante, o evaporamos em tubos tipo Eppendorf, para posterior análise em CLAE, tendo sido estes, ressuspensos na fase móvel acetonitrila: água: ácido acético (57: 41: 2 v/v), quando procedemos a análise cromatográfica.

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

Para provar a capacidade de produzir aflatoxinas (AFBs) pelas espécies de *Aspergillus* da seção Flavi foi utilizada a metodologia descrita por Geisen et al. (1996). Cada cepa foi inoculada sobre MEA a 28 °C durante 7 dias. O micélio foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf*, pesado previamente e a extração das AFBs foi realizada com 500µL de clorofórmio. Sendo o extrato clorofórmico evaporado, posteriormente resuspenso em clorofórmio e analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) (G60 Merck, sem indicador de fluorescência). Como fase móvel se utilizou clorofórmio: acetona (9:1). A detecção das aflatoxinas foi realizada por comparação visual com soluções padrões de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 em luz UV de comprimento de onda larga (365 nm).

Para provar a capacidade das cepas de *A. fumigatus* inoculamos em dois meios. Em CAM, para observação de fluorescência com metodologia semelhante às aplicadas as demais espécies e o descrito por Santos et al. (2002), onde um plug de uma colônia de *A. fumigatus* previamente desenvolvida em MEA durante 7 dias incubado em caldo YES por 2 dias a 37°C

com movimento de 1400 rpm. Esse caldo YES, após esse período foi filtrado em papel filtro tipo Whatman Nº 1. O filtrado ficou em agitação com 50 mL de clorofórmio por 10 minutos e a fração clorofórmica separada e evaporada. O extrato foi resuspenso em 200 µL metanol e acondicionado em freezer até o uso. Os extratos foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F254 (20 x 20 cm, 250 µm, (Merck, Germany). A fase móvel utilizada foi clorofórmio:metanol (98:2 v/v).

## **2.7- Detecção e quantificação de micotoxinas**

### **2.7.1- Detecção e quantificação de aflatoxinas e ocratoxina A**

As cepas fúngicas identificadas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CYA, agar extrato de levedura sacarose (YES) e agar leite de coco (CAM), segundo Lin; Dianese (1976).

Para fungos produtores de OTA foi utilizada a técnica descrita por Teren et al. (1996). Foram analisadas quanto a presença de fluorescência e capacidade toxígena por cultivo em YES, em placas de Petri de 90mm. As placas foram examinadas no sexto e sétimo dias em Cromatovisor Prodicil<sup>MR</sup> equipado com lâmpada de radiação ultravioleta de 30 watts com comprimento de onda de 365 nm, quando foi verificada ou não a presença de halo de fluorescência característica no meio, ao redor da colônia. No décimo dia foram retirados 3 plugs de 5 mm de diâmetro. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio previamente filtrado e posteriormente centrifugado a 4000 rpm. Recolhido o sobrenadante, o evaporamos em tubos tipo Eppendorf, para posterior análise em CLAE, tendo sido estes, resuspenso na fase móvel acetonitrila: água: ácido acético (57: 41: 2 v/v), quando procedemos a análise cromatográfica.

As cepas de *P. citrinum* isoladas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CAM, em placas de Petri de 90 mm (ROSA, 1985, CRUZ, 1992). Da mesma forma as placas foram incubadas à temperatura de 25°C por sete dias, sendo examinadas no sexto e sétimo dias de incubação, em Cromatovisor Prodicil<sup>MR</sup>, quando a presença ou não de halo de fluorescência no meio. Após a verificação de fluorescência, todas as placas, tanto as de colônias positivas bem como as negativas, tiveram seu conteúdo completamente coletado e triturado em gral e pistilo juntamente com 30 mL de clorofórmio para a extração da toxina. O

macerado foi filtrado obtendo-se o extrato clorofórmico que a seguir foi concentrado, a um volume final de aproximadamente 1 mL, em rotavapor (PEMEM BM-102-ER) acoplado com banho-maria a 40°C. Os extratos foram testados qualitativamente através de CCD para confirmação dos resultados obtidos por CAM. Foram empregadas placas de 20x20 cm de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura (G60 Merck, sem indicador de fluorescência). Estas placas foram previamente ativadas por 60 minutos em temperatura de 130°C. Foram aplicados 5 µL de cada extrato e dos padrões em pontos eqüidistantes. Após o desenvolvimento por 50 minutos em cuba cromatográfica saturada, a cromatoplaça foi observada em cromatovisor sob radiação UV de  $\lambda=365\text{nm}$ , para evidenciação das manchas fluorescentes características.

Para provar a capacidade de produzir aflatoxinas (AFBs) pelas espécies de *Aspergillus* da seção Flavi foi utilizada a metodologia descrita por Geisen et al. (1996). Cada cepa foi inoculada sobre MEA a 28 °C durante 7 dias. O micélio foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf*, pesado previamente e a extração das AFBs foi realizada com 500µL de clorofórmio. Sendo o extrato clorofórmico evaporado, posteriormente resuspendido em clorofórmio e analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) (G60 Merck, sem indicador de fluorescência). Como fase móvel se utilizou clorofórmio: acetona (9:1). A detecção das aflatoxinas foi realizada por comparação visual com soluções padrões de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 em luz UV de comprimento de onda larga (365 nm).

Para provar a capacidade das cepas de *A. fumigatus* inoculamos em dois meios. Em CAM, para observação de fluorescência com metodologia semelhante às aplicadas as demais espécies e o descrito por Santos et al. (2002), onde um plug de uma colônia de *A. fumigatus* previamente desenvolvida em MEA durante 7 dias incubado em caldo YES por 2 dias a 37°C com movimento de 1400 rpm. Esse caldo YES, após esse período foi filtrado em papel filtro tipo Whatman N° 1. O filtrado ficou em agitação com 50 mL de clorofórmio por 10 minutos e a fração clorofórmica separada e evaporada. O extrato foi resuspendido em 200 µL metanol e acondicionado em freezer até o uso. Os extratos foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F254 (20 x 20 cm, 250 µm, (Merck, Germany). A fase móvel utilizada foi clorofórmio:metanol (98:2 v/v).

## 2.7.2- Detecção e quantificação de fumonisina B<sub>1</sub> e deoxinivalenol

Foram utilizados *kits* comerciais desenvolvidos e produzidos pela ROMER<sup>®</sup>. (Maine – EUA). Os *kits* ROMER<sup>®</sup> em placa e tubos utilizam o método de ELISA competitivo indireto para análise quantitativa das micotoxinas.

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

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

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

Os calibradores (padrões) de DON utilizados no *kit* corresponderam a 0, 0,2, 1, 2 e 8 µg/L (ppm), e para FB<sub>s</sub> foram 0, 0,3, 1, 3 e 6 µg/L (ppm).

### **2.7.3- Detecção e quantificação de gliotoxina em relação à ocorrência de *A. fumigatus***

Para gliotoxina será utilizada a metodologia de extração e detecção proposta por Boudra; Morgavi (2005), junto com a determinação da frequência de cepas de *A. fumigatus*. As amostras foram secadas em estufa com circulação forçada de ar a 48°C por 72hs. Adicionamos 10 mL de água destilada em frascos contendo 10 gramas de amostra, juntamente também adicionamos 40 mL de diclorometano (DCM). Solvente e amostra ficaram em contato por duas horas em temperatura controlada e agitação mecânica por quinze minutos. Filtrado em papel filtro (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA). Três mL do extrato filtrado foi evaporado em rotaevaporador e resuspendido em 50 uL metanol:água (1:1, v/v) e seguimos com a análise para gliotoxina em CLAE. A separação de Gliotoxina ocorrerá em uma coluna Nucleosil C18 de fase reversa (150 mm×4.6 mm, 5 µm) junto com uma pré-coluna Nucleosil C18, usando um sistema de gradiente de solventes. (solvente A= 10 mL L-1 de ácido acético e solvente B= acetonitrila). O programa de solventes seguirá a seguinte ordem: porcentagem inicial do solvente B será de 10%, seguindo será de 50% em 30 minutos e então 90% por 4 minutos, baixando em seqüência para 10% em 2 minutos num fluxo de 2 mL min-1. O tempo de retenção da gliotoxina é de 14 minutos e a detecção é feita em 254 nM.

### **2.8- Análises Estatísticas**

A análise estatística dos dados foi feita por uma observação da variância através da transformação dos dados em bases logarítmicas. Todos os dados foram transformados usando a função logarítmica  $\log_{10}(x + 1)$  antes da ANOVA. Serão comparadas as médias das contagens totais de propágulos fúngicos nos meios de isolamento geral e substratos de milho e sorgo avaliados. Serão comparados os níveis de micotoxinas nos substratos de milho e sorgo ensilados, nos diferentes níveis de coleta do silo e comparados também o material pré e pós fermentado (STEEL; TORRIE, 1985; AGRESTI, 1990; PEREYRA, 2008). O teste de Duncan foi utilizado na comparação dos dados de enumeração fúngica nos diferentes meios de cultivo, e o teste LSD de Fisher foi o escolhido para a comparação dos dados de quantificação das micotoxinas e avaliações físicas. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (*SAS Institute, Cary, NC*).

### 3- RESULTADOS

#### 3.1- Avaliação física das amostras, dados climatológicos e localização geográfica

##### 3.1.1- Avaliação física das amostras

Das amostras destinadas as avaliações micotoxicológicas foram realizadas avaliações físicas, de acordo com Ohyama, et al. (1975), Neumann et al. (2004), Ribeiro et al. (2007) e Keller (2009). Foram avaliados a semelhança da bibliografia consultada: os parâmetros de pH, matéria seca das amostras e  $A_w$ , onde se buscava observar as condições que o material ofereceria a desenvolvimento fúngico. Os dados expostos nas Tabelas 04 e 05 (abaixo) estão separados por milho pré e pós-fermentado:

**TABELA 04:** Características físicas do milho pré-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.

Seção de Amostragem	pH	$A_w$	Temp (°C)	Matéria Seca (%)
	Média ± S	Média ± S	Média ± S	Média ± S
Superior	5,22 ± 0,71	0,872 ± 0,61	26,53 ± 0,48	48 ± 0,22
Intermediário	5,79 ± 0,56	0,880 ± 0,59	26,58 ± 0,55	45 ± 0,18
Inferior	5,91 ± 0,78	0,899 ± 0,49	26,43 ± 0,33	46 ± 0,17
Laterais	5,10 ± 0,72	0,874 ± 0,59	26,42 ± 0,47	46 ± 0,12

S: desvio padrão;  $a_w$ : atividade de água; Temp: temperatura.

**TABELA 05:** Características físicas do milho pós-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.

Seção de Amostragem	pH	$A_w$	Temp (°C)	Matéria Seca (%)
	Média ± S	Média ± S	Média ± S	Média ± S
Superior	4,22 ± 0,71	0,792 ± 0,52	26,53 ± 0,48	42 ± 0,27
Intermediário	4,19 ± 0,56	0,770 ± 0,23	26,58 ± 0,55	40 ± 0,19
Inferior	3,91 ± 0,78	0,739 ± 0,17	26,43 ± 0,33	38 ± 0,23
Laterais	4,10 ± 0,72	0,766 ± 0,31	26,42 ± 0,47	42 ± 0,22

S: desvio padrão;  $a_w$ : atividade de água; Temp: temperatura.

Para o milho pré-fermentados tiveram variações pH, respectivamente de 5,0 a 6,0. Atividade aquosa variando de 0,812 a 0,910. Matéria seca variando de 48 a 45%.

Para o milho pós-fermentados tiveram variações respectivamente de pH aproximadamente 3,0 a 5,0. Atividade aquosa variando de 0,726 a 0,850. Matéria seca variando de 38 a 42%. As Figuras 13 e 14 em anexo, mostram a condição do material pós-fermentado, bem como as condições que os silos são mantidos nas propriedades.

##### 3.1.2- Dados climatológicos e localização geográfica

A Tabela 06 abaixo mostra valores médios de temperatura, umidade relativa e pluviosidade aferidos durante o período de janeiro de 2009 a julho de 2012.

**TABELA 06:** Temperatura, umidade relativa e pluviosidade média durante o período

Período Avaliado	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Pluviosidade Média
	Média ± S	Média ± S	Média ± S
Junho 2007	34 ± 0,3	45 ± 1,0	7,5 ± 1,0
Julho 2007	16 ± 1,0	30 ± 1,0	11,5 ± 0,6
Agosto 2007	22 ± 0,5	33 ± 0,6	10,0 ± 0,8
Setembro 2007	29 ± 0,3	35 ± 0,7	13,5 ± 0,8
Outubro 2007	29 ± 0,5	40 ± 1,0	27,5 ± 1,2
Fevereiro 2008	30 ± 0,8	50 ± 1,0	42,5 ± 1,4
Março 2008	30 ± 0,7	65 ± 0,7	50,0 ± 1,0
Abril 2008	29 ± 0,4	55 ± 0,8	40,0 ± 0,5
Mai 2008	24 ± 0,5	45 ± 0,4	30,0 ± 0,4

S: desvio padrão;

Dados foram retirados dos boletins mensais divulgados pelo INMET - CPTEC / INPE no período 2009 a 2010, 2010 a 2011 e 2011 a 2012.

Para o Brasil os alimentos ensilados na bovinocultura de modo geral têm especial importância durante determinados períodos do ano. Nestes períodos críticos para utilização dos silos temos médias de temperatura ainda altas e umidade relativa do ar baixa.

Nota-se que os locais de coleta apresentaram nos períodos avaliados, um aumento de 2°C em relação à temperatura média brasileira (28°C); uma diminuição de 4 mm<sup>3</sup> diários de chuva em relação a pluviosidade média do Brasil neste mesmo período (40 mm<sup>3</sup>/dia) e menos 2% de umidade relativa em relação a média do país (48%) no período também avaliado.

### 3.2- Contaminação fúngica

A carga fúngica contaminante feita através da enumeração dos propágulos fúngicos e expressa por unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada (ufc g<sup>-1</sup>) estão apresentadas nas Tabelas 07 e 08, separadas segundo a sua condição de estado fermentativo (pré e pós-fermentado). Nas figuras 15 e 16, em anexo, temos uma inoculação por superfície dos grãos de milho do período de coleta de 2009 a 2010.

Como o limite de detecção da técnica é de 10<sup>2</sup> ufc.g<sup>-1</sup>, preferiu-se não expressar nas tabelas as contagens de NSA, pois a variação ficou abaixo do limite de detecção, sendo exposta apenas sua variação (PITT; HOCKING, 1997). O meio NSA é seletivo para fungos do gênero *Fusarium* (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983). Para Agar NSA os valores de contagem de todas as camadas ficaram entre  $\leq 1.0 \times 10^2$  -  $2.0 \times 10^2$  ufc.g<sup>-1</sup>, tanto para o material pré e pós-fermentado de milho.

**TABELA 07:** Contagem fúngica do milho pré-fermentado em diferentes meios de cultivo.

Seção de Amostragem	DRBC			DG 18		
	Máx.	Mín.	Média ± S	Máx.	Mín.	Média ± S
Superior	$1,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3 \pm 4,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^3$
Intermediário	$3,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4 \pm 8,5 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3 \pm 7,0 \times 10^3$
Inferior	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4 \pm 6,6 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^5$
Laterais	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4 \pm 5,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3 \pm 4,1 \times 10^3$

S: desvio padrão; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo;

**TABELA 08:** Contagem fúngica do milho pós-fermentado em diferentes meios de cultivo.

Seção de Amostragem	DRBC			DG 18		
	Máx.	Mín.	Média ± S	Máx.	Mín.	Média ± S
Superior	$1,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 \pm 3,9 \times 10^3$
Intermediário	$1,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4 \pm 8,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^3$
Inferior	$3,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$5,2 \times 10^4 \pm 9,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^5$
Laterais	$3,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^3$

S: desvio padrão; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo;

O limite máximo recomendado para assegurar a qualidade higiênica dos produtos é de  $1,0 \times 10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> (GMP, 2006). A Tabela 09 expressa em valores percentuais quantidade de amostras que tiveram suas contagens de carga fúngica no meio DRBC acima do limite proposto pela GMP, (2006). Sendo o DRBC utilizado por conferir as características necessárias para desenvolvimento da microbiota presente nas amostras e por esse motivo ser o meio de cultivo utilizado para aferir a carga fúngica das amostras.

**TABELA 09:** Percentual de amostras de milho contaminadas acima dos limites recomendados.

Milho	DRBC
Pré-fermentado	37%
Pós-fermentado	70%

**TABELA 10:** ANOVA das contagens fúngicas comparando diferentes fazendas, substratos pré e pós-fermentados (meio) e setor dos silos avaliados.

Fonte	Quadrado Médio	F	P
Fazenda	0,87204785	2,05	0,1288
Meio	24,46175248	57,60	0,0001
Setor	1,90210083	4,48	0,0039
Faz*meio	21,21333652	52,86	0,0001
Faz*setor	0,92364343	2,17	0,0431
Faz*meio*setor	0,54067679	1,27	0,1493

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



**TABELA 11:** Média e desvio dos silos pré e pós-fermentados de milho.

Tipo de Alimento	Milho
	média ± desvio padrão
Pré-fermentado - CS	$6,5 \times 10^3 \pm 4,0 \times 10^3$ <sup>a, c</sup>
Pré-fermentado - CI	$1,6 \times 10^3 \pm 8,5 \times 10^3$ <sup>a, c</sup>
Pré-fermentado - CL	$1,5 \times 10^3 \pm 6,6 \times 10^3$ <sup>a, c</sup>
Pré-fermentado - CC	$1,5 \times 10^3 \pm 5,5 \times 10^3$ <sup>a, c</sup>
Pós-fermentado - CS	$1,3 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^4$ <sup>b, c</sup>
Pós-fermentado - CI	$5,3 \times 10^4 \pm 4,5 \times 10^4$ <sup>b, d</sup>
Pós-fermentado - CL	$7,2 \times 10^4 \pm 6,1 \times 10^4$ <sup>b, d</sup>
Pós-fermentado - CC	$3,3 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ <sup>b, c</sup>

<sup>a</sup> médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,0001$ ).

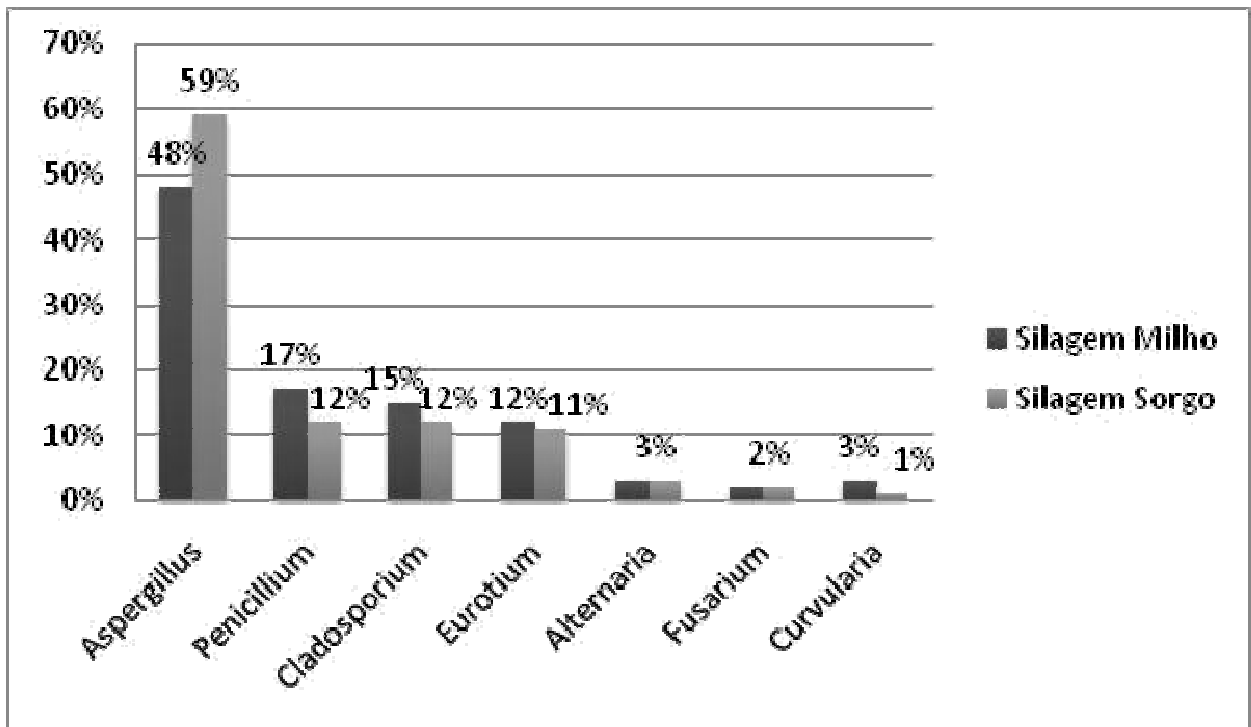
Das contagens fúngicas do milho pré-fermentado e após serem ensilados (pós-fermentado) observou-se um aumento na carga fúngica com o processo de fermentação, efeito observado na Tabela 11, confirmada com uma diferença significativa através da análise estatística dos valores, com índice de significância em  $P \leq 0,0001$ , se observou diferença estatística significativa entre a carga fúngica dos materiais pré e pós-fermentados.

Tais dados foram expressos na Tabela 11, onde as letras A e B representam estas diferenças que ocorreram entre o material pré e pós-fermentado. Também foi observado neste estudo, diferenças entre as camadas do silo amostradas, nos silos de milho, os quais demonstram com um índice de significância ( $P \leq 0,0001$ ), quando submetido ao teste de Fisher observou-se diferenças significativas entre as camadas superiores e médias com as camadas inferiores e laterais, onde as letras C e D representam estas que ocorreram.

### 3.3- Determinação da micobiota

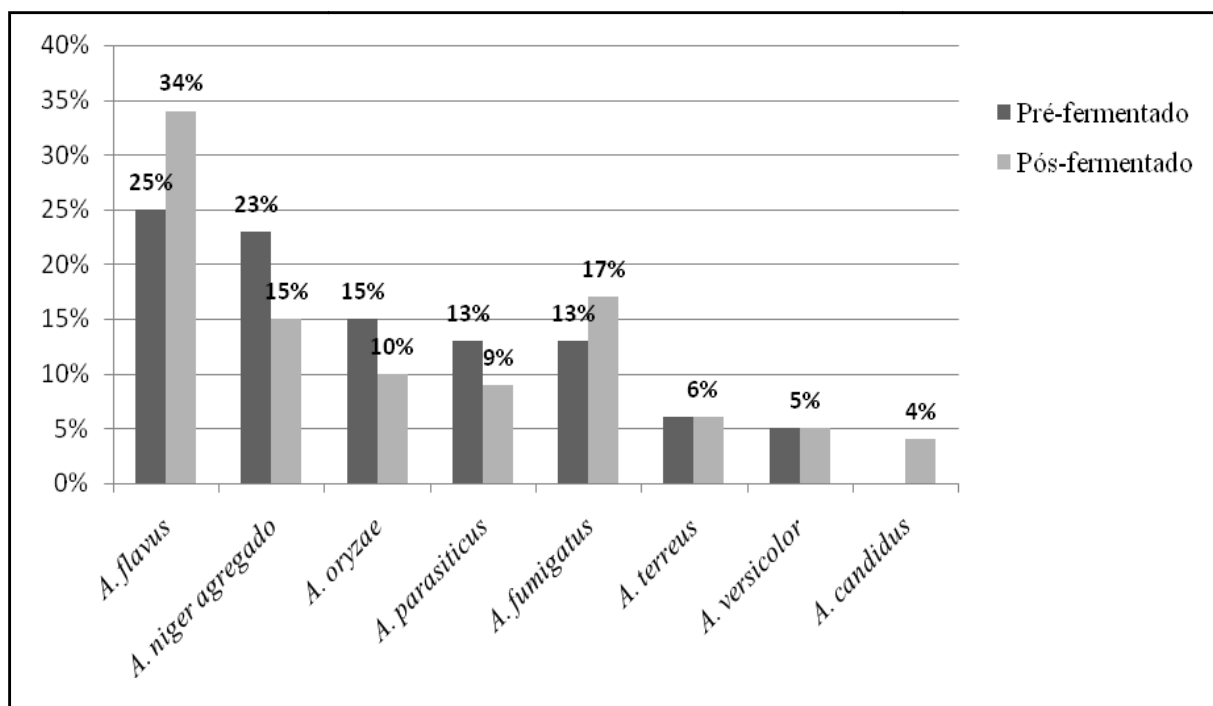
A distribuição dos gêneros isolados das amostras de milho pode ser observada na Figura 12. Foram isoladas 262 cepas fúngicas das amostras de milho sendo estas pertencentes a sete gêneros filamentosos e leveduras. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e seus teleomorfos, *Penicillium* e *Fusarium* foram alguns exemplos da micoflora isolada. Estes gêneros englobam a grande maioria das espécies citadas na literatura como produtoras de micotoxinas. Na Figura 12 podemos observar que nos silos de milho pré-fermentado se encontrou uma contaminação variada, mas semelhante à encontrada no silo após aberto no

período de fermentação. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e seus teleomorfos têm uma alteração em sua frequência, *Penicillium* e *Fusarium*.



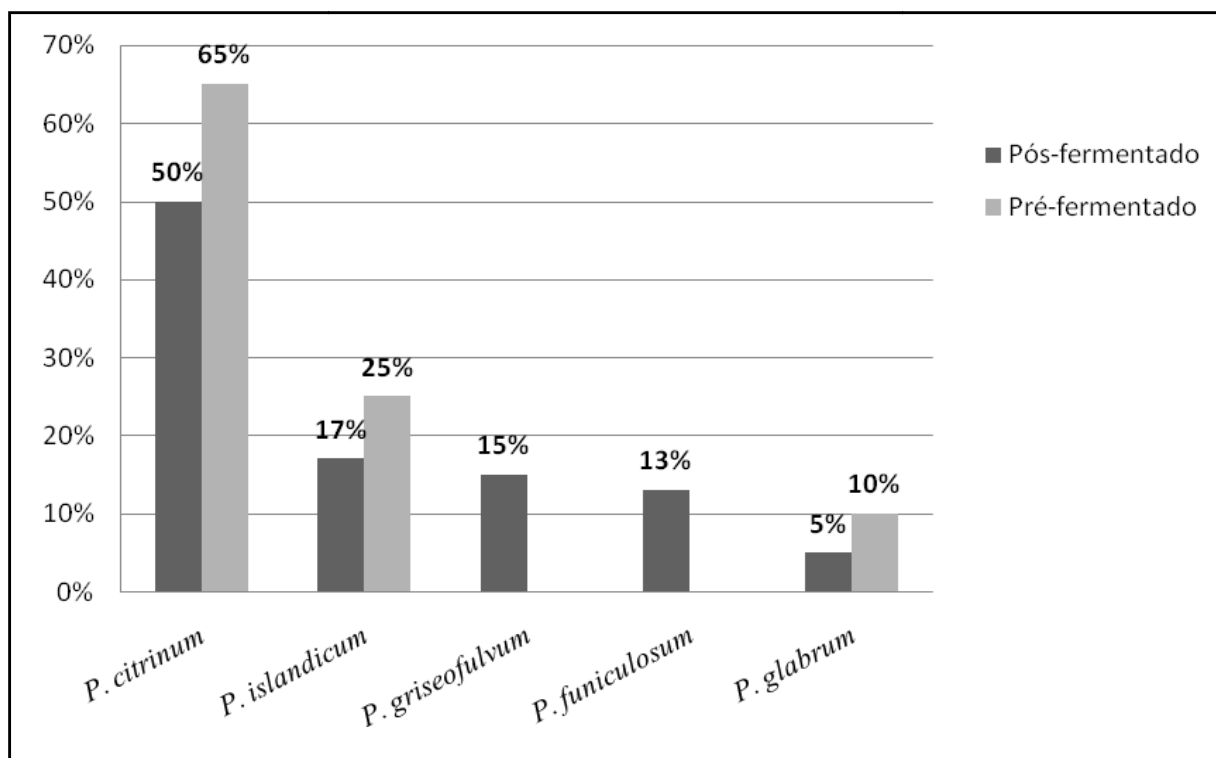
**FIGURA 12:** Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados no milho e sorgo pré e pós-fermentado.

Foram isoladas um total de 65 cepas do gênero *Aspergillus* no milho pré-fermentado e 97 cepas no milho pós-fermentado. Na Figura 13 observou-se a ocorrência de algumas espécies tanto no milho pré como o pós-fermentado, sendo identificadas as espécies dos gêneros potencialmente produtores de micotoxinas: *A. flavus* (67%), *A. parasiticus* (3%), *A. oryzae* (8%), *A. fumigatus* (22%), *A. niger agregado* (5%), *A. versicolor* (3%), *A. terreus* (3%) e *A. candidus* (4%).



**FIGURA 13:** Densidade relativa (%) de espécies de *Aspergillus* no milho pré e pós-fermentado.

Foram isoladas 19 cepas de *Penicillium* sp. na fase pré-fermentativa e 82 isoladas na fase pós-fermentativa. Cinco espécies do gênero *Penicillium*, foram identificadas neste estudo (Figura 13) *P. funiculosum*, *P. islandicum* e *P. citrinum*. No milho pré-fermentado foi encontrada a ocorrência de três espécies nas seguintes freqüências: *P. citrinum*, *P. islandicum* e *P. glabrum*. As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*, tiveram a seguinte distribuição: *P. citrinum* (90%), *P. clavatus* (4%), *P. funiculosum* (3%), *P. islandicum* (3%).



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

### 3.4- Contaminação fúngica por Cepas de *Aspergillus Fumigatus*

A avaliação do percentual de ocorrência desta espécie nos substratos e camadas dos silos demonstra a importância no nível de contaminação presente nas amostras selecionadas.

**TABELA 12:** Percentual de amostras de milho contaminadas por *Aspergillus fumigatus*.

Silagem Milho	DRBC
Pré-fermentado	12%
Pós-fermentado	76%

Em outra avaliação apresentada na Tabela 13 possibilita avaliar em que camadas sofreram maior contaminação por esta espécie e qual era a carga contaminante na camada específica em relação à microbiota contaminante geral.

**TABELA 13:** Contaminação de *A. fumigatus* por camadas dos silos de milho.

Tipo de Alimento	Milho	<i>A. fumigatus</i>
	DRBC (UFC g <sup>-1</sup> )	Frequência (UFC g <sup>-1</sup> )
Pré-fermentado – CS	6,5 x 10 <sup>3</sup>	2.0 x 10 <sup>2</sup>
Pré-fermentado – CI	1,6 x 10 <sup>4</sup>	ND
Pré-fermentado – CL	1,5 x 10 <sup>4</sup> c	2.0 x 10 <sup>2</sup>
Pré-fermentado – CC	1,5 x 10 <sup>4</sup>	ND
Pós-fermentado – CS	1,3 x 10 <sup>4</sup>	2.0 x 10 <sup>3</sup>
Pós-fermentado – CI	3,3 x 10 <sup>4</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>
Pós-fermentado – CL	5,2 x 10 <sup>4</sup>	2.0 x 10 <sup>2</sup>
Pós-fermentado – CC	3,3 x 10 <sup>4</sup>	4.0 x 10 <sup>2</sup>

### 3.5- Perfil toxígeno: habilidade como produtora

Dentre as cepas de *P. citrinum* isoladas (23 cepas), 75% destas foram capazes de produzir citrinina quando cultivadas em CAM e confirmadas por CCD. Depois de quantificadas pela mesma técnica, os índices ficaram entre 1 e 2 ppm (limite de quantificação: níveis  $\geq 0,5$  ppm).

Quanto às cepas de *A. niger agregado* (foram isoladas um total de 49), 18% se mostraram fluorescentes, de coloração esverdeada no CAM e 23% foram ocratoxígenas (OTA), confirmadas por CLAE e com índices de produção em torno de 2-10 ppm (limite de quantificação: níveis  $\geq 0,01$  ppm).

Com relação à secção Flavi foram alcançadas as seguintes observações: 60% das cepas de *A. flavus* produziram uma fluorescência azulada no CAM e foram aflatoxígenas (AFB1 e AFB2), quando testadas pela metodologia proposta e índices variando de 1-5 ppb. Já as cepas de *A. parasiticus* tiveram pouca correspondência no CAM, pois em torno de 40% das cepas demonstraram fluorescência, mas tivemos durante a confirmação das mesmas um índice de 75% de produtividade, porém com índices semelhantes aos da espécie *A. flavi* 1-5 ppb. O limite de quantificação: níveis  $\geq 0,5$  ppb.

Para à secção Fumigati foram alcançadas as seguintes observações: cerca de 65% das cepas de *A. fumigatus*, isoladas de amostras de milho produziram fluorescência no CAM e YES, indicando produção de gliotoxina (GLIO), todas as cepas foram avaliadas por técnicas

cromatográficas e quando testadas pelas metodologias proposta tiveram níveis distintos de produção, nos quais os índices podem ser avaliados na Tabela 14 abaixo. Os limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são respectivamente:  $\geq 0,3$  ppm e  $\geq 0,5$  ppm

**Tabela 14-** Produção de Gliotoxina, por cepas de *Aspergillus fumigatus* em silagem de milho.

Amostras		Produção de Gliotoxina de <i>A. fumigates</i> (mg/L) <sup>b</sup>		
		Cepas positivas <sup>a</sup>	(%)	Concentração
Milho	Pré-fermentado	8/13	61.50	0.1-5
	Pós-fermentado	42/67	65	0.1-60

<sup>a</sup> Número de cepas <sup>b</sup> LOD:  $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ , LOQ:  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$

### 3.6- Análises micotoxicológicas

#### 3.6.1- Aflatoxinas

Ao serem realizadas as análises das amostras, foi detectada a presença de aflatoxinas. Os dados para a avaliação das silagens de milho podem ser observados nas Tabelas 15. Foram encontrados índices de positividade de aproximadamente 35% das amostras contaminadas de milho pré-fermentado, com níveis variando de  $2-5 \mu\text{g Kg}^{-1}$  e índices de positividade de aproximadamente 43% das amostras contaminadas de milho pós-fermentado, com níveis variando de  $5-70 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Porém após análise estatística dos dados, observa-se que não ocorreu uma diferença significativa entre substratos ou setores do silo. O limite de detecção da técnica foi de valores  $\leq 0,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

**TABELA 15:** Média e desvio padrão dos níveis de AFs em milho quantificados através de CLAE.

Tipo de Alimento	Milho	AFBs ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
	Máx. - Mín.	média $\pm$ desvio padrão
Pré-fermentado – CS	2 - 0	0,5 $\pm$ 1,11 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CI	2 - 0	0,2 $\pm$ 1,16 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CL	1 - 0	0,1 $\pm$ 0,86 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CC	5 - 0	1,2 $\pm$ 1,13 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CS	2 - 0	0,5 $\pm$ 1,36 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CI	70 - 0	15,0 $\pm$ 20,12 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CL	70 - 0	35,0 $\pm$ 10,50 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CC	5 - 0	1,2 $\pm$ 1,05 <sup>a,b</sup>

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.6.2- Ocratoxina A

A OTA foi observada em níveis baixos, no material pré-fermentado se observou 10% das amostras positivas, com níveis variando de 2-30  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . No milho pós-fermentado, observou-se um percentual de amostras positivas semelhante ao milho pré-fermentado, porém os índices de concentração um pouco diferente (5-20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

### 3.6.3- Fumonisina B<sub>1</sub> e deoxinivalenol

Tanto para a FB<sub>1</sub> quanto para o DON foram utilizadas a mesma metodologia ELISA. Ambas as toxinas são produzidas durante o desenvolvimento das plantas, buscou-se avaliar o grau de contaminação que esse material teve durante o período pré-fermentado e como essa contaminação variou durante o processo fermentativo. O que foi avaliado pode ser observado nas Tabelas 16 e 17.

Foram encontrados índices baixos de contaminação das duas toxinas nos substratos. Para a ocorrência de FB<sub>1</sub> no milho pré-fermentado foram detectadas aproximadamente 12% das amostras com contaminação, em níveis variando de 0,37-2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; no milho pós-fermentado foram detectadas aproximadamente 10% das amostras com contaminação, em níveis variando de 0,12-1  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Com relação à incidência natural de DON nas amostras, no milho pré-fermentado foram detectadas aproximadamente 10% das amostras com contaminação, com níveis variando de 0,25-1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; no milho pós-fermentado foram detectadas 12% das amostras com contaminação, com níveis variando de 0,32-1  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

A confiabilidade e os níveis de toxinas detectados no teste são demonstrados através do coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) que existe entre a curva padrão de calibração e as amostras que irão sofrer detecção e quantificação. Para o teste de FB<sub>1</sub> tiveram um  $R^2 = 0,987$  (tendo o limite de quantificação com níveis  $\leq 0,23 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $\geq 6 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e para DON tiveram um  $R^2 = 0,972$  (tendo o limite de quantificação com níveis  $\leq 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $\geq 2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Coeficientes citados como satisfatórios pelo fabricante e em literatura (OLIVEIRA et al., 2006).

**TABELA 16:** Média e desvio padrão dos níveis de fumonisina B1 em milho quantificados através de ELISA.

Tipo de Alimento	Milho	FB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
	Máx. - Mín.	média $\pm$ desvio padrão
Pré-fermentado – CS	2,0 - 0	0,51 $\pm$ 0,48 <sup>a, b</sup>
Pré-fermentado – CI	1,53 - 0	0,61 $\pm$ 0,56 <sup>a, b</sup>
Pré-fermentado – CL	0,47 - 0	0,40 $\pm$ 0,35 <sup>a, b</sup>
Pré-fermentado – CC	0,56 - 0	0,32 $\pm$ 0,26 <sup>a, b</sup>
Pós-fermentado – CS	0,87 - 0	0,32 $\pm$ 0,12 <sup>a, b</sup>
Pós-fermentado – CI	0,89 - 0	0,12 $\pm$ 0,09 <sup>a, b</sup>
Pós-fermentado – CL	0,20 - 0	0,44 $\pm$ 0,37 <sup>a, b</sup>
Pós-fermentado – CC	0,12 - 0	0,23 $\pm$ 0,17 <sup>a, b</sup>

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).  
Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo;



**TABELA 17:** Média e desvio padrão dos níveis de deoxinivalenol em milho quantificados através de ELISA.

Tipo de Alimento	Milho	DON ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
	Máx. - Mín.	média $\pm$ desvio padrão
Pré-fermentado – CS	1,00 - 0	0,35 $\pm$ 0,25 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CI	0,25 - 0	0,28 $\pm$ 0,19 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CL	1,00 - 0	0,28 $\pm$ 0,12 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CC	0,56 - 0	0,31 $\pm$ 0,26 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CS	1,00 - 0	0,23 $\pm$ 0,05 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CI	1,00 - 0	0,12 $\pm$ 0,09 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CL	0,57 - 0	0,07 $\pm$ 0,03 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CC	0,32 - 0	0,03 $\pm$ 0,019 <sup>a,b</sup>

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.6.4- Gliotoxina

Ao serem realizadas as análises por CLAE das amostras de silagens, foi detectada a presença de gliotoxina. Os dados podem ser observados na Tabela 18, onde foi demonstrada uma positividade de 20% para milho pré-fermentados, com níveis de contaminação que variavam de 0,1-2,0  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Porém quando se avaliam os substratos após o processo de fermentação esta frequência sofre alteração aumentando sua ocorrência no milho pós-fermentado, sendo de 70% das amostras contaminadas para o milho, com níveis que variavam de 0,1-34,0  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Porém após análise estatística dos dados, observa-se que não ocorreu uma diferença estatística significativa entre substratos ou setores do silo. O LOD e LOQ da técnica cromatográfica foram, respectivamente de 0,3  $\mu\text{g.g}^{-1}$  0,5  $\mu\text{g.g}^{-1}$ .

**TABELA 18:** Média e desvio padrão dos níveis de gliotoxina em milho quantificados através de CLAE.

Tipo de Alimento	Milho	GLIO ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
	Máx. - Mín.	média $\pm$ desvio padrão
Pré-fermentado – CS	0,24 - 0	0,15 $\pm$ 0,05 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CI	0,21 - 0	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CL	0,15 - 0	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado – CC	0,10 - 0	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CS	34,01 - 0	2,25 $\pm$ 0,11 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CI	31,53 - 0	3,29 $\pm$ 0,13 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CL	23,04 - 0	5,34 $\pm$ 0,12 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado – CC	22,45 - 0	5,23 $\pm$ 0,097 <sup>a,b</sup>

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4- DISCUSSÃO

Muitos dos valores encontrados no estudo, das características físicas das amostras foram adequados segundo padrões propostos por Teixeira, et al. (2009), Neumann, et al. (2004) e Almeida (2000), pH variando de 3,0 a 6,5, atividade aquosa variando de 0,800 a 0,584 e matéria seca variando de 48 a 20%. Desta forma se avaliou um produto comum, que se reflete na situação da bovinocultura brasileira, uma variabilidade muito grande. Os parâmetros físicos dos materiais ensilados com pouca homogeneidade nos parâmetros, não garantindo assim uma qualidade no tipo de material desejado ao final do processo, demonstrando que os cuidados com os procedimentos de confecção da silagem, devem ser levados a sério a fim de buscar um produto mais homogêneo e de qualidade ao final. Maiores teores de umidade, juntamente com atividade de água demonstraram maior atividade biológica, mesmo em condições de anaerobiose, porém determinarão ao final do processo produtos de melhor qualidade quanto a parâmetros estabelecidos em bibliografia como digestibilidade e palatabilidade. Tais parâmetros não foram avaliados e poucos estudos correlacionam inocuidade do alimento, com maior grau de digestibilidade ou problemas decorrentes no processo digestivo dos animais.

Após avaliação dos dados obtidos e apresentados nas Tabelas 4 e 5 observou-se que os substratos estiveram com as características físicas de acordo com aqueles relatados na literatura por González Pereyra et al. (2007) e Whitlow et al. (1999). As avaliações estatísticas dos dados obtidos, não mostraram diferença significativa entre as fazendas, setores do silo e tipos de substratos avaliados, quando comparados pelo teste estatístico proposto no estudo (teste de LSD de Fisher  $P \geq 0,001$ ). Correlaciona-se esta não diferença estatística às condições climáticas muito semelhantes entre as propriedades, devido a estas fazendas estarem próximas, localizadas na mesma macro região do sudeste brasileiro, segundo o INMET / CPTEC / INPE.

Cabe relatar que existiram diferenças visuais na comparação de materiais que apresentavam teores de umidade e  $A_w$  distintos, porém quando avaliamos as médias dos substratos pré e pós-fermentados isso não se confirmou quando aplicado o teste estatístico. Contudo a literatura cita (GIMENO-ADELANTADO et al., 2008; RICHARD et al., 2006) que existem diferenças estatísticas significativa nessa comparação, onde materiais com maiores níveis de  $A_w$  e umidade apresentam maiores teores de atividade biológica nociva ao final do processo de fermentação.

Importante também avaliar sobre que condições climáticas os silos são expostos nas localidades em que eles são armazenados. Através da avaliação física das amostras, juntamente com os dados climatológicos e observação durante o procedimento de coleta das amostras de pontos de acúmulo de umidade, juntamente com crescimento de micélio fúngico, que esse material poderia apresentar uma qualidade higiênica insatisfatória. Tais dados levaram a suspeita de uma microbiota variável e de gêneros adaptados a baixas atividades de água e altas temperaturas (PEREYRA et al. 2008; WHITLOW et al. 1999; MOSS, 1991). Tais dados apenas reforçaram a variabilidade da microbiota que se esperava encontrar no estudo, após avaliação física das amostras e geoclimática, sendo as condições locais de altas temperaturas e pluviosidade intermediária, além de baixa de umidade são características favoráveis para o desenvolvimento e crescimento de fungos xerofílicos. Muitos estudos no Brasil demonstram que estas condições se mostraram bastante favoráveis para o desenvolvimento destes tipos de fungos, na região sudeste do Brasil. (KELLER et al., 2008; CAMPOS et al., 2008; FRAGA et al. 2007).

Outro dado importante a ser relatado está em consideração aos tipos de cultivares hoje mais frequentemente utilizados nos processos agrícolas, de modo geral a maior parte dos cultivares ainda hoje utilizados são principalmente milho (*Zea mays L.*, variedades Crioula), as variedades Transgênica do tipo Bt estão sendo amplamente utilizadas, o que pela literatura causa um benefício no que diz respeito às condições de inocuidade do material final, tanto dos grãos, como dos produtos processados obtidos destes. Demonstrando de certa forma benefícios inerentes na utilização de cultivares desta linhagem *Bacillus turigienssis* resistente.

Para a avaliação da microbiota propriamente dita o meio DG18 se torna uma alternativa bastante viável, por ser seletivo para fungos xerofílicos, ou seja, suportam crescimento em baixas  $A_w$  (PITT; HOCKING, 1997), os cultivos neste meio auxiliaram no isolamento e contagens paralelas as que foram encontradas em meio DRBC. Com os dados da literatura e os dados climáticos expostos na Tabela 6, já era esperada uma maior frequência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais apresentam estas características. Estas espécies fúngicas, frequentemente são encontradas nesse tipo de substrato, pois a semelhança da bibliografia foram obtidas contagens acima de  $10^4$  ufc.g<sup>-1</sup>, permitindo uma grande variabilidade fúngica neste meio (PEREYRA et al., 2008; RICHARD et al., 2006; 2007; GOURAMA et al., 1995).

Neste estudo contagens do gênero fúngico *Fusarium* foram reduzidas, principalmente no milho após ser ensilado. Acreditou-se que essa ocorrência pode ser influência de condições

climáticas não adequadas para desenvolvimento deste gênero fúngico e, além disso, também as condições de pH e pressão de oxigênio baixas que estas espécies estavam expostas nos silos. Principalmente no milho pré-fermentado, foram encontradas as maiores contagens, porém ainda sim reduzidas como relatadas (níveis  $\leq 10^2$  ufc.g<sup>-1</sup>), reafirmando o que a literatura relata, onde possivelmente estes valores, estão relacionados com condições inadequadas para um desenvolvimento favorável no que diz respeito às condições climáticas essenciais e microambiente dos silos (MANSFIELD et al., 2005).

Com relação à avaliação da micobiota, cabe ressaltar que ocorreram aumentos de pelo menos 10 vezes nas médias da carga fúngica dos alimentos pré-fermentados para os alimentos pós-fermentados. Foram observadas diferenças entre os setores que compõem o silo, principalmente entre as camadas superiores/central e camadas laterais/inferior. As camadas laterais/inferior por serem setores mais externos, atribui-se a pouca impermeabilização do solo e das lonas que os cobrem essa diferença. Das quatro camadas avaliadas do silo, as que obtiveram menor índice de contagem, foram às camadas superiores e centrais. E também sendo repetido quando avaliados os níveis de contaminação por toxinas. Já as camadas inferiores e laterais, tiveram níveis maiores de contagem e micotoxinas quando comparadas as outras.

Estes aumentos foram descritos de forma semelhante na literatura por González Pereyra et al., (2007) e Amigot, et al. (2006), porém os níveis de contaminação no país do estudo (Argentina) foram maiores. Os valores máximos para milho estavam na faixa de  $1,0 \times 10^5$  até  $5,0 \times 10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>. Os dados expressos na Tabela 11 estão de acordo com a literatura encontrada referente ao assunto, onde foram observadas diferenças, no que diz respeito à contaminação fúngica entre as camadas amostradas do silo, os tipos de substratos vegetais e seu estado fermentativo. Amigot, et al. (2006) em suas amostras na Argentina, observou diferença entre pontos do silo onde sua maior contaminação ocorreu em camadas da superfície do silo, descritas como mais expostas e que sofreram menor compactação. Richard et al. (2009; 2007) fez observações na Europa semelhantes, onde apenas descreve que a maior contaminação está relacionada com um menor grau de compactação e possivelmente o tipo de substrato ensilado, visto que este autor avaliou além de milho outras bases vegetais, dentre elas o sorgo e cevada umida. Mansfield et al. (2005) nos Estados Unidos, também avaliaram que ocorreu um aumento proporcional entre porções e fase fermentativa do substrato, principalmente relacionada a compactação. E, além disso, correlacionou fatores de clima de

maior pluviosidade, material ensilado com um grau de Aw elevada como também responsáveis pelo aumento da carga fúngica em porções dos silos.

Na análise laboratorial foi observada uma grande carga fúngica e variabilidade no milho pós-fermentado. O processo de compactação e anaerobiose não sendo bem realizados colaboram para a contaminação e micobiota variada (VAN SOEST et al. 1994). Mesmo afirmando pela literatura, atualmente já é considerado que as condições de anaerobiose dos silos, principalmente de superfície, não impedem o metabolismo e desenvolvimento, principalmente dos fungos filamentosos. Da mesma forma que as literaturas consultadas o gênero *Aspergillus* foram os mais freqüentes isolados na América do sul de silagens para alimentação de bovinos (PEREYRA et al. 2008). Não apenas em silagens bovinas, mas em diferentes substratos para alimentação de animais temos a ocorrência dos três gêneros principais *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, de forma concomitante nas americas (MAGNOLI, et al. 2005; MANSFIELD et al. 2005). Temos também estudos recentes no Brasil, como os de Keller et al. (2007) e Campos et al. (2008) encontrando em rações para alimentação animal os mesmos gêneros também como o mais frequentes. Rosa et al. (2006) e Oliveira et al. (2006) quando estudaram a micobiota toxígena de produtos vegetais em rações onde o milho é o ingrediente principal destinadas à alimentação de frangos de corte, em fábricas de rações do Estado do Rio de Janeiro. Estes autores observaram que o gênero *Aspergillus*, foi o mais freqüente (41%), seguido por *Penicillium* sp. (40%) e *Fusarium* sp. (15 %), dentre outros. Fraga et al. (2007) analisaram amostras de milho e de rações para os diferentes estágios de criação de frangos de corte no Estado do Rio de Janeiro. *A. flavus*, *A. candidus* e espécies de *Eurotium* sp. foram os fungos mais observadas nas amostras de milho e ração inicial. Já nas amostras de ração de terminação, os gêneros mais freqüentes foram novamente *A. flavus*, espécies de *Eurotium* e *A. niger agregado*. Segundo a literatura o *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são as espécies comumente associadas com a contaminação do milho e seus produtos derivados (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MAGNOLI et al. 1998; RIBEIRO et al. 2007). Sendo o *Fusarium verticillioides* a espécie deste gênero que mais foi isolada no estudo.

Um dado importante a ser relatado, bem como avaliado de forma separada é a ocorrência de cepas de *A. fumigatus* nas amostras selecionadas. Sua ocorrência em um grande percentual de amostras, reintera a importância de estudos prospectivos, que irão prover dados e estatísticas, a fim de determinar as condições às quais os animais, bem como as pessoas, que tem algum contato com estes materiais estarão expostas. A ocorrência é freqüente desta

espécie, muito comum nos mais variados ambientes (PEREYRA et al., 2008; BOUDRA e MORGAVI, 2005). Assim sendo sua ocorrência em níveis altos e em grande parte das amostras traz um alerta a saúde dos animais, bem como os trabalhadores que estarão lidando com este material contaminado, pois tais cepas tem grande capacidade invasiva, podendo promover tanto a patologia direta, conhecida como Aspergilose, bem como efeitos secundários pelos metabólitos presentes nos alimentos ensilados.

A importância na determinação e avaliação da micoflora é de poder prover informações sobre possíveis micotoxinas que potencialmente estariam presentes na amostra, bem como a avaliação da capacidade das cepas quando em condições adequadas de produzirem micotoxinas. Com relação aos dados gerados neste estudo, se mostraram semelhantes aos de outros grupos que encontraram cepas potencialmente produtoras nesse mesmo padrão de substratos, como Richard et al., (2009; 2007; 2006), Hennigen et al., (1995), Boudra e Morgavi (2005) que avaliaram em condições e forma semelhantes a produção de toxinas por cepas isoladas em seus estudos, demonstrando que quando estimuladas se mostraram competentes e capazes em produzir micotoxinas, mesmo em supostas condições adversas. Cabe ressaltar que a ocorrência de Gliotoxina, bem como outras toxinas de maneira simultânea nestes silos, merecem maior destaque com relação a estudos futuros para a prospecção de dados que busquem os efeitos da coocorrência destas micotoxinas e seus efeitos.

Com relação às micotoxinas isoladas das amostras de silo, de forma semelhante à bibliografia foi demonstrado que ocorrência em variados graus de contaminação de micotoxinas ocorre por todo o silo, porém existiram setores e porções dos silos que podem sofrer uma maior contaminação, variando com as condições no local onde é armazenado e mantido (GOURAMA et al., 1995). No Brasil temos autores como Hennigen et al. (1995) que no Rio Grande do Sul demonstra a contaminação de pelo menos 30% de cada amostra de milho avaliada com níveis acima de 20 ppbs. Pereira et al. (2005) num estudo realizado na região de Minas Gerais também detectou níveis de AFB<sub>1</sub> nas amostras de silagem, chegando também a 10 µg Kg<sup>-1</sup>. Sassahara et al. (2003) realizou uma avaliação das porções de silos para alimentação de bovinos de leite, encontrando níveis também de até 100 µg Kg<sup>-1</sup> não apenas no milho, mas em vários outros substratos, coletados no norte do Estado do Paraná. González pereyra et al. (2007) juntamente com outros autores buscavam monitorar a matéria pré e pós-fermentada, encontrando níveis que variavam de 10-80 µg Kg<sup>-1</sup> no material pós-fermentado e níveis menores de até 30 µg Kg<sup>-1</sup> de AFs totais no material pré-fermentado, não

conseguiram determinar uma porção mais contaminada do silo, mas conseguiram destacar que apesar do processo fermentativo os níveis de toxina subiam, determinando atividade biológica ativa mesmo em condições de anaerobiose.

Tanto em milho, bem como sorgo pré ou pós-fermentados outros autores também encontram níveis baixos de OTA nos substratos avaliados (AMIGOT et al., 2006; RICHARD et al., 2006, 2007). A OTA para os bovinos poderá prejudicar a digestão dos mesmos, tendo sua ocorrência em níveis baixos como uma preocupação para a espécie, devido a esta afetar diretamente a microflora ruminal dos animais, dificultando assim o processo digestivo, podendo indiretamente gerar de simples problemas na absorção de nutrientes até sintomas mais graves (WHITLOW et al., 1999).

A avaliação de multitoxinas e seus níveis determinaram também a ocorrência das toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* como citado na literatura, principalmente em material pré-fermentado, porém os níveis foram baixos quando comparados aos citados. Sassahara et al., (2003) no Brasil por CCD detectou níveis de ZEA de até  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  em milho pré-fermentado indicando que silos apresentavam contaminação por toxinas produzidas por *Fusarium* sp. Outros estudos que avaliaram a presença de FB<sub>1</sub> em milho *in-natura* ou rações a base de milho, mostram que essa toxina é uma preocupação. Keller et al. (2007) mostraram uma incidência preocupante de mais de 50% de amostras contaminadas com níveis de pelo menos  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Neste estudo os níveis de FB<sub>1</sub> foram menores do que os expostos na literatura, porém os efeitos crônicos e a ingestão continuada de toxina, bem como seus efeitos aditivos são o foco da preocupação deste e outros estudos (LOGRIECO et al., 2002; GIMENO et al., 2008). Mansfield et al., (2005); Doko et al., (1996) correlacionaram que há diminuição dos níveis de toxina após processo fermentativo ou tratamentos térmicos, devido a degradação das moléculas de toxina presente. Tal efeito também foi observado neste estudo quando tiveram a diminuição das médias do material pré para o pós-fermentado, no entanto esta diferença não se mostrou significativa, bem como a diferença entre as camadas amostradas do silo. Possivelmente atribuem-se às condições climáticas impostas as culturas de milho e sorgo nas regiões avaliadas e as condições inadequadas de desenvolvimento durante o processo de fermentação as diferenças dos níveis de toxina. Assim sendo não foram obtidos níveis altos de contaminação por toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, porém estavam presentes.



#### 4- CONCLUSÕES

As condições adversas dos silos de milho não foram satisfatórias para inibir o desenvolvimento da micobiota.

As características físicas, avaliadas dos silos, demonstraram condições adequadas para o crescimento fúngico: pH entre 3-5, Aw entre 0,910-0,756. Demonstrada também pela micobiota encontrada que foi variada e com uma carga fúngica variando de  $7,2 \times 10^5$  até  $2,0 \times 10^2$ . Logo, apesar do processo de compactação pelo qual passam os silos, este está sendo ineficiente para inibir o desenvolvimento fúngico durante o período de fermentação.

As condições climáticas das regiões do estudo demonstraram serem favoráveis para o desenvolvimento de fungos xerofílicos. Fato esse comprovado pelo gênero *Aspergillus* ser o mais freqüente nas várias amostras avaliadas e as espécies com maior ocorrência *A. flavus* e *A. fumigatus*.

A umidade e temperatura média das localidades durante os períodos de fevereiro a maio dos anos avaliados (2009 a 2012) não favoreceram o desenvolvimento de fungos do gênero *Fusarium*, sendo estes mais exigentes com relação a temperaturas mais amenas e umidades mais favoráveis, para seu desenvolvimento adequado no material pré-fermentado. Já no material pós-fermentado as condições de pH, temperatura e baixa concentração de oxigênio dificultaram o desenvolvimento da micobiota do gênero *Fusarium*.

A variabilidade da micobiota, junto com observações de crescimento fúngico sob as amostras durante os procedimentos de amostragem, demonstra que o processo de compactação e isolamento, pelos quais passam o silo, está sendo ineficiente para inibir o seu desenvolvimento durante o período de fermentação.

Tiveram altos percentuais de contaminação fúngica acima do limite proposto pela GMP (2006) em todos os substratos avaliados. Junto a isso ocorreu um aumento na carga contaminante, quando avaliamos o material pré e pós-fermentado, demonstrando que o processo fermentativo aumenta em pelo menos 10 vezes a carga fúngica em relação ao material pré-fermentado. Assim procedimentos devem ser revistos, com finalidade de apontar pontos críticos no processamento e diminuir esses índices.

*A. flavus* e *A. parasiticus* ocorreram em altas freqüências nas amostras que foram avaliadas. Junto a isso, temos níveis de contaminação de até 100 ppb de aflatoxinas nas amostras de milho pós-fermentado. Demonstrando uma correlação com cepas produtoras presentes nas amostras avaliadas, o que indica o risco a saúde dos bovinos alimentados com estes substratos.

*P. citrinum*, foi à espécie do gênero com a maior frequência nas amostras, principalmente no milho pós-fermentado. Chegando a ser 50% das cepas isoladas deste gênero. Além de 75% destas cepas tiveram a capacidade de produzir citrinina quando estimuladas.

*A. fumigatus*, principalmente no milho pós-fermentado, chegou a ocorrer em 76% das amostras. Destas cepas todas tiveram a capacidade de produzir GLIO quando estimuladas. Demonstra um risco devido a pouca inocuidade do material, oferecendo chances de risco aos animais e indivíduos que terão contato com este material.

Existe contaminação em níveis acima da legislação permitida para consumo animal para AFs em muitas porções de silos avaliados (MAPA, 1988). Além disso, existe contaminação por OTA, GLIO, FB<sub>1</sub> e DON (estas últimas em níveis mais baixos), porém estão presentes no milho pré ou pós-fermentado, oferecendo risco ao rebanho que consome este material, pela ingestão continuada destes níveis.

A metodologia ELISA utilizada para detecção e quantificação dos níveis de FB<sub>1</sub> ( $R^2 = 0,987$ ) e DON ( $R^2 = 0,972$ ) foi adequada, pois permitiu uma rápida avaliação de um número grande de amostras, com uma grande segurança nos resultados obtidos.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Archives of Microbiology*, v. 192, n. , p.409–425, 2010.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023 - Informação e documentação - Referências - Elaboração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24 p.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10522 - Informação e documentação - Citações em documentos - Apresentação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 7 p.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Editado por HELRICH, K., Secciones: 935.76, 936.20, Washington, DC, EUA: AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Editado por HELRICH, K. Secciones: 975.35, 976.22, Washington, DC, EUA: AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- ALMEIDA, J.C.C. **Avaliação das características agrônomicas e das silagens de milho e de sorgo cultivados em quatro densidades de semeadura**. Jaboticabal, São Paulo: UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2000. Tese de Doutorado em Zootecnia 82 p.
- AMIGOT, S.L.; FULGUEIRA, C.L.; BOTTAIB, H.; BASÍLICOC, J.C. New parameters to evaluate forage quality. **Postharvest Biology and Technology**. v. 41, n. 1.2, p. 215-224, 2006.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 274 - Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no**

leite, no amendoim, no milho. 2002. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm)>. Acesso em: 13 mar 2008.

ASPLIN, F.D.; CARNAGHAN, R.B.A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their affect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1215-1219, 1961.

BENNETT, J; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BHATNAGAR, D.; TAKAHASHI, T.; CHANG, P.K.; MATUSIHIMA, K.; YU, J.; ABE, K.; CLEVELAND, T.E.; KOYAMA, Y. Mycotoxins: Current issues in U.S.A. **Meeting the Mycotoxin Menace Book**, 2003.

BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BLOUNT, W.P. Turkey "x" Disease. **Turkey**, v.9, p.55-58, 1961.

BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.113-131, 2005.

CAMPOS, S.G. de; CAVAGLIERI, L.R.; KELLER, L.A.M. ; JURI, M.G.F. ; DALCERO, A. M.; MAGNOLI, C.; ROSA, C.A.R. Mycoflora and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 377-383, 2008.

CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Micotoxins: risks in plant, animal and humans systems**. Iowa, USA: Task Force Report nº 139, 2003. 199 p.

CEPETEC / INPE - CENTRO DE PREVISÃO DO TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS / INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Boletins Climatológicos**. n.

350 - 355. Disponível em: < [http://www.agritempo.gov.br/boletins/boletim\\_RSE.html](http://www.agritempo.gov.br/boletins/boletim_RSE.html)>. Acesso em: 20 dez 2007 e 27 jun 2008.

COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York: Academic Press, 1981.

CRUZ, L. C.H.; ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G. **Aflatoxicose aguda em suínos no Estado do Rio de Janeiro**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, v. 7, n. 5, p. 127-128, 1985.

CRUZ, L.C.H.; CAMPOS, S.G.; ROSA, C.A.R. **Aplicação do Ágar-Coco como Meio Diferencial para o isolamento de Fungos Citrinogênicos**. Itaguaí, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v.15 n.1, p. 39-60, 1992.

CRUZ, L.C.H. Micotoxinas são tão importantes. In: Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana, RJ. **Anais do Encontro de Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana**. Itaguaí, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. p. 1-12.

CRUZ, L.C.H. **Citrinina – uma micotoxina produzida por *Penicillium citrinum* Thom: aspectos microbiológicos, bioquímicos e toxicológicos**. Seropédica, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 267p.. Tese de Doutorado em Sanidade Animal

DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.

DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 781-803, 1998.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. Piracicaba, SP. **Anais do XI Encontro Nacional de Micotoxinas**, SP: Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. p. 32-35.

D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.

DOKO, M. B.; BROWN, N.; SYDENHAM, E. W. MPUCHANE, S.; SIAME, B. A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n.10, p. 3240-3243, 1996.

ELLING, F. ; MOLLER, T. Mycotoxic nephropaty in pigs. Bull. **Wld. Hlth. Org.**, v. 49, p. 411-418.1973.

EMBRAPA – Embrapa Gado de Leite. **Sistema de Produção 4. Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>Acesso em 05 mai. 2011.

EMBRAPA – Embrapa Gado de Leite. **Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>Acesso em 11 jul. 2011.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZACION. Pan-European Conference on Food Safety and Quality 2003. **Compendium FAO Veterinary Public Health and Food and Feed Safety Programme: the Safety of Animal Products from Farm to**

- Fork.** 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/livestock/AGAP/FRG/FEEDSAFETY/feedsafety.htm>>. Acesso em: 27 Jun 2008.
- FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.A.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.
- FRIIS, P.; HASSELAGER, E.; KROGH, P. Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. **Acta Path. Microbiol. Scand**, v. 77-B, p. 559-560, 1969.
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. CHELKOWSKI, J. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 441-476.
- GARDINER, D. M.; HOWLETT, B. J. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. , p. 241-248, 2005.
- GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.19, p.388-392, 1996.
- GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, F.; JIMENEZ, M.; MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 196–203, 2008.
- GMP – GOOD MANUFACTURE PRATICE. Certification Scheme Animal Feed Sector. **Appendix 1: Product standards (including residue standards)**. The Hague, the Netherlands: Productschap Diervoeder, 2006. p. 1-39.

- GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; ALONSO, V.A.; SAGER, R.; MORLACO, M.B.; MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034–1041, 2007.
- GOURAMA, N.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v.58, n.12, p.1395-1404, 1995.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**. v.95, p.641-655, 1991.
- HENNIGEN, M. R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v.12, n.5, p.677-681, 1995.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, 2nd ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 445p.
- HOCKING, A.D.; PITT, J. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied Environment Microbiology**, v.39, p.488-492, 1980.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-521, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. São Paulo: IBGE, v. 31, p.1-31, 2006.



- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. São Paulo: IBGE, v. 29, p.1-33, 2010.
- KEEHN, D.M.; FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nurs**, v. 14, n. 4, p. 163-174, 1991.
- KELLER, L. A. M. **Avaliação micológica e micotoxicológica de silagens destinadas à alimentação de bovinos de fazendas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – Rio de Janeiro. 2009.
- KELLER, K.M.; KELLER, L.A.; M OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X., GARCIA, R.S., ROSA, C.A.R. Avaliação micotoxicológica em produtos destinados à alimentação de caprinos leiteiros em Teresópolis, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v.30, n. 2, p.91-96, 2008.
- KELLER, K.M.; QUEIROZ, B.D.; KELLER, L.A.M.; RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The mycobiota and toxicity of equine feeds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, 2007.
- KHOUFACHE, K; PEUL, O; LOISEAU, N; DELAFORGE, M.; RIVOLLET, D.; COSTE, A.; CORDONNIER, C.; ESCUDIER, E.; BOTTEREL, F.; BRETAGNE, S. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysical properties of human nasal epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 7, Art. 5, 2007.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I., **Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Sydney, Austrália: Academic Press, 1988. 116p.
- KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 122 p.

- KUPFAHL, C.; HEINEKAMP, T.; GEGINAT, G.; RUPPERT, T.; HARTL, A.; HOF, H.; BRAKHAGE, A. A. Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 292-302, 2006.
- KWON-CHUNG, K. J.; SURGUI, J. A. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? **Medical Mycology**, v. 47, suplemento 1, p. S97-103, 2009.
- LILLEHOJ, E.B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 1-35.
- LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A coconut – Agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, n.12, p. 1466-1469, 1976.
- LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 597–609, 2002.
- MADHYASTHA, S.M., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., PLATFORD, G., ABRAMSON, D. Effects of different cereals and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *A. alutaceus* and *P. verrucosum*. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v.38, p.1506-1510, 1990.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, p. 27-32, 1998.
- MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A. The mycobiota and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 7-22, 2002.

MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIOS, G.; DALCERO, A. Surveillance of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in Feedstuffs from Córdoba Province, Argentina. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 5, p. 431-445, 2005.

MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochatoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 249-260, 2007.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria nº 07** de 09 nov 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, p. 21968, 1988.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções de Agronegócio Mundial e Brasil 2006/2007 a 2017/2018**. AGE - Agência de Acessória Estratégica. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2909DCC5111A4D7BE040A8C0750251C9>>. Acesso em: 21 out 2008.

MILLER, J.D. Global Significance of Mycotoxins and Phycotoxins. In: **Proceedings of IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. Rome, 1996. 31p.

MORGAVI, D.P; RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with Fusarium toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 201–212, 2007.

MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 23-51.

MORTIMER, D.N.; GILBERT, J., SHEPHERD, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxins M<sub>1</sub> in liquid and powdered milk using affinity column cleanup. **Journal of Chromatography**, v. 407, p. 393-398, 1987.

- MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 27, p. 62S-72S, 1998.
- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence?. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- NIEMINEN, S. M.; MÄKI-PAKKANEN, J.; HIRVONEN, M. R.; ROPONEN, M.; WRIGHT, A. von. Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in a battery of short-term test systems **Mutation Research**, v. 520, n. 1-2, p. 161-170, 2002.
- NEUMANN, M.; RESTLE, J.; BRONDANI, I. L. Avaliação de silagens de sorgo (*sorghum bicolor*, L. Moench) ou milho (*zea mays*, L.) Na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.3, p.438-452, 2004.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. (Eds.). **Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification**. USA: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 355-362, 2006.
- OHYAMA, Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.26, p.1137-1147, 1975.
- OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Criterios de Salud Ambiental, 11: Micotoxinas**. Washington: OPS. 1983. (OPS. Publicación Científica, 453).

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.

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

PARKER GF, JENNER PC. Distribution of trypacidin in cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology*; v. 16, n. 8, p. 1251-1252, 1968.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; RIBEIRO, J.M.M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciências e agrotecnologia de Lavras**, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.

PEREYRA, M.L.G.; Alonso, V.; MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 1034-1041, 2008.

PIMENTEL, D. World resources and food losses to pests. In: GORHAM, J.R. (Ed.). **Ecology and Management of Food Industry Pests**. Arlinton, Virginia: FDA Technical Bulletin n. 4, Association of Official Analytical Chemists. 1991. p. 5-11.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins en foods and feeds - an updated review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.

PITT, J.I. **A Laboratory guide to commom *Penicillium* species**. 2<sup>nd</sup> ed. Sydney, Australia: CSIRO - Division of Food Processing, 1988. 186p.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

- RAMOS, C. M.; MARTÍNEZ, S. E. V.; OLIVARES, R. A. C. Gliotoxin production in 10 strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical cases. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, v. 40, n. 2, p. 139-148, 2002.
- RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIERI, L. R.; FRAGA, M. E.; GATTI, M. J. de A.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M., ROSA, C.A.R. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. **Letters in Applied Microbiology**. Holanda, v. 113, n. 1-2, p. 89-96, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3479–3484, 2006.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, p.2420-2425, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.02.004, v. 6, 2008.
- RINALDI, M.G. Invasive aspergillosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1061-1077, 1983.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de Nefropatia Micotóxica Suína causada pela ingestão de cevada contaminada por citrinina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.3, n.7, p. 87-90, 1985.
- ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Seropédica, Rio de Janeiro: UFRRJ- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002, 147p. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias.

- ROSA, CAR; RIBEIRO, JMM; FRAGA, ME; GATTI, M; CAVAGLIERI, LR; MAGNOLI, CE; DALCERO, AM; LOPES, CWG. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89–96, 2006.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.
- SAMSON, R. A. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its telemorphs. In: BENNETT, J.W; KLICH, M.A.. (Eds.). ***Aspergillus: the biology and industrial applications***. Bulteworth, Heineman, Stoneman, London, 1995, p. 353-388.
- SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. 2000. 388 p.
- SCUDAMORE, K. A., NAWAS, S., HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addition Contaminate**, v.15, p. 30-55, 1998.
- SIDHU, G.S. Mycotoxin genetics and genes clusters. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 705-711, 2002.
- SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some Brazilian Foods by using Multi-toxin Thin-Layer Chromatographic Method. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
- STANZANI, M.; ORCIUOLO, E.; LEWIS, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARTINS, S. L. R.; JOHN, L. S. ST.; KOMANDURI, K. V. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human

cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. **Blood**, v. 105, n. 6, p. 2258-2265, 2005.

STOLOFF, L. Aflatoxin: a overview. In: RODRICKS, J.V.C.; HESSELTINE, W.; MEHLMAN, M.A. (Ed.) **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Patholox Publishers. 1977. cap. 1, p. 7-28.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 18, p. 2649-2659, 2006.

TÉREN J., VARGA J., HAMARI Z., RINYU E., KEVEI F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v.134, p.171-176, 1996.

TRUCKSESS, M.W. Mycotoxins. **Journal of AOAC Internacional**, v. 89, n. 1, p. 270–284, 2006.

TURNER, W. B. **Fungal metabolites**. London: Academic Press, 632p. 1978.

TURNER, W. B.; ALDERIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. London: Academic Press, 632p. 1983.

VAN EGMOND, H.P. Chapter 6 – Mycotoxins? Detection, reference material and regulation  
In: In:Introduction to Food-borne Fungi. R.A.Samson, E. S. Hoesktra, J.C. Frisvad & O. Filtenborg (Eds) 6<sup>th</sup> Edition, **Centraalbureau Voor Schimmelcultures**, Baarn, 2000, p.332-338.

VAN EGMOND, H.P. Methods for determining ochratoxin A. and other nephrotoxic mycotoxins. In: mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. **IARC Scientific Publications**, Ryon, France v.115, p. 57-70, 1991.



VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WHITLOW, L. W.; HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**. São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p. 151-181.

YAMADA, A.; KATAOKA, T.; NAGAI, K. The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. **Immunology Letters**, v. 71, n. 1, p. 27-32, 2000.

## **CAPÍTULO II**

### **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA TOXÍGENA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE SILAGENS DE SORGO.**

## 1- INTRODUÇÃO

Em épocas de seca a suplementação na alimentação animal, quando a qualidade do pasto se torna inferior, é necessária para manutenção dos níveis nutricionais exigidos para manter os índices de produção. Alimentos ensilados, principalmente silagens de sorgo (*Sorghum bicolor*, Variedades Crioulas) vêm sendo utilizadas com essa finalidade. Este é um cultivar tradicional, que permite um alto valor nutricional agregado, mesmo em condições mais severas de clima de alguns períodos do ano. Os ganhos nutricionais para o rebanho com a utilização de silagens são importantes para garantir a manutenção da produção, porém problemas relacionados ao pouco cuidado no processamento, armazenamento e utilização deste material, bem como o demasiado tempo de uso extrapolando condições adequadas para conservação podem prejudicar o desempenho final do processo. Mudanças nos parâmetros de produção no desenvolvimento de bovinos destinados a carne e leite implicam na utilização de alimentos advindos das mais diferentes fontes de proteínas e carboítratos, principalmente ensilados, para garantir sua conservação e posterior uso. A utilização de novos insumos, principalmente resíduos do processamento industrial, tem por intenção promover com estes alimentos um melhor rendimento e destinação.

A contaminação fúngica de alimentos destinados ao consumo animal com conseqüente formação de micotoxinas constitui um problema de grande importância em nível mundial. As micotoxinas podem produzir efeitos adversos tais como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, nefrotoxicidade e imunossupressão provocando ou modulando diversas patologias, gerando perdas nas áreas de agricultura e de produção animal com milhões de dólares gastos em problemas relacionados à saúde humana (IARC, 1993; VASANTHI; BHAT, 1998). Considera-se que um dos aspectos mais importantes foi a mudança que a comunidade científica deu ao conceito de micotoxicose. O preocupante não é a contaminação por altos níveis de micotoxinas de ocorrência rara e esporádica, mas a ocorrência destes produtos tóxicos em pequenas quantidades em produtos vegetais básicos e seus de subprodutos. A ingestão diária e constante de pequenas quantidades destes compostos através de alimentos básicos, sem dúvida, possui papel importante na indução ou modulação de patologias nos animais e no homem. As subdoses de micotoxinas têm sido consideradas imunossupressoras, teratogênicas e carcinogênicas, modulando e modificando mecanismos bioquímicos, alterando e inativando enzimas e a biossíntese de macromoléculas importantes no equilíbrio fisiológico do organismo animal (WHITLOW, 2007).

Assim, este estudo busca determinar os níveis de contaminação, bem como a frequência de cepas e o risco destas serem potencialmente produtoras de micotoxinas em silagens de sorgo (*Sorghum bicolor*, Variedades Crioulas) destinadas à alimentação de gado bovino de corte de algumas propriedades no estado de São Paulo. Buscando conhecer a qualidade micotoxicológica de silagens, bem como avaliar sobre que condições estas estarão sendo oferecidas e armazenadas, avaliando o risco a que estes animais que as consomem estão sendo submetidos e com isso propor em uso futuro, objetivando melhoras no alimento que estes animais consumirão e ganhos na pecuária.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Amostragem

Foram coletadas um total de 48 amostras de silagens de sorgo, amostradas de um total de 12 silos de sorgo no período de janeiro 2009/2010/2011 a outubro 2009/2010/2011. Todos os silos de onde foram coletadas as amostras estavam localizados em fazendas criadoras de gado de corte nos Estados de São Paulo, nos Municípios de Marília, Vera Cruz e Ourinhos sendo avaliados o milho e sorgo pré e pós-fermentado.

A coleta das amostras pré-fermentadas foi realizada durante a compactação, ou seja, logo após o material ser moído. Já as amostras de material pós-fermentado foram coletadas após o período de fermentação dos silos ( $\pm 90$  dias), coincidindo com o início do uso do silo a ser coletado.

As dimensões totais dos silos eram de aproximadamente 30 metros de comprimento X 15 metros de largura X 5 metros de altura. Para garantir uma amostragem correta desse material cada silo sofreu uma divisão linear imaginária em seu comprimento em 3 partes iguais; e de cada parte desta foram coletadas amostras (500g) das camadas superior (CS), inferior (CI), laterais (CL) e central (CC). Estas camadas estavam equidistantes em 2 metros uma das outras, em largura e altura (KELLER, 2009).

O material pré-fermentado foi colhido no decorrer da compactação. Foram, portanto, retiradas de CS, CI, CL e CC alíquotas de 500 gramas dos seguimentos. Após o fim das coletas foram obtidas um total de 24 sub-amostras por silo, totalizando três kilogramas por camada. Sendo então estas sub-amostras homogeneizadas, quarteadas e retirada uma alíquota única de cada camada dos seguimentos de cada silo. Este processo foi repedido mais duas vezes e restaram amostras de 500 gramas das camadas de cada silo.

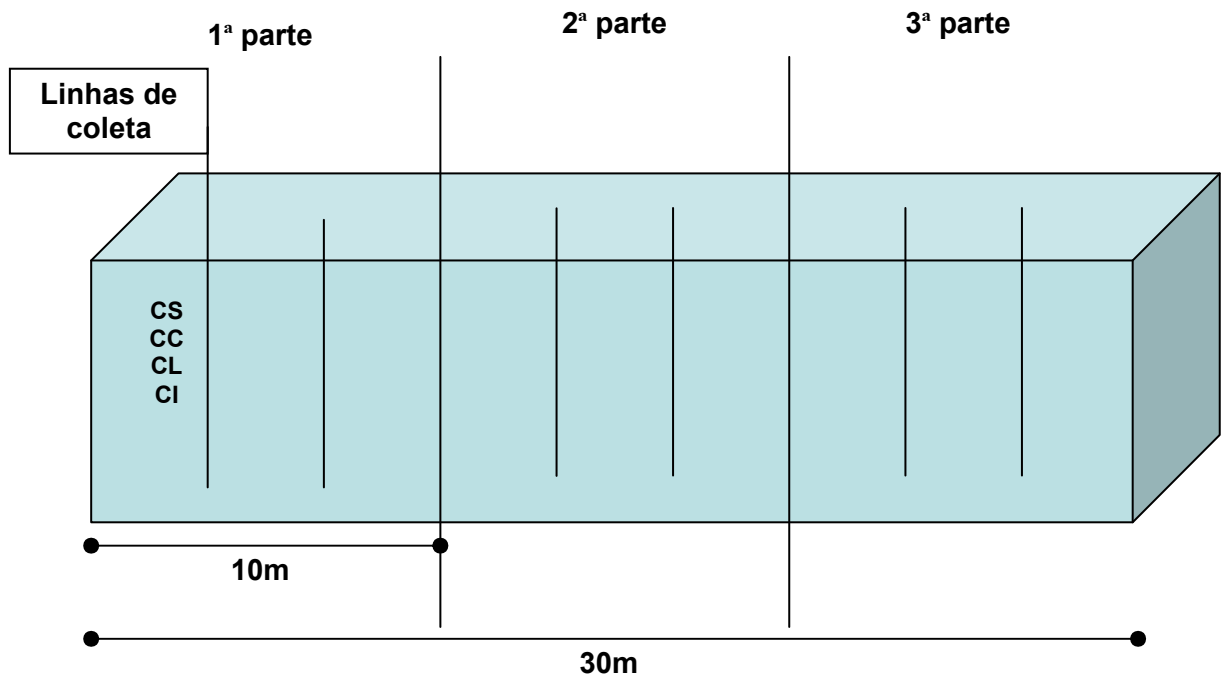
Após o período de 90 dias, tendo os silos fermentado iniciou-se uma nova coleta, agora com material pós-fermentação. Com a abertura dos silos para uso na propriedade, uma pá mecânica retira a porção oferecida aos bovinos é nesse momento em que a estrutura começa a ser rompida que foram retiradas as alíquotas da mesma forma que a etapa de pré-fermentação, com divisão linear igualitária do comprimento dos silos e retirada de amostras de 500 gramas das camadas propostas. Ao final do processo também foram obtidas 24 sub-amostras por silo analisado, realizando-se o processo de homogeneização e quarteamento semelhante até obtenção da amostra final.

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



Fonte: Arquivo pessoal

**FIGURA 06:** Vista frontal do silo, após período de fermentação de  $\pm$  90 dias. Esquema dos pontos de coleta nos silos.



**FIGURA 07:** Esquema divisão linear dos silos com linhas de coletas.

### 3.2- Avaliação física das amostras

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

#### 2.2.1- Percentual de matéria seca

Foram levados 100 gramas de amostra, para uma estufa com circulação de ar, onde este material passou por um processo de secagem por 72 hs a 65°C. Após esse período, com o resultado obtido, foi calculada a diferença entre os pesos percentualmente (NEUMANN 2004; OHYAMA; MASAKI; HARA, 1975).

#### 2.2.2- Atividade de água ( $A_w$ ) e pH

Para a determinação da atividade de água ( $A_w$ ) foi utilizado o equipamento AquaLab® modelo CX 2 (Decagon, Devices, Inc. USA), com o procedimento descrito a seguir. Primeiramente o aparelho foi ligado por cerca de 1 hora, para a estabilização da temperatura. A calibração foi feita através da utilização de uma solução de NaCl 6M, de atividade de água

0,760 e água destilada, cuja a atividade de água é igual a 1. Cada amostra foi colocada em um recipiente próprio, preenchendo cerca de 1/3 de sua capacidade, sendo efetuadas duas leituras. Calculando-se a média aritmética das leituras, foi obtida a atividade de água das amostras.

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

### **2.3- Dados climatológicos e localização geográfica**

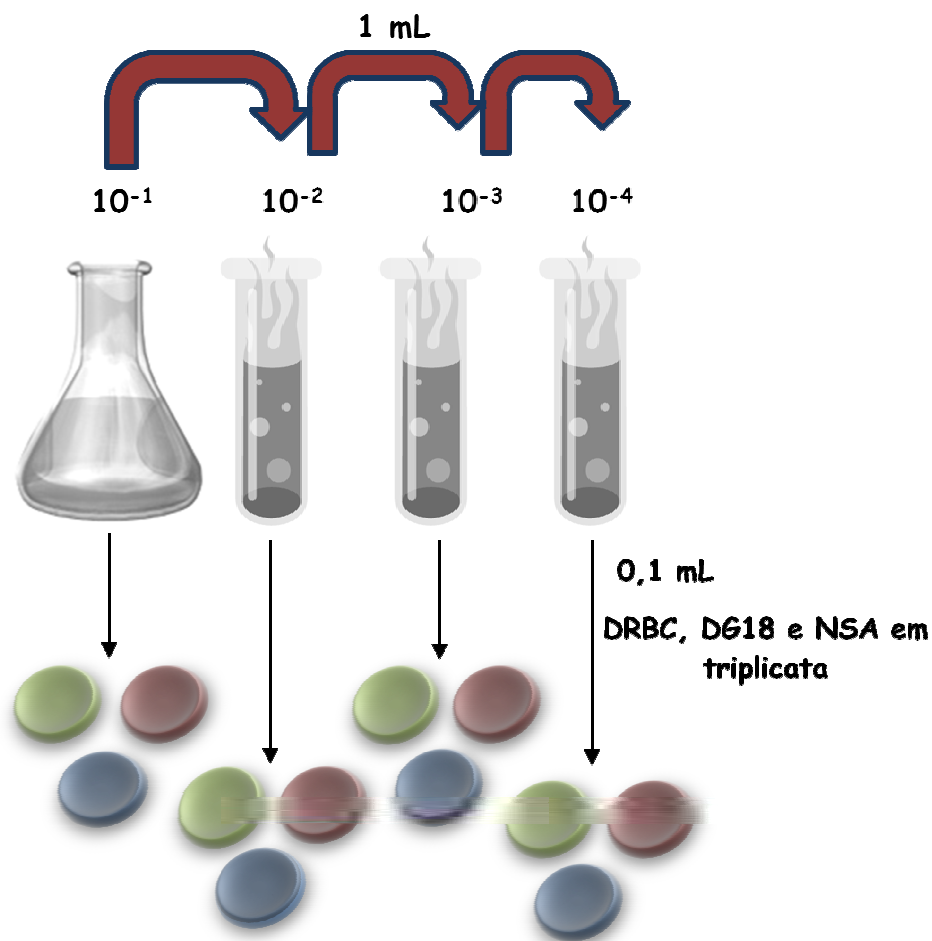
Foram obtidos os seguintes dados climatológicos: temperaturas médias, umidade relativa (%) e pluviosidade média (mm), através de boletins mensais do Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos / Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC / INPE / INMET). As cidades escolhidas para amostragem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

### **2.4- Determinação da Micobiota**

A enumeração quantitativa de fungos filamentosos em unidades formadoras de colônias por grama de alimento (ufc g<sup>-1</sup>) foi realizada segundo a metodologia de diluição decimal seriada em placas descrita por Pitt; Hocking (1997), conforme a seguir: Agitou-se 10 gramas da amostra em 90 mL de água destilada estéril. A partir desta diluição inicial (10<sup>-1</sup>) prepararam-se diluições decimais seriadas até 10<sup>-4</sup>. Inoculou-se (em triplicata) alíquotas de 0,1 mL de cada uma das diluições em três meios de cultivo: agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (PITT; HOCKING, 1997); agar dicloran glicerol a 18% (DG18) (HOCKING; PITT, 1980) e o Nash Snyder agar (NSA) (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983) (Figura 08). As placas foram incubadas a 25° C por cinco a sete dias em estufas microbiológicas com controle eletrônico de temperatura. Todas as placas foram



observadas diariamente, selecionando-se para enumeração aquelas que continham em torno de 10 a 100 ufc g<sup>-1</sup>.



**FIGURA 08:** Esquema de diluição de amostra e contagem padrão de unidades formadoras de colônias (ufc g<sup>-1</sup>).

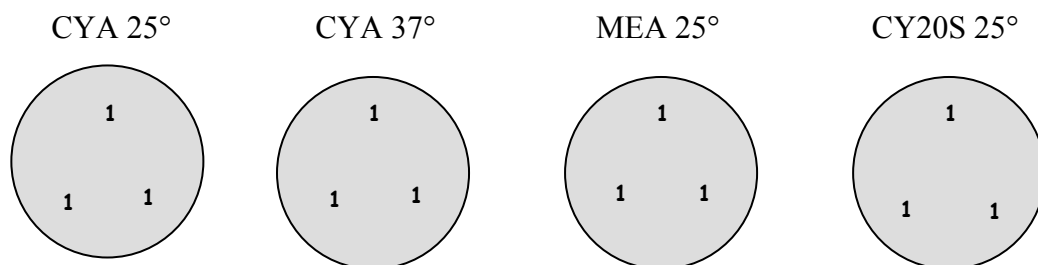
## 2.5 Isolamento e identificação fúngica

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

As cepas de fungos isoladas foram então identificadas segundo as chaves taxonômicas apropriadas de cada grupo particular: Klich (2002) para o gênero *Aspergillus*, Pitt (1988) para

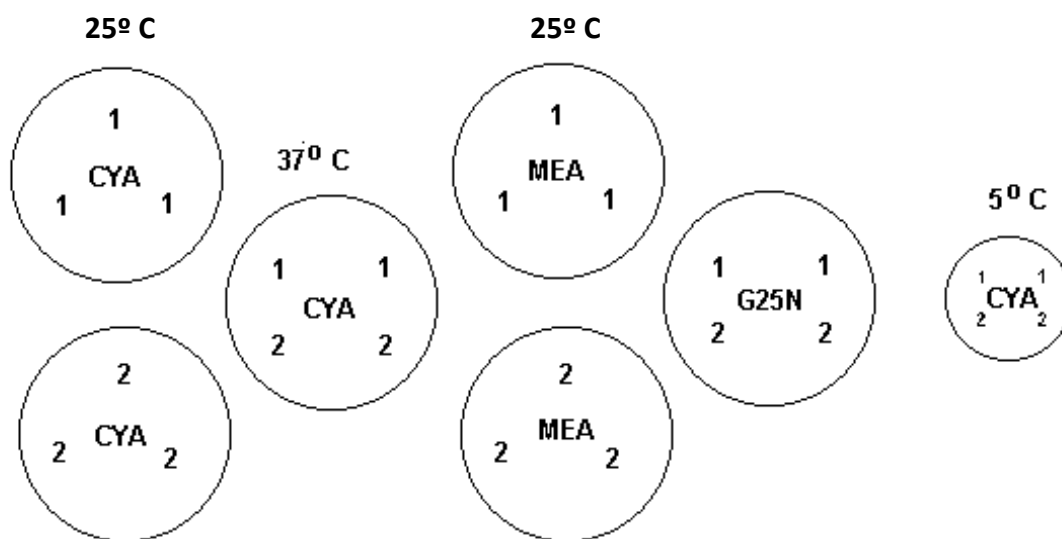
o gênero *Penicillium* e Nelson; Toussoun; Marasas (1983), com modificações, para espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.

A classificação de *Aspergillus* spp. foi baseada na semeadura padrão em três meios básicos (Figura 09): CYA; CY20S e MEA. Foi preparada uma suspensão de conídios a partir de cada cepa, em 0,5 mL de meio agar soft (0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80<sup>TM</sup>, distribuído em tubos Eppendorf, esterilização por autoclavação a 120°C por 15 minutos). A seguir, introduziu-se uma alça de platina em forma de agulha na suspensão de conídios inoculando-a nos meios de cultivo.



**FIGURA 09:** Esquema de inoculação e incubação das cepas do gênero *Aspergillus* nos meios CYA, MEA e CY20S em duas condições de temperaturas. **Fonte:** Adaptado de Klich (2002)

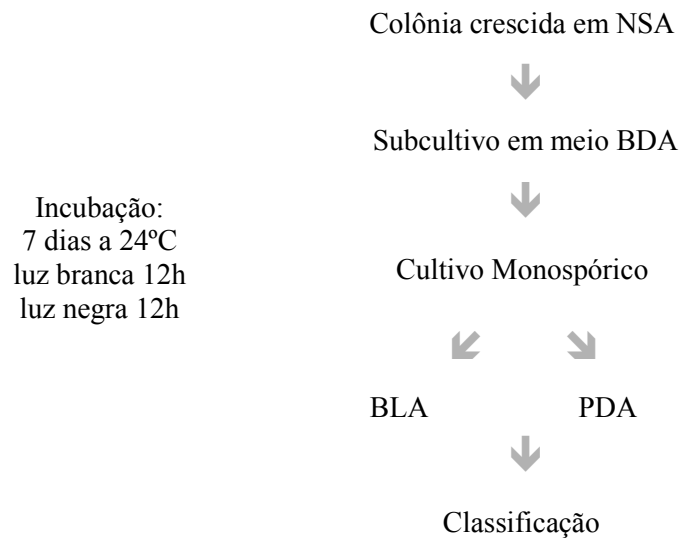
A chave proposta para *Penicillium* spp., foi baseada na semeadura em três meios básicos como: CYA; MEA e G25N (Figura 10); para maior eficiência e aproveitamento do sistema, inoculou-se as placas de Petri com duas cepas diferentes a serem testadas; a preparação do inóculo e inoculação nos meios de cultivo foi igual a utilizada para *Aspergillus* spp..



**FIGURA 10:** Esquema de inoculação e incubação das duas cepas do gênero *Penicillium* a serem identificadas nos meios CYA, MEA e G25N em três regimes de temperatura (5, 25 e 37° C). **Fonte:** PITT (1988).

As colônias de *Fusarium* spp. foram semeadas após cultivo monospórico nos meios BLA, modificando a metodologia original que utiliza o meio agar folhas de cravo (CLA) e no meio, em tubo inclinado, agar batata dextrose (BDA). As colônias foram incubadas por 7 dias a 24°C obedecendo foto período de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra (Figura 11), segundo metodologia descrita por Nelson; Toussoun; Marasas, (1983).

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



**FIGURA 11:** Esquema de incubação das cepas do gênero *Fusarium* nos diferentes meios de cultivo até sua identificação final. **Fonte:** Adaptado de Nelson; Toussoun; Marasas (1983).

### 3.5.1- Determinação da frequência de distribuição de *A. fumigatus* em relação ao total de espécies fúngicas e espécies do gênero *Aspergillus*.

Determinou-se a densidade relativa, de forma percentual de *A. fumigatus* em relação ao total de espécies do gênero *Aspergillus* e segundo micobiota total isolada segundo Pereyra et al. (2008).

## 2.6- Caracterização do perfil toxígeno das espécies

As cepas fúngicas identificadas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CYA, agar extrato de levedura sacarose (YES) e agar leite de coco (CAM), segundo Lin; Dianese (1976).

Para fungos produtores de OTA foi utilizada a técnica descrita por Teren et al. (1996). Foram analisadas quanto a presença de fluorescência e capacidade toxígena por cultivo em YES, em placas de Petri de 90mm. As placas foram examinadas no sexto e sétimo dias em Cromatovisor Prodicil<sup>MR</sup> equipado com lâmpada de radiação ultravioleta de 30 watts com comprimento de onda de 365 nm, quando foi verificada ou não a presença de halo de fluorescência característica no meio, ao redor da colônia. No décimo dia foram retirados 3 plugs de 5 mm de diâmetro. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio previamente filtrado e

posteriormente centrifugado a 4000 rpm. Recolhido o sobrenadante, o evaporamos em tubos tipo Eppendorf, para posterior análise em CLAE, tendo sido estes, ressuspensos na fase móvel acetonitrila: água: ácido acético (57: 41: 2 v/v), quando procedemos a análise cromatográfica.

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

Para provar a capacidade de produzir aflatoxinas (AFBs) pelas espécies de *Aspergillus* da seção Flavi foi utilizada a metodologia descrita por Geisen et al. (1996). Cada cepa foi inoculada sobre MEA a 28 °C durante 7 dias. O micélio foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf*, pesado previamente e a extração das AFBs foi realizada com 500µL de clorofórmio. Sendo o extrato clorofórmico evaporado, posteriormente resuspenso em clorofórmio e analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) (G60 Merck®, sem indicador de fluorescência). Como fase móvel se utilizou clorofórmio: acetona (9:1). A detecção das aflatoxinas foi realizada por comparação visual com soluções padrões de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 em luz UV de comprimento de onda larga (365 nm).

Para provar a capacidade das cepas de *A. fumigatus* inoculamos em dois meios. Em CAM, para observação de fluorescência com metodologia semelhante às aplicadas as demais espécies e o descrito por Santos et al. (2002), onde um plug de uma colônia de *A. fumigatus* previamente desenvolvida em MEA durante 7 dias incubado em caldo YES por 2 dias a 37°C

com movimento de 1400 rpm. Esse caldo YES, após esse período foi filtrado em papel filtro tipo Whatman Nº 1. O filtrado ficou em agitação com 50 mL de clorofórmio por 10 minutos e a fração clorofórmica separada e evaporada. O extrato foi resuspenso em 200 µL metanol e acondicionado em freezer até o uso. Os extratos foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F254 (20 x 20 cm, 250 µm, (Merck, Germany). A fase móvel utilizada foi clorofórmio:metanol (98:2 v/v).

## **2.7- Detecção e quantificação de micotoxinas**

### **2.7.1- Detecção e quantificação de aflatoxinas e ocratoxina A**

As cepas fúngicas identificadas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CYA, agar extrato de levedura sacarose (YES) e agar leite de coco (CAM), segundo Lin; Dianese (1976).

Para fungos produtores de OTA foi utilizada a técnica descrita por Teren et al. (1996). Foram analisadas quanto a presença de fluorescência e capacidade toxígena por cultivo em YES, em placas de Petri de 90mm. As placas foram examinadas no sexto e sétimo dias em Cromatovisor Prodicil<sup>MR</sup> equipado com lâmpada de radiação ultravioleta de 30 watts com comprimento de onda de 365 nm, quando foi verificada ou não a presença de halo de fluorescência característica no meio, ao redor da colônia. No décimo dia foram retirados 3 plugs de 5 mm de diâmetro. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio previamente filtrado e posteriormente centrifugado a 4000 rpm. Recolhido o sobrenadante, o evaporamos em tubos tipo Eppendorf, para posterior análise em CLAE, tendo sido estes, resuspenso na fase móvel acetonitrila: água: ácido acético (57: 41: 2 v/v), quando procedemos a análise cromatográfica.

As cepas de *P. citrinum* isoladas foram analisadas quanto a capacidade toxígena por cultivo em CAM, em placas de Petri de 90 mm (ROSA, 1985, CRUZ, 1992). Da mesma forma as placas foram incubadas à temperatura de 25°C por sete dias, sendo examinadas no sexto e sétimo dias de incubação, em Cromatovisor Prodicil<sup>MR</sup>, quando a presença ou não de halo de fluorescência no meio. Após a verificação de fluorescência, todas as placas, tanto as de colônias positivas bem como as negativas, tiveram seu conteúdo completamente coletado e triturado em gral e pistilo juntamente com 30 mL de clorofórmio para a extração da toxina. O

macerado foi filtrado obtendo-se o extrato clorofórmico que a seguir foi concentrado, a um volume final de aproximadamente 1 mL, em rotavapor (PEMEM BM-102-ER) acoplado com banho-maria a 40°C. Os extratos foram testados qualitativamente através de CCD para confirmação dos resultados obtidos por CAM. Foram empregadas placas de 20x20 cm de sílica gel 60 com 0,2 mm de espessura (G60 Merck, sem indicador de fluorescência). Estas placas foram previamente ativadas por 60 minutos em temperatura de 130°C. Foram aplicados 5 µL de cada extrato e dos padrões em pontos eqüidistantes. Após o desenvolvimento por 50 minutos em cuba cromatográfica saturada, a cromatoplaça foi observada em cromatovisor sob radiação UV de  $\lambda=365\text{nm}$ , para evidenciação das manchas fluorescentes características.

Para provar a capacidade de produzir aflatoxinas (AFBs) pelas espécies de *Aspergillus* da seção Flavi foi utilizada a metodologia descrita por Geisen et al. (1996). Cada cepa foi inoculada sobre MEA a 28 °C durante 7 dias. O micélio foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf*, pesado previamente e a extração das AFBs foi realizada com 500µL de clorofórmio. Sendo o extrato clorofórmico evaporado, posteriormente resuspendido em clorofórmio e analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) (G60 Merck, sem indicador de fluorescência). Como fase móvel se utilizou clorofórmio: acetona (9:1). A detecção das aflatoxinas foi realizada por comparação visual com soluções padrões de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 em luz UV de comprimento de onda larga (365 nm).

Para provar a capacidade das cepas de *A. fumigatus* inoculamos em dois meios. Em CAM, para observação de fluorescência com metodologia semelhante às aplicadas as demais espécies e o descrito por Santos et al. (2002), onde um plug de uma colônia de *A. fumigatus* previamente desenvolvida em MEA durante 7 dias incubado em caldo YES por 2 dias a 37°C com movimento de 1400 rpm. Esse caldo YES, após esse período foi filtrado em papel filtro tipo Whatman Nº 1. O filtrado ficou em agitação com 50 mL de clorofórmio por 10 minutos e a fração clorofórmica separada e evaporada. O extrato foi resuspendido em 200 µL metanol e acondicionado em freezer até o uso. Os extratos foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60 F254 (20 x 20 cm, 250 µm, (Merck, Germany). A fase móvel utilizada foi clorofórmio:metanol (98:2 v/v).

### 3.7.2- Detecção e quantificação de fumonisina B<sub>1</sub> e deoxivalenol

Foram utilizados *kits* comerciais desenvolvidos e produzidos pela ROMER<sup>®</sup>. (Maine – EUA). Os *kits* ROMER<sup>®</sup> em placa e tubos utilizam o método de ELISA competitivo indireto para análise quantitativa das micotoxinas.

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

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

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

Os calibradores (padrões) de DON utilizados no *kit* corresponderam a 0, 0,2, 1, 2 e 8 µg/L (ppm), e para FB<sub>s</sub> foram 0, 0,3, 1, 3 e 6 µg/L (ppm).



### 3.7.3- Detecção e quantificação de gliotoxina em relação à ocorrência de *A. fumigatus*

Para gliotoxina será utilizada a metodologia de extração e detecção proposta por Boudra; Morgavi (2005), junto com a determinação da frequência de cepas de *A. fumigatus*. As amostras foram secadas em estufa com circulação forçada de ar a 48°C por 72hs. Adicionamos 10 mL de água destilada em frascos contendo 10 gramas de amostra, juntamente também adicionamos 40 mL de diclorometano (DCM). Solvente e amostra ficaram em contato por duas horas em temperatura controlada e agitação mecânica por quinze minutos. Filtrado em papel filtro (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA). Três mL do extrato filtrado foi evaporado em rotaevaporador e resuspendido em 50 uL metanol:água (1:1, v/v) e seguimos com a análise para gliotoxina em CLAE. A separação de Gliotoxina ocorrerá em uma coluna Nucleosil C18 de fase reversa (150 mm×4.6 mm, 5 µm) junto com uma pré-coluna Nucleosil C18, usando um sistema de gradiente de solventes. (solvente A= 10 mL L-1 de ácido acético e solvente B= acetonitrila). O programa de solventes seguirá a seguinte ordem: porcentagem inicial do solvente B será de 10%, seguindo será de 50% em 30 minutos e então 90% por 4 minutos, baixando em seqüência para 10% em 2 minutos num fluxo de 2 mL min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção da gliotoxina é de 14 minutos e a detecção é feita em 254 nM.

### 2.8- Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados foi feita por uma observação da variância através da transformação dos dados em bases logarítmicas. Todos os dados foram transformados usando a função logarítmica  $\log_{10}(x + 1)$  antes da ANOVA. Serão comparadas as médias das contagens totais de propágulos fúngicos nos meios de isolamento geral e substratos de milho e sorgo avaliados. Serão comparados os níveis de micotoxinas nos substratos de milho e sorgo ensilados, nos diferentes níveis de coleta do silo e comparados também o material pré e pós fermentado (STEEL; TORRIE, 1985; AGRETI, 1990; PEREYRA, 2008). O teste de Duncan foi utilizado na comparação dos dados de enumeração fúngica nos diferentes meios de cultivo, e o teste LSD de Fisher foi o escolhido para a comparação dos dados de quantificação das micotoxinas e avaliações físicas. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (*SAS Institute, Cary, NC*).

## 4- RESULTADOS

### 3.1- Avaliação física das amostras, dados climatológicos e localização geográfica

#### 3.1.1- Avaliação física das amostras

Das amostras destinadas as avaliações micotoxicológicas foram realizadas avaliações físicas, de acordo com Ohyama, et al. (1975), Neumann et al. (2004), Ribeiro et al. (2007) e Keller (2009). Foram avaliados a semelhança da bibliografia consultada os parâmetros de pH, matéria seca das amostras e  $A_w$ , onde se buscava observar as condições que o material ofereceria a desenvolvimento fúngico. Os dados expostos nas Tabelas 19 e 20 abaixo estão separados por sorgo pré e pós-fermentado:

**TABELA 19:** Características físicas do sorgo pré-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.

Seção de Amostragem	pH	$A_w$	Temp (°C)	Matéria Seca (%)
	Média ± S	Média ± S	Média ± S	Média ± S
Superior	4,89 ± 0,34	0,809 ± 0,56	26,53 ± 0,48	45 ± 0,25
Intermediário	5,19 ± 0,45	0,813 ± 0,51	26,58 ± 0,55	45 ± 0,28
Inferior	5,31 ± 0,66	0,834 ± 0,23	26,43 ± 0,33	41 ± 0,37
Laterais	5,10 ± 0,45	0,822 ± 0,59	26,42 ± 0,47	42 ± 0,22

S: desvio padrão;  $a_w$ : atividade de água; Temp: temperatura.

**TABELA 20:** Características físicas do sorgo pós-fermentado em diferentes setores de amostragem do silo.

Seção de Amostragem	pH	$A_w$	Temp (°C)	Matéria Seca (%)
	Média ± S	Média ± S	Média ± S	Média ± S
Superior	4,13 ± 0,41	0,766 ± 0,62	26,53 ± 0,48	41 ± 0,25
Intermediário	4,15 ± 0,55	0,759 ± 0,21	26,58 ± 0,55	41 ± 0,29
Inferior	3,89 ± 0,69	0,739 ± 0,45	26,43 ± 0,33	40 ± 0,26
Laterais	4,10 ± 0,56	0,736 ± 0,34	26,42 ± 0,47	41 ± 0,32

S: desvio padrão;  $a_w$ : atividade de água; Temp: temperatura.

Para o sorgo pré-fermentado tiveram variações de pH de 4,5 a 6,0. Atividade aquosa variando de 0,756 a 0,875. Matéria seca variando de 45 a 41%. Para o sorgo pós-fermentados tiveram variações de pH aproximadamente 3,0 a 4,5. Atividade aquosa variando de 0,703 a 0,875. Matéria seca variando de 40 a 41%. As Figuras 13 e 14 em anexo, mostram a condição do material pós-fermentado, bem como as condições que os silos são mantidos nas propriedades.

#### 4.1.2- Dados climatológicos e localização geográfica

A Tabela 06 abaixo mostra valores médios de temperatura, umidade relativa e pluviosidade aferidos durante o período de janeiro de 2009 a julho de 2012.

**TABELA 06:** Temperatura, umidade relativa e pluviosidade média durante o período

Período Avaliado	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)	Pluviosidade Média
	Média ± S	Média ± S	Média ± S
Junho 2007	34 ± 0,3	45 ± 1,0	7,5 ± 1,0
Julho 2007	16 ± 1,0	30 ± 1,0	11,5 ± 0,6
Agosto 2007	22 ± 0,5	33 ± 0,6	10,0 ± 0,8
Setembro 2007	29 ± 0,3	35 ± 0,7	13,5 ± 0,8
Outubro 2007	29 ± 0,5	40 ± 1,0	27,5 ± 1,2
Fevereiro 2008	30 ± 0,8	50 ± 1,0	42,5 ± 1,4
Março 2008	30 ± 0,7	65 ± 0,7	50,0 ± 1,0
Abril 2008	29 ± 0,4	55 ± 0,8	40,0 ± 0,5
Mai 2008	24 ± 0,5	45 ± 0,4	30,0 ± 0,4

S: desvio padrão;

Dados foram retirados dos boletins mensais divulgados pelo INMET - CPTEC / INPE no período 2009 a 2010, 2010 a 2011 e 2011 a 2012.

Para o Brasil os alimentos ensilados na bovinocultura de modo geral têm especial importância durante determinados períodos do ano. Nestes períodos críticos para utilização dos silos temos médias de temperatura ainda altas e umidade relativa do ar baixa.

Nota-se que os locais de coleta apresentaram nos períodos avaliados, um aumento de 2°C em relação à temperatura média brasileira (28°C); uma diminuição de 4 mm<sup>3</sup> diários de chuva em relação a pluviosidade média do Brasil neste mesmo período (40 mm<sup>3</sup>/dia) e menos 2% de umidade relativa em relação a média do país (48%) no período também avaliado.

### 3.2- Contaminação fúngica

A carga fúngica contaminante feita através da enumeração dos propágulos fúngicos e expressa por unidades formadoras de colônia por grama de amostra analisada (ufc g<sup>-1</sup>) estão apresentadas nas Tabelas 21 e 22, separadas segundo o tipo de substrato (sorgo) e sua condição pré e pós-fermentado.

Como o limite de detecção da técnica é de 10<sup>2</sup> ufc.g<sup>-1</sup>, preferiu-se não expressar nas tabelas as contagens de NSA, pois a variação ficou abaixo do limite de detecção da técnica, sendo exposta apenas sua variação (PITT; HOCKING, 1997). O meio NSA é seletivo para fungos do gênero *Fusarium* (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983). Para Agar NSA os valores de contagem de todas as camadas ficaram entre ≤ 1.0 x 10<sup>2</sup> ufc.g<sup>-1</sup>, tanto para o material pré e pós-fermentado.

**TABELA 21:** Contagem fúngica do sorgo pré-fermentado em diferentes meios de cultivo.

Seção de Amostragem	DRBC			DG 18		
	Máx.	Mín.	Média ± S	Máx.	Mín.	Média ± S
Superior	$1,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2 \pm 2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$
Intermediário	$3,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2 \pm 2,0 \times 10^2$
Inferior	$3,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3 \pm 4,6 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3 \pm 6,0 \times 10^2$
Laterais	$3,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3 \pm 4,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3 \pm 4,0 \times 10^2$

S: desvio padrão; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo;

**TABELA 22:** Contagem fúngica do sorgo pós-fermentado em diferentes meios de cultivo.

Seção de Amostragem	DRBC			DG 18		
	Máx.	Mín.	Média ± S	Máx.	Mín.	Média ± S
Superior	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3 \pm 3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^2$
Intermediário	$1,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^3$
Inferior	$2,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4 \pm 6,0 \times 10^3$
Laterais	$2,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4 \pm 4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^3$

S: desvio padrão; Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo;

O limite máximo recomendado para assegurar a qualidade higiênica dos produtos é de  $1,0 \times 10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> (GMP, 2006). A Tabela 23 expressa em valores percentuais quantidade de amostras que tiveram suas contagens de carga fúngica no meio DRBC acima do limite proposto pela GMP, (2006). Sendo o DRBC utilizado por conferir as características necessárias para desenvolvimento da microbiota presente nas amostras e por esse motivo ser o meio de cultivo utilizado para aferir a carga fúngica das amostras.

**TABELA 23:** Percentual de amostras de sorgo contaminadas acima dos limites recomendados.

Sorgo	DRBC
Pré-fermentado	25%
Pós-fermentado	65%

**TABELA 24:** ANOVA das contagens fúngicas comparando diferentes fazendas, substratos pré e pós-fermentados (meio) e setor dos silos avaliados.

Fonte	Quadrado Médio	F	P
Fazenda	0,89104785	2,06	0,1288
Meio	23,23475248	55,30	0,0001
Setor	1,80210083	3,38	0,0039
Faz*meio	22,11333652	53,46	0,0001
Faz*setor	0,91344343	2,27	0,0431
Faz*meio*setor	0,53057679	1,17	0,1493

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

**TABELA 25:** Média e desvio dos silos pré e pós-fermentados de sorgo.

Tipo de Alimento	Sorgo
	média ± desvio padrão
Pré-fermentado - CS	$6,5 \times 10^2 \pm 2,0 \times 10^2$ <sup>a, c</sup>
Pré-fermentado - CI	$1,5 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^2$ <sup>a, c</sup>
Pré-fermentado - CL	$1,5 \times 10^3 \pm 4,6 \times 10^2$ <sup>a, c</sup>
Pré-fermentado - CC	$1,5 \times 10^3 \pm 4,3 \times 10^2$ <sup>a, c</sup>
Pós-fermentado - CS	$7,5 \times 10^3 \pm 3,0 \times 10^2$ <sup>b, c</sup>
Pós-fermentado - CI	$6,7 \times 10^3 \pm 7,5 \times 10^2$ <sup>b, c</sup>
Pós-fermentado - CL	$1,1 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^3$ <sup>b, c</sup>
Pós-fermentado - CC	$1,1 \times 10^4 \pm 4,3 \times 10^3$ <sup>b, c</sup>

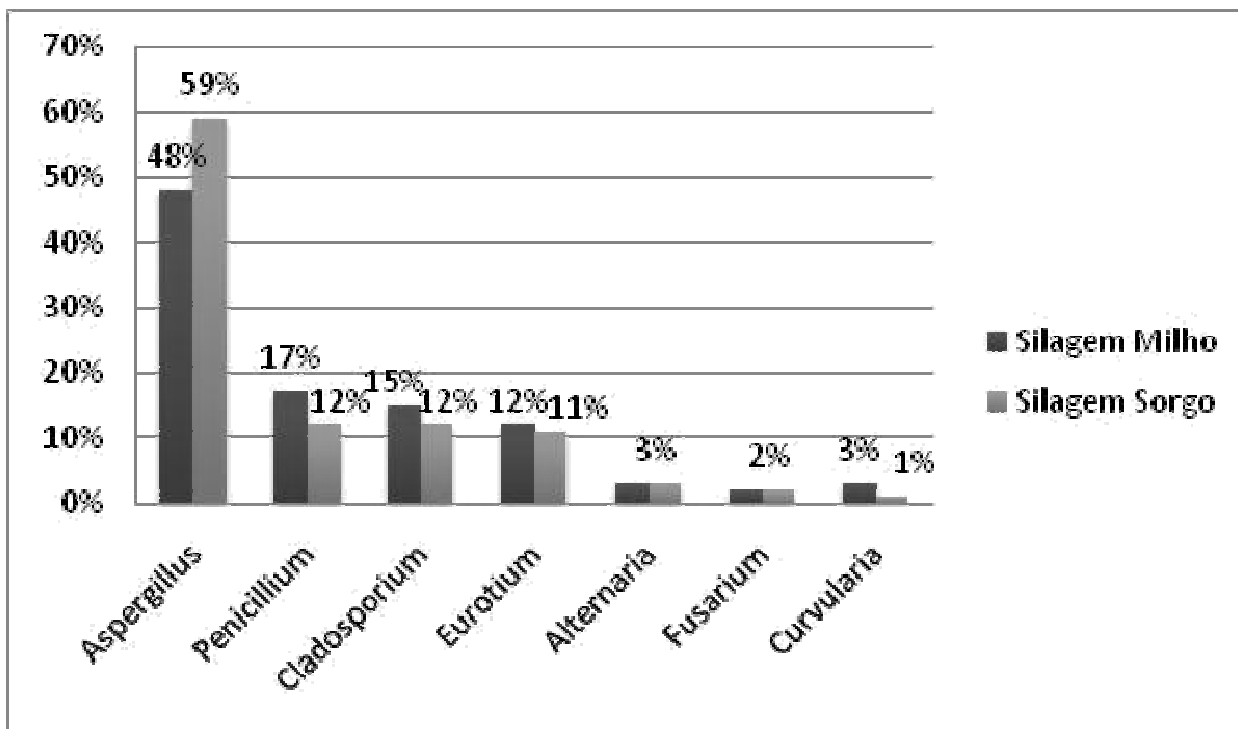
<sup>a</sup> médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,0001$ ).

Das contagens do sorgo pré-fermentado e após serem ensilados (pós-fermentado) observou-se um aumento na carga fúngica com o processo de fermentação, efeito observado na Tabela 25, confirmada com uma diferença significativa através da análise estatística dos valores, com índice de significância em  $P \leq 0,0001$ , se observou diferença estatística significativa entre a carga fúngica dos materiais pré e pós-fermentados.

Tais dados foram expressos nas Tabela 25, onde as letras A e B representam estas diferenças que ocorreram entre o material pré e pós-fermentado. Não foi observado neste estudo, diferenças entre as camadas do silo amostradas, quando submetido ao teste de Fisher.

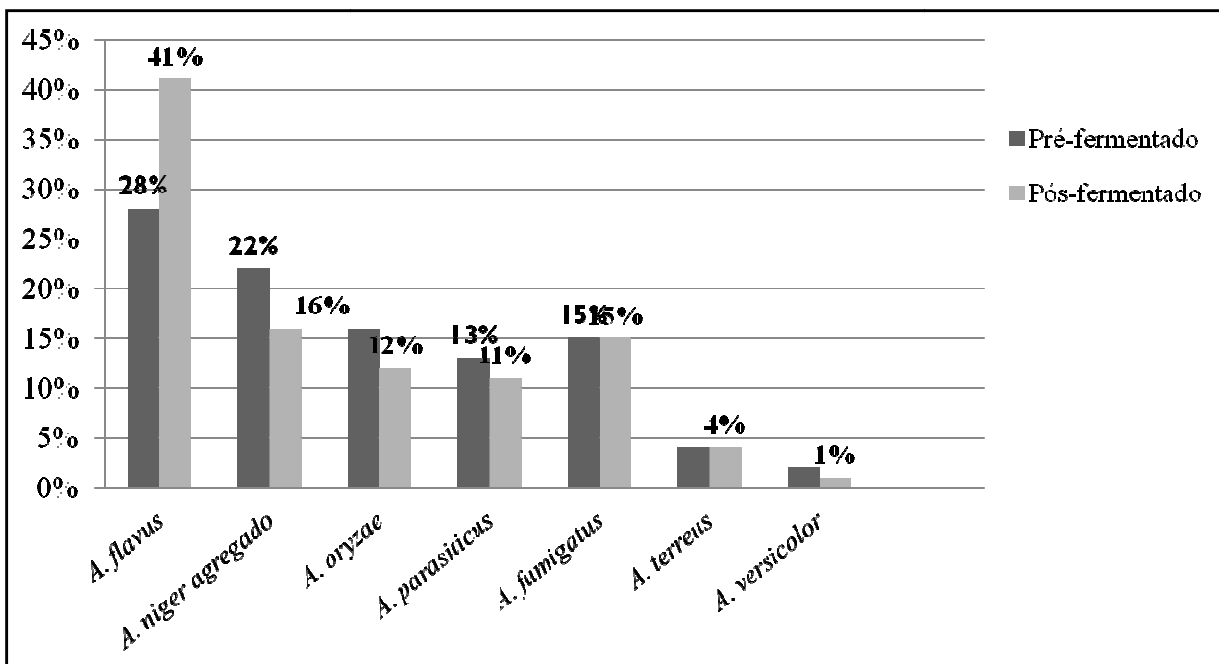
### 3.3- Determinação da micobiota

A distribuição dos gêneros isolados das amostras de sorgo pode ser observada na Figura 12. Foram isoladas 112 cepas das amostras de sorgo, sendo estas pertencentes a sete gêneros filamentosos e leveduras. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e seus teleomorfos, *Penicillium* e *Fusarium* foram alguns exemplos da micoflora isolada. Estes gêneros englobam a grande maioria das espécies citadas na literatura como produtoras de micotoxinas. Na Figura 12 podemos observar que nos silos de milho e sorgo pré-fermentado se encontrou uma contaminação variada, mas semelhante à encontrada no silo após aberto no período de fermentação. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e seus teleomorfos têm uma alteração em sua frequência, *Penicillium* e *Fusarium*.

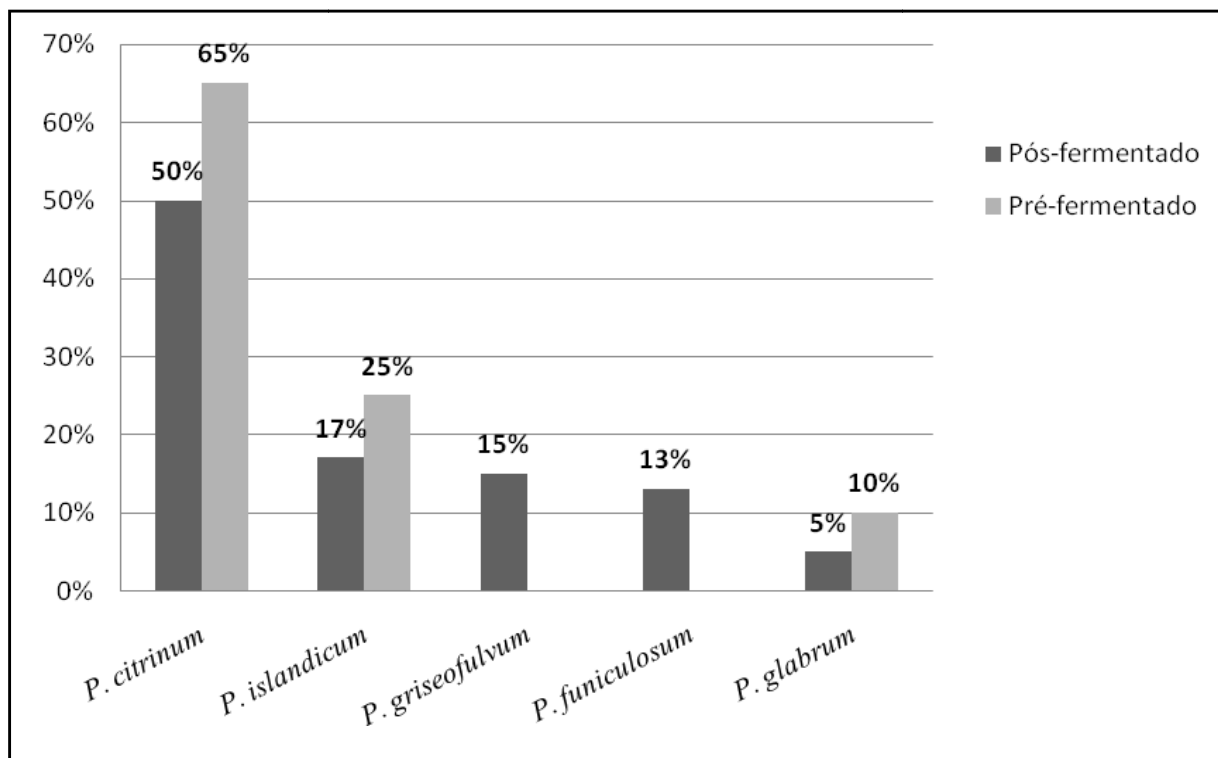


**FIGURA 12:** Frequência (%) de gêneros fúngicos isolados no milho e sorgo pré e pós-fermentado.

Para as amostras de sorgo, foram isoladas um total de 18 cepas do gênero *Aspergillus* no sorgo pré-fermentado e 42 no sorgo pós-fermentado. Das espécies identificadas no sorgo pré-fermentado tiveram para o gênero *Aspergillus* a seguinte frequência neste substrato: *A. flavus* (80%), *A. fumigatus* (6%), *A. terreus* (4%) (Figura 15). Para o gênero *Penicillium* ocorreu uma distribuição de frequência de 65% de *P.citrinum* e 25% de *P. islandicum*, principalmente no material pós-fermentado (Figura 16).



**FIGURA 15:** Densidade relativa (%) de espécies de *Aspergillus* no sorgo pré e pós-fermentado.



**FIGURA 16:** Densidade relativa (%) de espécies de *Penicillium* sp. no sorgo pré e pós-fermentado.

As espécies do gênero *Fusarium* isoladas do sorgo foram *F. verticillioides* e *F. graminearum* num total de 8 cepas do sorgo pré e pós-fermentado.

### 3.4- Contaminação fúngica por Cepas de *Aspergillus Fumigatus*

A avaliação da ocorrência desta espécie nos substratos e camadas dos silos demonstra a importância no nível de contaminação presente nas amostras selecionadas.

**TABELA 26:** Percentual de amostras de sorgo contaminadas por *Aspergillus fumigatus*.

Silagem Sorgo	DRBC
Pré-fermentado	20%
Pós-fermentado	69%

Em outra avaliação apresentada na Tabela 27, possibilita avaliar em que camadas sofreram maior contaminação por esta espécie e qual era a carga contaminante na camada específica em relação à microbiota contaminante geral.

**TABELA 27:** Contaminação de *A. fumigatus* por camadas dos silos de sorgo.

Tipo de Alimento	Sorgo	<i>A. fumigatus</i>
	DRBC (UFC g <sup>-1</sup> )	Frequência (UFC g <sup>-1</sup> )
Pré-fermentado - CS	6,5 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>
Pré-fermentado - CI	1,5 x 10 <sup>3</sup>	ND
Pré-fermentado - CL	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>
Pré-fermentado - CC	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>
Pós-fermentado - CS	7,5 x 10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>
Pós-fermentado - CI	6,7 x 10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>
Pós-fermentado - CL	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>
Pós-fermentado - CC	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>



### 3.5- Perfil toxígeno: habilidade como produtora

Dentre as cepas de *P. citrinum* isoladas (39 cepas), 75% destas foram capazes de produzir citrinina quando cultivadas em CAM e confirmadas por CCD. Depois de quantificadas pela mesma técnica, os índices ficaram entre 1 e 2 ppm (limite de quantificação: níveis  $\geq 0,5$  ppm).

Quanto às cepas de *A. niger agregado* (foram isoladas um total de 43), 18% se mostraram fluorescentes, de coloração esverdeada no CAM e 23% foram ocratoxígenas (OTA), confirmadas por CLAE e com índices de produção em torno de 2-10 ppm (limite de quantificação: níveis  $\geq 0,01$  ppm).

Com relação à secção Flavi foram alcançadas as seguintes observações: 60% das cepas de *A. flavus* produziram uma fluorescência azulada no CAM e foram aflatoxígenas (AFB1 e AFB2), quando testadas pela metodologia proposta e índices variando de 1-5 ppb. Já as cepas de *A. parasiticus* tiveram pouca correspondência no CAM, pois em torno de 40% das cepas demonstraram fluorescência, mas tivemos durante a confirmação das mesmas um índice de 75% de produtividade, porém com índices semelhantes aos da espécie *A. flavi* 1-5 ppb. O limite de quantificação: níveis  $\geq 0,5$  ppb.

Para à secção Fumigati foram alcançadas as seguintes observações: cerca de 83% das cepas de *A. fumigatus*, isoladas de amostras de sorgo, produziram fluorescência no CAM e YES, indicando produção de gliotoxina (GLIO), todas as cepas foram avaliadas por técnicas cromatográficas e quando testadas pelas metodologias proposta tiveram níveis distintos de produção, nos quais os índices podem ser avaliados na Tabela 28 abaixo. Os limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são respectivamente:  $\geq 0,3$  ppm e  $\geq 0,5$  ppm

**Tabela 28-** Produção de Gliotoxina, por cepas de *Aspergillus fumigatus* em silagem de sorgo.

Amostras		Produção de Gliotoxina de <i>A. fumigates</i> (mg/L) <sup>b</sup>		
		Cepas positivas <sup>a</sup>	(%)	Concentração
Sorgo	Pré-fermentado	5/9	55.50	0.1-3
	Pós-fermentado	15/18	83	0.1-34

<sup>a</sup> Número de cepas <sup>b</sup> LOD:  $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ , LOQ:  $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$

### 3.6- Análises micotoxicológicas

#### 3.6.1- Aflatoxinas

Ao serem realizadas as análises das amostras, foi detectada a presença de aflatoxinas. Os dados podem ser observados nas Tabelas 29 e foram encontrados índices de positividade de aproximadamente 25% das amostras contaminadas de sorgo pré-fermentado, com níveis variavam de 1-3  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  e índices de positividade de aproximadamente 37% das amostras contaminadas de sorgo pós-fermentado, com níveis variavam de 2-10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Porém após análise estatística dos dados, observa-se que não ocorreu uma diferença significativa entre substratos ou setores do silo. O limite de detecção da técnica foi de valores  $\leq 0,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

**TABELA 29:** Média e desvio padrão dos níveis de AFs em sorgo quantificados através de CLAE.

Tipo de Alimento	Sorgo		AFB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
	Máx.	Mín.	média $\pm$ desvio padrão
Pré-fermentado - CS	1	0	0,1 $\pm$ 0,78 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CI	1	0	0,1 $\pm$ 0,34 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CL	5	0	0,5 $\pm$ 1,10 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CC	5	0	0,4 $\pm$ 2,10 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CS	10	0	3,1 $\pm$ 1,75 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CI	10	0	10,2 $\pm$ 2,45 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CL	2	0	0,2 $\pm$ 1,21 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CC	1	0	0,1 $\pm$ 0,40 <sup>a,b</sup>

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

#### 3.6.2- Ocratoxina A

Nas amostras de sorgo pré ou pós-fermentado não foram detectados níveis de OTA.

#### 3.6.3- Fumonisina B<sub>1</sub> e deoxinivalenol

Tanto para a FB<sub>1</sub> quanto para o DON foram utilizadas a mesma metodologia ELISA. Ambas as toxinas são produzidas durante o desenvolvimento das plantas, buscou-se avaliar o grau de contaminação que esse material teve durante o período pré-fermentado e como essa

contaminação variou durante o processo fermentativo. O que foi avaliado pode ser observado nas Tabelas 30 e 31.

Foram encontrados índices baixos de contaminação das duas toxinas nos substratos. Para a ocorrência de FB<sub>1</sub> no sorgo pré-fermentado foram detectadas aproximadamente 9% das amostras com contaminação, com níveis variando de 0,47-1 µg g<sup>-1</sup>; no sorgo pós-fermentado foram detectadas aproximadamente 10% das amostras com contaminação, com níveis variando de 0,1-0,25 µg g<sup>-1</sup>.

Para a ocorrência de DON no sorgo pré-fermentado foram detectadas 7% das amostras com contaminação, com níveis variando de 0,15-0,34 µg g<sup>-1</sup>; no sorgo pós-fermentado foram detectadas 9% das amostras com contaminação, com níveis variando de 0,15-0,32 µg g<sup>-1</sup>.

A confiabilidade e os níveis de toxinas detectados no teste são demonstrados através do coeficiente de regressão linear (R<sup>2</sup>) que existe entre a curva padrão de calibração e as amostras que irão sofrer detecção e quantificação. Para o teste de FB<sub>1</sub> tiveram um R<sup>2</sup> = 0,987 (tendo o limite de quantificação com níveis ≤ 0,23 µg g<sup>-1</sup> e ≥ 6 µg g<sup>-1</sup>) e para DON tiveram um R<sup>2</sup> = 0,972 (tendo o limite de quantificação com níveis ≤ 0,12 µg g<sup>-1</sup> e ≥ 2,5 µg g<sup>-1</sup>). Coeficientes citados como satisfatórios pelo fabricante e em literatura (OLIVEIRA et al., 2006).

**TABELA 30:** Média e desvio padrão dos níveis de fumonisina B1 em sorgo quantificados através de ELISA.

Tipo de Alimento	Sorgo		FB <sub>1</sub> (µg g <sup>-1</sup> )
	Máx. - Mín.	média ± desvio padrão	
Pré-fermentado - CS	1,01 - 0	0,35 ± 0,48 <sup>a,b</sup>	
Pré-fermentado - CI	0,43 - 0	0,29 ± 0,11 <sup>a,b</sup>	
Pré-fermentado - CL	1,04 - 0	0,34 ± 0,11 <sup>a,b</sup>	
Pré-fermentado - CC	0,45 - 0	0,23 ± 0,097 <sup>a,b</sup>	
Pós-fermentado - CS	0 - 0	0 ± 0 <sup>a,b</sup>	
Pós-fermentado - CI	0,25 - 0	0,06 ± 0,04 <sup>a,b</sup>	
Pós-fermentado - CL	0 - 0	0 ± 0 <sup>a,b</sup>	
Pós-fermentado - CC	0,1 - 0	0,03 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher (P ≤ 0,05).  
Máx.: Valor máximo; Mín.: Valor mínimo;

**TABELA 31:** Média e desvio padrão dos níveis de deoxinivalenol em sorgo quantificados através de ELISA.

Tipo de Alimento	Sorgo	DON ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
	Máx. - Mín.	média $\pm$ desvio padrão
Pré-fermentado - CS	0,34 - 0	0,15 $\pm$ 0,05 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CI	0,21 - 0	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CL	0,55 - 0	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CC	0,15 - 0	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CS	0,15 - 0	0,06 $\pm$ 0,04 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CI	0,32 - 0	0,1 $\pm$ 0,2 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CL	0 - 0	0 $\pm$ 0 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CC	0 - 0	0 $\pm$ 0 <sup>a,b</sup>

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

#### 3.6.4- Gliotoxina

Ao serem realizadas as análises por CLAE das amostras de silagens, foi detectada a presença de gliotoxina. Os dados podem ser observados na Tabela 32, onde foi demonstrada uma positividade de 30% para sorgo pré-fermentados respectivamente, com níveis de contaminação que variavam de 0,1-2,0  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Porém quando se avaliam os substratos após o processo de fermentação esta frequência sofre alteração aumentando sua ocorrência no sorgo pós-fermentado, sendo 60% para as silagens de sorgo, com níveis que variavam de 0,1-34,0  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Porém após análise estatística dos dados, observa-se que não ocorreu uma diferença estatística significativa entre substratos ou setores do silo. O LOD e LOQ da técnica cromatográfica foram, respectivamente de 0,3  $\mu\text{g.g}^{-1}$  0,5  $\mu\text{g.g}^{-1}$ .

**TABELA 32:** Média e desvio padrão dos níveis de gliotoxina em sorgo quantificados através de CLAE.

Tipo de Alimento	Sorgo	GLIO ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
	Máx. - Mín.	média $\pm$ desvio padrão
Pré-fermentado - CS	1,00 - 0	0,45 $\pm$ 0,25 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CI	0,12 - 0	0,19 $\pm$ 0,031 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CL	0,34 - 0	0,18 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>
Pré-fermentado - CC	0,19 - 0	0,13 $\pm$ 0,07 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CS	22,15 - 0	11,06 $\pm$ 0,24 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CI	23,12 - 0	12,11 $\pm$ 0,2 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CL	13,20 - 0	7,03 $\pm$ 0,33 <sup>a,b</sup>
Pós-fermentado - CC	10,22 - 0	8,50 $\pm$ 0,54 <sup>a,b</sup>

Médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4- DISCUSSÃO

Muitos dos valores encontrados no estudo, das características físicas das amostras foram adequados segundo padrões propostos por Teixeira, et al. (2009), Neumann, et al. (2004) e Almeida (2000), pH variando de 3,0 a 6,5, atividade aquosa variando de 0,800 a 0,584 e matéria seca variando de 48 a 20%. Desta forma se avaliou um produto comum, que se reflete na situação da bovinocultura brasileira, uma variabilidade muito grande. Os parâmetros físicos dos materiais ensilados com pouca homogeneidade nos parâmetros, não garantindo assim uma qualidade no tipo de material desejado ao final do processo, demonstrando que os cuidados com os procedimentos de confecção da silagem, devem ser levados a sério a fim de buscar um produto mais homogêneo e de qualidade ao final. Maiores teores de umidade, juntamente com atividade de água demonstraram maior atividade biológica, mesmo em condições de anaerobiose, porém determinarão ao final do processo produtos de melhor qualidade quanto a parâmetros estabelecidos em bibliografia como digestibilidade e palatabilidade. Tais parâmetros não foram avaliados e poucos estudos correlacionam inocuidade do alimento, com maior grau de digestibilidade ou problemas decorrentes no processo digestivo dos animais.

Após avaliação dos dados obtidos e apresentados nas Tabelas 19 e 20 observou-se que os substratos estiveram com as características físicas de acordo com aqueles relatados na literatura por González Pereyra et al. (2007) e Whitlow et al. (1999). As avaliações estatísticas dos dados obtidos, não mostraram diferença significativa entre as fazendas, setores do silo e tipos de substratos avaliados, quando comparados pelo teste estatístico proposto no estudo (teste de LSD de Fisher  $P \geq 0,001$ ). Correlaciona-se esta não diferença estatística às condições climáticas muito semelhantes entre as propriedades, devido a estas fazendas estarem próximas, localizadas na mesma macro região do sudeste brasileiro, segundo o INMET / CPTEC / INPE.

Cabe relatar que existiram diferenças visuais na comparação de materiais que apresentavam teores de umidade e  $A_w$  distintos, porém quando avaliamos as médias dos substratos pré e pós-fermentados isso não se confirmou quando aplicado o teste estatístico. Contudo a literatura cita (GIMENO-ADELANTADO et al., 2008; RICHARD et al., 2009; 2006) que existem diferenças estatísticas significativa nessa comparação, onde materiais com maiores níveis de  $A_w$  e Umidade apresentam maiores teores de atividade biológica nociva ao final do processo de fermentação.

Importante também avaliar sobre que condições climáticas os silos são expostos nas localidades em que eles são armazenados. Através da avaliação física das amostras, juntamente com os dados climatológicos e observação durante o procedimento de coleta das amostras de pontos de acúmulo de umidade, juntamente com crescimento de micélio fúngico, que esse material poderia apresentar uma qualidade higiênica insatisfatória. Tais dados levaram a suspeita de uma microbiota variável e de gêneros adaptados a baixas atividades de água e altas temperaturas (PEREYRA et al. 2008; WHITLOW et al. 1999; MOSS, 1991). Tais dados apenas reforçaram a variabilidade da microbiota que se esperava encontrar no estudo, após avaliação física das amostras e geoclimática, sendo as condições locais de altas temperaturas e pluviosidade intermediária, além de baixa de umidade são características favoráveis para o desenvolvimento e crescimento de fungos xerofílicos. Muitos estudos no Brasil demonstram que estas condições se mostraram bastante favoráveis para o desenvolvimento destes tipos de fungos, na região sudeste do Brasil. (KELLER et al., 2008; CAMPOS et al., 2008; FRAGA et al. 2007). Uma menor variabilidade no sorgo em relação a outros substratos como o milho pós-fermentado pode estar relacionada com detalhes eco-fisiológicos, onde condições não adequadas e competição com outros gêneros interferiram na variabilidade. Vale resaltar que não existem estudos até o momento que façam a avaliação micológica de sorgo. Outro dado importante a ser relatado está em consideração aos tipos de cultivares hoje mais frequentemente utilizados nos processos agrícolas, de modo geral a maior parte dos cultivares ainda hoje utilizados são principalmente sorgo (*Sorghum bicolor*, Variedade Crioulas), amplamente utilizadas e adaptadas as nossas condições de clima.

Para a avaliação da microbiota presente no sorgo o meio DG18 se torna uma alternativa bastante viável, por ser seletivo para fungos xerofílicos, ou seja, suportam crescimento em baixas  $A_w$  (PITT; HOCKING, 1997), os cultivos neste meio auxiliaram no isolamento e contagens paralelas as que foram encontradas em meio DRBC. Com os dados da literatura e os dados climáticos expostos na Tabela 6, já era esperada uma maior frequência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais apresentam estas características. Estas espécies fúngicas, frequentemente são encontradas nesse tipo de substrato, pois a semelhança da bibliografia foram obtidas contagens acima de  $10^4$  ufc.g<sup>-1</sup>, permitindo uma grande variabilidade fúngica neste meio (PEREYRA et al., 2008; RICHARD et al., 2006; 2007; GOURAMA et al., 1995). Observaram-se altos percentuais de contaminação fúngica acima do limite proposto pela GMP (2006) em todos os substratos avaliados. Junto a isso ocorreu um aumento na carga contaminante, quando avaliamos o material pré e pós-fermentado, demonstrando que o

processo fermentativo aumenta em pelo menos 10 vezes a carga fúngica em relação ao material pré-fermentado. Assim procedimentos devem ser revistos, com finalidade de apontar pontos críticos no processamento e diminuir esses índices.

Estes aumentos foram descritos de forma semelhante na literatura por González Pereyra et al., (2007) e Amigot, et al. (2006), porém os níveis de contaminação no país do estudo (Argentina) foram maiores. Os valores máximos para milho estavam na faixa de  $1,0 \times 10^5$  até  $5,0 \times 10^7$  ufc.g<sup>-1</sup>. Os dados expressos nas Tabelas 15 e 16 estão de acordo com a literatura encontrada referente ao assunto, onde foram observadas diferenças, no que diz respeito à contaminação fúngica entre as camadas amostradas do silo, os tipos de substratos vegetais e seu estado fermentativo. Amigot, et al. (2006) em suas amostras na Argentina, observou diferença entre pontos do silo onde sua maior contaminação ocorreu em camadas da superfície do silo, descritas como mais expostas e que sofreram menor compactação. Richard et al. (2009; 2007) fez observações na Europa semelhantes, onde apenas descreve que a maior contaminação está relacionada com um menor grau de compactação e possivelmente o tipo de substrato ensilado, visto que este autor avaliou além de milho outras bases vegetais, dentre elas o sorgo e cevada umida. Mansfield et al. (2005) nos Estados Unidos, também avaliaram que ocorreu um aumento proporcional entre porções e fase fermentativa do substrato, principalmente relacionada a compactação. E, além disso, correlacionou fatores de clima de maior pluviosidade, material ensilado com um grau de Aw elevada como também responsáveis pelo aumento da carga fúngica em porções dos silos.

Neste estudo contagens do gênero fúngico *Fusarium* foram reduzidas, principalmente no sorgo após ser ensilado. Acreditou-se que essa ocorrência pode ser influência de condições climáticas não adequadas para desenvolvimento deste gênero fúngico e, além disso, também as condições de pH e pressão de oxigênio baixas que estas espécies estavam expostas nos silos, reafirmando o que a literatura relata, onde possivelmente estes valores, estão relacionados com condições inadequadas para um desenvolvimento favorável no que diz respeito às condições climáticas essenciais (MANSFIELD et al., 2005).

O processo de compactação e anaerobiose não sendo bem realizados colaboram para a contaminação e microbiota variada (VAN SOEST et al. 1994). Mesmo afirmando pela literatura, atualmente já é considerado que as condições de anaerobiose dos silos, principalmente de superfície, não impedem o metabolismo e desenvolvimento, principalmente dos fungos filamentosos. Da mesma forma que as literaturas consultadas o gênero *Aspergillus* foram os mais freqüentes isolados na América do sul de silagens para alimentação de bovinos



(PEREYRA et al. 2008). Não apenas em silagens bovinas, mas em diferentes substratos para alimentação de animais temos a ocorrência dos três gêneros principais *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, de forma concomitante nas americas (MAGNOLI, et al. 2005; MANSFIELD et al. 2005). Temos também estudos recentes no Brasil, como os de Keller et al. (2007) e Campos et al. (2008) encontrando em rações para alimentação animal os mesmos gêneros também como o mais frequentes. Rosa et al. (2006) e Oliveira et al. (2006) quando estudaram a micobiota toxígena de produtos vegetais em rações onde o milho é o ingrediente principal destinadas à alimentação de frangos de corte, em fábricas de rações do Estado do Rio de Janeiro. Estes autores observaram que o gênero *Aspergillus*, foi o mais freqüente (41%), seguido por *Penicillium* sp. (40%) e *Fusarium* sp. (15 %), dentre outros. Fraga et al. (2007) analisaram amostras de milho e de rações para os diferentes estágios de criação de frangos de corte no Estado do Rio de Janeiro. *A. flavus*, *A. candidus* e espécies de *Eurotium* sp. foram os fungos mais observadas nas amostras de milho e ração inicial. Já nas amostras de ração de terminação, os gêneros mais freqüentes foram novamente *A. flavus*, espécies de *Eurotium* e *A. niger agregado*. Segundo a literatura o *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são as espécies comumente associadas com a contaminação do milho e seus produtos derivados (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; MAGNOLI et al. 1998; RIBEIRO et al. 2007). Sendo o *Fusarium verticillioides* a espécie deste gênero que mais foi isolada no estudo.

Um dado importante a ser relatado, bem como avaliado de forma separada é a ocorrência de cepas de *A. fumigatus* nas amostras selecionadas. Sua ocorrência em um grande percentual de amostras, reintera a importância de estudos prospectivos, que irão prover dados e estatísticas, a fim de determinar as condições às quais os animais, bem como as pessoas, que tem algum contato com estes materiais estarão expostas. A ocorrência freqüente desta espécie, muito comum nos mais variados ambientes (PEREYRA et al., 2008; BOUDRA e MORGAVI, 2005). Assim sendo sua ocorrência em níveis altos e em grande parte das amostras traz um alerta a saúde dos animais, bem como os trabalhadores que estarão lidando com este material contaminado, pois tais cepas tem grande capacidade invasiva, podendo promover tanto a patologia direta, conhecida como Aspergilose, bem como efeitos secundários pelos metabólitos presentes nos alimentos ensilados.

A importância na determinação e avaliação da micoflora é de poder prover informações sobre possíveis micotoxinas que potencialmente estariam presentes na amostra, bem como a avaliação da capacidade das cepas quando em condições adequadas de

produzirem micotoxinas. Com relação aos dados gerados neste estudo, se mostraram semelhantes aos de outros grupos que encontraram cepas potencialmente produtoras nesse mesmo padrão de substratos, como Richard et al., (2009; 2007; 2006), Hennigen et al., (1995), Boudra e Morgavi (2005) que avaliaram em condições e forma semelhantes a produção de toxinas por cepas isoladas em seus estudos, demonstrando que quando estimuladas se mostraram competentes e capazes em produzir micotoxinas, mesmo em supostas condições adversas. Cabe ressaltar que a ocorrência de Gliotoxina, bem como outras toxinas de maneira simultânea nestes silos, merecem maior destaque com relação a estudos futuros para a prospeção de dados que busquem os efeitos da cocorrência destas micotoxinas e seus efeitos.

Com relação às micotoxinas isoladas das amostras de silo, de forma semelhante à bibliografia foi demonstrado que ocorrência em variados graus de contaminação de micotoxinas ocorre por todo o silo, porém existiram setores e porções do silo que podem sofrer uma maior contaminação, variando com as condições no local onde é armazenado e mantido (GOURAMA et al., 1995). No Brasil temos autores como Hennigen et al. (1995) que no Rio Grande do Sul demonstra a contaminação de pelo menos 30% de cada amostra de milho avaliada com níveis acima de 20 ppbs. Pereira et al. (2005) num estudo realizado na região de Minas Gerais também detectou níveis de AFB<sub>1</sub> nas amostras de silagem, chegando também a 10 µg Kg<sup>-1</sup>. Sassahara et al. (2003) realizou uma avaliação das porções de silos para alimentação de bovinos de leite, encontrando níveis também de até 100 µg Kg<sup>-1</sup> não apenas no milho, mas em vários outros substratos, coletados no norte do Estado do Paraná. González pereyra et al. (2007) juntamente com outros autores buscavam monitorar a matéria pré e pós-fermentada, encontrando níveis que variavam de 10-80 µg Kg<sup>-1</sup> no material pós-fermentado e níveis menores de até 30 µg Kg<sup>-1</sup> de AFs totais no material pré-fermentado, não conseguiram determinar uma porção mais contaminada do silo, mas conseguiram destacar que apesar do processo fermentativo os níveis de toxina subiam, determinando atividade biológica ativa mesmo em condições de anaerobiose.

Em silos de sorgo pré ou pós-fermentados outros autores também encontram níveis baixos de OTA nos substratos avaliados (AMIGOT et al., 2006; RICHARD et. al., 2006, 2007). A OTA para os bovinos poderá prejudicar a digestão dos mesmos, tendo sua ocorrência mesmo em níveis baixos como uma preocupação para a espécie, devido a esta afetar diretamente a microflora ruminal dos animais, dificultando assim o processo digestivo,

podendo indiretamente gerar de simples problemas na absorção de nutrientes até sintomas mais graves (WHITLOW et al., 1999).

A avaliação de multitoxinas e seus níveis determinaram ocorrência das toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* como citado na literatura, principalmente em material pré-fermentado, porém os níveis foram baixos quando comparados aos citados. Sassahara et al., (2003) no Brasil por CCD detectou níveis de ZEA de até  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  em milho pré-fermentado indicando que silos apresentavam contaminação por toxinas produzidas por *Fusarium* sp. Outros estudos que avaliaram a presença de FB<sub>1</sub> em milho *in-natura* ou rações a base de milho, mostram que essa toxina é uma preocupação. Keller et al. (2007) mostraram uma incidência preocupante de mais de 50% de amostras contaminadas com níveis de pelo menos  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Neste estudo os níveis de FB<sub>1</sub> foram menores do que os expostos na literatura, porém os efeitos crônicos e a ingestão continuada de toxina, bem como seus efeitos aditivos são o foco da preocupação deste e outros estudos (LOGRIECO et al., 2002; GIMENO et al., 2008). Mansfield et al., (2005); Doko et al., (1996) correlacionaram que há diminuição dos níveis de toxina após processo fermentativo ou tratamentos térmicos, devido a degradação das moléculas de toxina presente. Tal efeito também foi observado neste estudo quando tiveram a diminuição das médias do material pré para o pós-fermentado, no entanto esta diferença não se mostrou significativa, bem como a diferença entre as camadas amostradas do silo. Possivelmente atribuem-se às condições climáticas impostas as culturas de milho e sorgo nas regiões avaliadas e as condições inadequadas de desenvolvimento durante o processo de fermentação as diferenças dos níveis de toxina. Assim sendo não foram obtidos níveis altos de contaminação por toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, porém estavam presentes.

## 5- CONCLUSÕES

As condições adversas do silo não foram satisfatórias para inibir o desenvolvimento da micobiota. As características físicas, avaliadas dos silos, demonstraram condições adequadas para o crescimento fúngico: pH entre 3-5, Aw entre 0,910-0,756. Demonstrada também pela micobiota encontrada que foi variada e com uma carga fúngica variando de  $7,2 \times 10^5$  até  $2,0 \times 10^2$ . Logo, apesar do processo de compactação pelo qual passa o silo, este está sendo ineficiente para inibir o seu desenvolvimento durante o período de fermentação.

As condições climáticas das regiões do estudo demonstraram serem favoráveis para o desenvolvimento de fungos xerofílicos. Fato esse comprovado pelo gênero *Aspergillus* ser o mais freqüente nas várias amostras avaliadas e as espécies *A. flavus* e *A. fumigatus* ocorrerem tanto no milho e sorgo pré e pós-fermentados.

A umidade e temperatura médias das localidades durante os períodos de fevereiro a maio dos anos avaliados (2009 a 2012) não favoreceram o desenvolvimento de fungos do gênero *Fusarium*, sendo estes mais exigentes com relação a temperaturas mais amenas e umidades mais favoráveis para seu desenvolvimento adequado no material pré-fermentado. Já no material pós-fermentado as condições de pH, temperatura e baixa concentração de oxigênio dificultaram o desenvolvimento da micobiota do gênero *Fusarium*.

A variabilidade da micobiota, junto com observações de crescimento fúngico sob as amostras durante os procedimentos de amostragem, demonstram que o processo de compactação e isolamento, pelos quais passam o silo, está sendo ineficiente para inibir o seu desenvolvimento durante o período de fermentação.

O processo fermentativo aumenta em pelo menos 10 vezes a carga fúngica em relação ao material pré-fermentado. Assim procedimentos devem ser revistos, com finalidade de apontar pontos críticos no processamento e diminuir esses índices.

*A. flavus* e *A. parasiticus* ocorreram em altas freqüências nas amostras que foram avaliadas. Bem como contaminação de aflatoxinas nas amostras de sorgo. Demonstrando uma correlação com a presença de cepas produtoras e presença de micotoxinas, o que indica o risco a saúde dos bovinos alimentados com estes substratos.

*P. citrinum*, foi à espécie do gênero com a maior freqüência nas amostras. Chegando a ser 50% das cepas isoladas deste gênero. Além de 75% destas cepas tiveram a capacidade de produzir citrinina quando estimuladas.

*A. fumigatus*, principalmente no milho pós-fermentado, chegou a ocorrer em 76% das amostras. Destas cepas todas tiveram a capacidade de produzir GLIO quando estimuladas.

Demonstra um risco devido a pouca inocuidade do material, oferecendo chances de risco aos animais e indivíduos que terão contato com este material.

Existe contaminação em níveis acima da legislação permitida para consumo animal para AFs em muitas porções de silos avaliados (MAPA, 1988). Além disso, existe contaminação por OTA, GLIO, FB<sub>1</sub> e DON (estas últimas em níveis mais baixos), porém estão presentes tanto no milho ou sorgo pré ou pós-fermentado, oferecendo risco ao rebanho que consome este material, pela ingestão continuada destes níveis.

A metodologia ELISA utilizada para detecção e quantificação dos níveis de FB<sub>1</sub> ( $R^2 = 0,987$ ) e DON ( $R^2 = 0,972$ ) foi adequada, pois permitiu uma rápida avaliação de um número grande de amostras, com uma grande segurança nos resultados obtidos.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Archives of Microbiology*, v. 192, n. , p.409–425, 2010.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023 - Informação e documentação - Referências - Elaboração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24 p.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10522 - Informação e documentação - Citações em documentos - Apresentação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 7 p.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Editado por HELRICH, K., Secciones: 935.76, 936.20, Washington, DC, EUA: AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Editado por HELRICH, K. Secciones: 975.35, 976.22, Washington, DC, EUA: AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- ALMEIDA, J.C.C. **Avaliação das características agrônomicas e das silagens de milho e de sorgo cultivados em quatro densidades de semeadura**. Jaboticabal, São Paulo: UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2000. Tese de Doutorado em Zootecnia 82 p.
- AMIGOT, S.L.; FULGUEIRA, C.L.; BOTTAIB, H.; BASÍLICO, J.C. New parameters to evaluate forage quality. **Postharvest Biology and Technology**. v. 41, n. 1.2, p. 215-224, 2006.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 274 - Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho**. 2002. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm)>. Acesso em: 13 mar 2008.

- ASPLIN, F.D.; CARNAGHAN, R.B.A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their affect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1215-1219, 1961.
- BENNETT, J; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BHATNAGAR, D.; TAKAHASHI, T.; CHANG, P.K.; MATUSIHIMA, K.; YU, J.; ABE, K.; CLEVELAND, T.E.; KOYAMA, Y. Mycotoxins: Current issues in U.S.A. **Meeting the Mycotoxin Menace Book**, 2003.
- BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.
- BLOUNT, W.P. Turkey “x” Disease. **Turkey**, v.9, p.55-58, 1961.
- BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.113-131, 2005.
- CAMPOS, S.G. de; CAVAGLIERI, L.R.; KELLER, L.A.M. ; JURI, M.G.F. ; DALCERO, A. M.; MAGNOLI, C.; ROSA, C.A.R. Mycoflora and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 377-383, 2008.
- CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Micotoxins: risks in plant, animal and humans systems**. Iowa, USA: Task Force Report nº 139, 2003. 199 p.
- CEPETEC / INPE - CENTRO DE PREVISÃO DO TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS / INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Boletins Climatológicos**. n. 350 - 355. Disponível em: < [http://www.agritempo.gov.br/boletins/boletim\\_RSE.html](http://www.agritempo.gov.br/boletins/boletim_RSE.html)>. Acesso em: 20 dez 2007 e 27 jun 2008.

- COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York: Academic Press, 1981.
- CRUZ, L. C.H.; ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G. **Aflatoxicose aguda em suínos no Estado do Rio de Janeiro**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, v. 7, n. 5, p. 127-128, 1985.
- CRUZ, L.C.H.; CAMPOS, S.G.; ROSA, C.A.R. **Aplicação do Ágar-Coco como Meio Diferencial para o isolamento de Fungos Citrinogênicos**. Itaguaí, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v.15 n.1, p. 39-60, 1992.
- CRUZ, L.C.H. Micotoxinas são tão importantes. In: Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana, RJ. **Anais do Encontro de Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana**. Itaguaí, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. p. 1-12.
- CRUZ, L.C.H. **Citrinina – uma micotoxina produzida por *Penicillium citrinum* Thom: aspectos microbiológicos, bioquímicos e toxicológicos**. Seropédica, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 267p.. Tese de Doutorado em Sanidade Animal
- DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.
- DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 781-803, 1998.



DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. Piracicaba, SP. **Anais do XI Encontro Nacional de Micotoxinas**, SP: Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. p. 32-35.

D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.

DOKO, M. B.; BROWN, N.; SYDENHAM, E. W. MPUCHANE, S.; SIAME, B. A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n.10, p. 3240-3243, 1996.

ELLING, F. ; MOLLER, T. Mycotoxic nephropaty in pigs. Bull. **Wld. Hlth. Org.**, v. 49, p. 411-418.1973.

EMBRAPA – Embrapa Gado de Leite. **Sistema de Produção 4. Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>Acesso em 05 mai. 2011.

EMBRAPA – Embrapa Gado de Leite. **Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>Acesso em 11 jul. 2011.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZACION. Pan-European Conference on Food Safety and Quality 2003. **Compendium FAO Veterinary Public Health and Food and Feed Safety Programme: the Safety of Animal Products from Farm to Fork**. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/livestock/AGAP/FRG/FEEDSAFETY/feedsafety.htm>>. Acesso em: 27 Jun 2008.

- FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.A.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.
- FRIIS, P.; HASSELAGER, E.; KROGH, P. Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. **Acta Path. Microbiol. Scand**, v. 77-B, p. 559-560, 1969.
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. CHELKOWSKI, J. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 441-476.
- GARDINER, D. M.; HOWLETT, B. J. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. , p. 241-248, 2005.
- GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.19, p.388-392, 1996.
- GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, F.; JIMENEZ, M.; MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 196–203, 2008.
- GMP – GOOD MANUFACTURE PRATICE. Certification Scheme Animal Feed Sector. **Appendix 1: Product standards (including residue standards)**. The Hague, the Netherlands: Productschap Diervoeder, 2006. p. 1-39.
- GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; ALONSO, V.A.; SAGER, R.; MORLACO, M.B.; MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre and

- postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034–1041, 2007.
- GOURAMA, N.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v.58, n.12, p.1395-1404, 1995.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**. v.95, p.641-655, 1991.
- HENNIGEN, M. R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v.12, n.5, p.677-681, 1995.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, 2nd ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 445p.
- HOCKING, A.D.; PITT, J. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied. Environment. Microbiology**, v.39, p.488-492, 1980.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-521, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. São Paulo: IBGE, v. 31, p.1-31, 2006.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. São Paulo: IBGE, v. 29, p.1-33, 2010.

- KEEHN, D.M.; FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nurs**, v. 14, n. 4, p. 163-174, 1991.
- KELLER, L. A. M. **Avaliação micológica e micotoxicológica de silagens destinadas à alimentação de bovinos de fazendas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – Rio de Janeiro. 2009.
- KELLER, K.M.; KELLER, L.A.; M OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X., GARCIA, R.S., ROSA, C.A.R. Avaliação micotoxicológica em produtos destinados à alimentação de caprinos leiteiros em Teresópolis, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v.30, n. 2, p.91-96, 2008.
- KELLER, K.M.; QUEIROZ, B.D.; KELLER, L.A.M.; RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The mycobiota and toxicity of equine feeds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, 2007.
- KHOUFACHE, K; PEUL, O; LOISEAU, N; DELAFORGE, M.; RIVOLLET, D.; COSTE, A.; CORDONNIER, C.; ESCUDIER, E.; BOTTEREL, F.; BRETAGNE, S. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysical properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology*, v. 7, Art. 5, 2007.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I., **Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Sydney, Austrália: Academic Press, 1988. 116p.
- KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 122 p.
- KUPFAHL, C.; HEINEKAMP, T.; GEGINAT, G.; RUPPERT, T.; HARTL, A.; HOF, H.; BRAKHAGE, A. A. Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of

gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 292-302, 2006.

- KWON-CHUNG, K. J.; SURGUI, J. A. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? **Medical Mycology**, v. 47, suplemento 1, p. S97-103, 2009.
- LILLEHOJ, E.B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 1-35.
- LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A coconut – Agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, n.12, p. 1466-1469, 1976.
- LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 597–609, 2002.
- MADHYASTHA, S.M., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., PLATFORD, G., ABRAMSON, D. Effects of different cereals and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *A. alutaceus* and *P. verrucosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1506-1510, 1990.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, p. 27-32, 1998.
- MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A. The mycobiota and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 7-22, 2002.
- MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIOS, G.; DALCERO, A. Surveillance of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in

- Feedstuffs from Córdoba Province, Argentina. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 5, p. 431-445, 2005.
- MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochatoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 249-260, 2007.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria nº 07** de 09 nov 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, p. 21968, 1988.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções de Agronegócio Mundial e Brasil 2006/2007 a 2017/2018**. AGE - Agência de Acessória Estratégica. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2909DCC5111A4D7BE040A8C0750251C9>>. Acesso em: 21 out 2008.
- MILLER, J.D. Global Significance of Mycotoxins and Phycotoxins. In: **Proceedings of IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. Rome, 1996. 31p.
- MORGAVI, D.P.; RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with Fusarium toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 201–212, 2007.
- MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 23-51.
- MORTIMER, D.N.; GILBERT, J., SHEPHERD, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxins M<sub>1</sub> in liquid and powdered milk using affinity column cleanup. **Journal of Chromatography**, v. 407, p. 393-398, 1987.
- MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 27, p. 62S-72S, 1998.

- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence?. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- NIEMINEN, S. M.; MÄKI-PAAKKANEN, J.; HIRVONEN, M. R.; ROPONEN, M.; WRIGHT, A. von. Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in a battery of short-term test systems **Mutation Research**, v. 520, n. 1-2, p. 161–170, 2002.
- NEUMANN, M.; RESTLE, J.; BRONDANI, I. L. Avaliação de silagens de sorgo (*sorghum bicolor*, L. Moench) ou milho (*zea mays*, L.) Na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.3, p.438-452, 2004.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. (Eds.). **Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification**. USA: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 355-362, 2006.
- OHYAMA, Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.26, p.1137-1147, 1975.
- OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Criterios de Salud Ambiental, 11: Micotoxinas**. Washington: OPS. 1983. (OPS. Publicación Científica, 453).
- OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.

- PASTER, N., BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, p.257-265, 1988.
- PARKER GF, JENNER PC. Distribution of tryptacidin in cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology*; v. 16, n. 8, p. 1251-1252, 1968.
- PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; RIBEIRO, J.M.M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciências e agrotecnologia de Lavras**, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
- PEREYRA, M.L.G.; Alonso, V.; MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 1034-1041, 2008.
- PIMENTEL, D. World resources and food losses to pests. In: GORHAM, J.R. (Ed.). **Ecology and Management of Food Industry Pests**. Arlinton, Virginia: FDA Technical Bulletin n. 4, Association of Official Analytical Chemists. 1991. p. 5-11.
- PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins en foods and feeds - an updated review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.
- PITT, J.I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2<sup>nd</sup> ed. Sydney, Australia: CSIRO - Division of Food Processing, 1988. 186p.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.



- RAMOS, C. M.; MARTÍNEZ, S. E. V.; OLIVARES, R. A. C. Gliotoxin production in 10 strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical cases. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, v. 40, n. 2, p. 139-148, 2002.
- RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIERI, L. R.; FRAGA, M. E.; GATTI, M. J. de A.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M., ROSA, C.A.R. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. **Letters in Applied Microbiology**. Holanda, v. 113, n. 1-2, p. 89-96, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3479–3484, 2006.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, p.2420-2425, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.02.004, v. 6, 2008.
- RINALDI, M.G. Invasive aspergillosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1061-1077, 1983.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de Nefropatia Micotóxica Suína causada pela ingestão de cevada contaminada por citrinina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.3, n.7, p. 87-90, 1985.
- ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Seropédica, Rio de Janeiro: UFRRJ- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002, 147p. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias.

- ROSA, CAR; RIBEIRO, JMM; FRAGA, ME; GATTI, M; CAVAGLIERI, LR; MAGNOLI, CE; DALCERO, AM; LOPES, CWG. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89–96, 2006.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.
- SAMSON, R. A. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its telemorphs. In: BENNETT, J.W; KLICH, M.A.. (Eds.). ***Aspergillus: the biology and industrial applications***. Bulteworth, Heineman, Stoneman, London, 1995, p. 353-388.
- SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. 2000. 388 p.
- SCUDAMORE, K. A., NAWAS, S., HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addition Contaminate**, v.15, p. 30-55, 1998.
- SIDHU, G.S. Mycotoxin genetics and genes clusters. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 705-711, 2002.
- SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some Brazilian Foods by using Multi-toxin Thin-Layer Chromatographic Method. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
- STANZANI, M.; ORCIUOLO, E.; LEWIS, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARTINS, S. L. R.; JOHN, L. S. ST.; KOMANDURI, K. V. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. **Blood**, v. 105, n. 6, p. 2258-2265, 2005.

- STOLOFF, L. Aflatoxin: a overview. In: RODRICKS, J.V.C.; HESSELTINE, W.; MEHLMAN, M.A. (Ed.) **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Patholox Publishers. 1977. cap. 1, p. 7-28.
- SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 18, p. 2649-2659, 2006.
- TÉREN J., VARGA J., HAMARI Z., RINYU E., KEVEI F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v.134, p.171-176, 1996.
- TRUCKSESS, M.W. Mycotoxins. **Journal of AOAC Internacional**, v. 89, n. 1, p. 270–284, 2006.
- TURNER, W. B. **Fungal metabolites**. London: Academic Press, 632p. 1978.
- TURNER, W. B.; ALDERIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. London: Academic Press, 632p. 1983.
- VAN EGMOND, H.P. Chapter 6 – Mycotoxins? Detection, reference material and regulation In: In:Introduction to Food-borne Fungi. R.A.Samson, E. S. Hoesktra, J.C. Frisvad & O. Filtenborg (Eds) 6<sup>th</sup> Edition, **Centraalbureau Voor Schimmelcultures**, Baarn, 2000, p.332-338.
- VAN EGMOND, H.P. Methods for determining ochratoxin A. and other nephrotoxic mycotoxins. In: mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. **IARC Scientific Publications**, Ryon, France v.115, p. 57-70, 1991.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WHITLOW, L. W.; HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**. São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p. 151-181.

YAMADA, A.; KATAOKA, T.; NAGAI, K. The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. **Immunology Letters**, v. 71, n. 1, p. 27-32, 2000.

## **CAPÍTULO III**

### **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO.**

## 1- INTRODUÇÃO

A espécie *Aspegillus fumigatus* tem uma grande importância uma vez que está relacionada a surtos de Aspergilose com altos índices de mortalidade, ocorrendo principalmente entre indivíduos imunodeprimidos. Sendo então o fator mais determinante para que o *A. fumigatus* seja causador de doença é o estado imune do hospedeiro. Além disso, esse patógeno pode produzir metabólitos secundários e enzimas que favorecem o desenvolvimento de processos infecciosos secundários.

A gliotoxina é a micotoxina de ação biológica mais marcante produzida pelo *A. fumigatus*, sua estrutura química apresenta uma ponte dissulfeto em um anel de piperazina essencial para sua toxicidade. Essa micotoxina está relacionada à episódios de imunossupressão do indivíduo alvo e normalmente correlaciona-se sua presença em infecções (Aspergilose Invasiva). Sabe-se que mais de 95% de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* foram capazes de produzir esta micotoxina e a mesma tendo ação biológica. Devido à importância da gliotoxina, tanto para a saúde humana e animal, métodos para a detecção e quantificação dessa toxina têm sido desenvolvidos, e a metodologia de eleição é Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Esse gênero é encontrado no solo, vegetação e mesmo nos alimentos. *A. fumigatus* é recorrente em material fermentado de origem vegetal e surtos de doenças em animais normalmente são oriundos dessa fonte (HIRSH e ZEE, 2003). São fungos que apresentam hifas septadas, conidióforos que são ramificações de hifas oriundas de uma borda celular presente no micélio vegetativo e terminando em uma vesícula expandida. Essa é coberta por uma ou várias camadas de fiálides, de onde emergem cadeias de conídeos pigmentados que são as unidades reprodutivas assexuadas que dão coloração a colônia fúngica. Quando em tecidos só é possível visualização do micélio, no entanto em cavidades que tem contato com o ar como vias respiratórias, podem aparecer conídeos (HIRSH; ZEE, 2003).

Com isso o estudo da ecofisiologia desta espécie, bem como determinar os principais fatores que influenciam no desenvolvimento das cepas e produção de micotoxinas, são de grande importância para a comunidade científica, a fim de criar modelos preditivos eficientes.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Detecção e quantificação de gliotoxina em relação à ocorrência de *A. fumigatus*

Para gliotoxina será utilizada a metodologia de extração e detecção proposta por Boudra; Morgavi (2005), junto com a determinação da frequência de cepas de *A. fumigatus*. As amostras foram secadas em estufa com circulação forçada de ar a 48°C por 72hs. Adicionamos 10 mL de água destilada em frascos contendo 10 gramas de amostra, juntamente também adicionamos 40 mL de diclorometano (DCM). Solvente e amostra ficaram em contato por duas horas em temperatura controlada e agitação mecânica por quinze minutos. Filtrado em papel filtro (Whatman, Inc., Clifton, New Jersey, USA). Três mL do extrato filtrado foi evaporado em rotaevaporador e resuspenso em 50 uL metanol:água (1:1, v/v) e seguimos com a análise para gliotoxina em CLAE. A separação de Gliotoxina ocorrerá em uma coluna Nucleosil C18 de fase reversa (150 mm×4.6 mm, 5 µm) junto com uma pré-coluna Nucleosil C18, usando um sistema de gradiente de solventes. (solvente A= 10 mL L<sup>-1</sup> de ácido acético e solvente B= acetonitrila). O programa de solventes seguirá a seguinte ordem: porcentagem inicial do solvente B será de 10%, seguindo será de 50% em 30 minutos e então 90% por 4 minutos, baixando em seqüência para 10% em 2 minutos num fluxo de 2 mL min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção da gliotoxina é de 14 minutos e a detecção é feita em 254 nM.

### 2.2- Estudos da influência de fatores físicos sobre o crescimento fúngico e produção de gliotoxina pelas cepas isoladas de *A. fumigatus* em milho e sorgo ensilados.

As condições ambientais de temperatura, tipo de substrato, atividade aquosa (Aw), pH e intensidade de luz são as que mais interferem nas cepas de *A. fumigatus*, influenciando no seu desenvolvimento e produção de toxinas, utilizando como base os experimentos propostos por Belkacemi et al. (1999) e Kosalec et al. (2005).

### **2.3- Influência das condições físicas de cultivo para variação da microbiota e na produção de gliotoxina por cepas de *Aspergillus fumigatus*.**

Foram testadas estas condições in-vitro onde para tal utilizou-se as metodologias para avaliação de perfil toxigênico da espécie proposta por Santos et al. (2002) e a metodologia onde utiliza-se o CYA e CAM, proposta por Lin; Dianese (1976), nestas condições foram variadas as condições de Temperatura, pH, Aw e Luminosidade. Para teste em silos experimentais, priorizou-se duas condições com a adição de camadas de sal e areia aos ensilados de milho e sorgo com duas espessuras 5 e 10 cm de altura, os silos foram preparados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em tubos de PVC devidamente vedados, permitindo a condição adequada para o processo de fermentação e após 90 dias avaliados em relação aos mesmos parâmetros dos silos coletados no campo (TEXEIRA, 2009).

### **2.4- Análises Estatísticas**

A análise estatística dos dados foi feita por uma observação da variância através da transformação dos dados em bases logarítmicas. Todos os dados foram transformados usando a função logarítmica  $\log_{10}(x + 1)$  antes da ANOVA. Serão comparadas as médias das contagens totais de propágulos fúngicos nos meios de isolamento geral e substratos de milho e sorgo avaliados. Serão comparados os níveis de micotoxinas nos substratos de milho e sorgo ensilados, nos diferentes níveis de coleta do silo e comparados também o material pré e pós fermentado (STEEL; TORRIE, 1985; AGRETI, 1990; PEREYRA, 2008). O teste de Duncan foi utilizado na comparação dos dados de enumeração fúngica nos diferentes meios de cultivo, e o teste LSD de Fisher foi o escolhido para a comparação dos dados de quantificação das micotoxinas e avaliações físicas. As análises foram conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (*SAS Institute, Cary, NC*).



### 3- RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.1- Estudos da influência de fatores físicos sobre o crescimento fúngico e produção de gliotoxina pelas cepas isoladas de *A. fumigatus* em milho e sorgo ensilados.

Quando avaliadas de forma individual, as cepas de *A. fumigatus*, independentemente da origem não apresentaram nenhuma diferença significativa na velocidade de crescimento do miscelio fungico, porém apresentavam diferenças nos níveis de produção de gliotoxina, que foram estabelecidos como índices de controle. Estes índices foram obtidos em meio CYA, com atividade aquosa (*Aw*) em 0,80, temperatura (*T*) 25° C, pH 7 e cultivo com presença de luz, durante o período de 9 dias (Figura 12), para cepas isoladas de diferentes origens (SANTOS et al., 2006).

A análise de forma simples de cada efeito estudado: Temperatura (*T*), *Aw*, pH e intensidade de luz demonstraram exercer influências na velocidade de crescimento, bem como na produção de gliotoxina (GLIO). Todas as cepas a partir do sexto dia de cultivo preencheram na totalidade o diâmetro da placa (90 mm), na superfície do meio de cultivo.

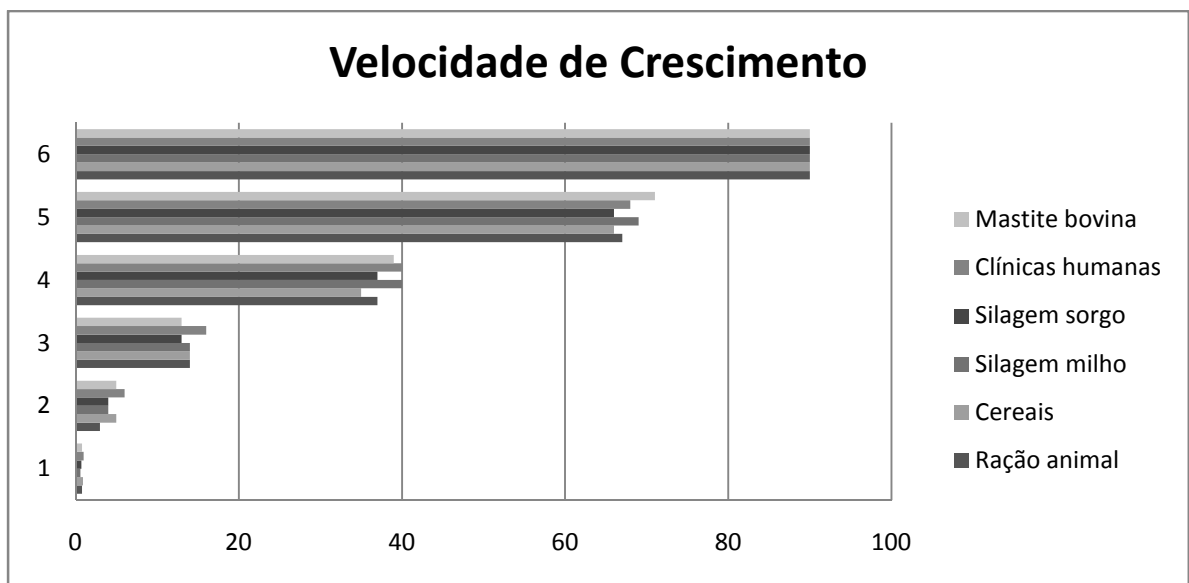
A análise de variância dos efeitos simples *T*, *Aw* e pH, bem como de duas e de três interações, sobre a produção de GLIO, mostraram que a maioria dos fatores e as suas interações, foram estatisticamente significativas ( $p \leq 0,001$ ). Testes de Fischer (LSD) realizados para determinar a importância de cada parâmetro no crescimento individual, na fase de latência, taxa de crescimento e produção de gliotoxina de *A. fumigatus* demonstraram que a *T*, *Aw* e pH tiveram maior influência estatisticamente durante variação da fase de latência, na taxa de crescimento das cepas ( $p \leq 0,005$ ) e principalmente nos níveis de produção de GLIO.

Os parametro onde foram obtidos os melhores índices quando avaliamos velocidade de crescimento e produção de GLIO, foram: Temperatura de 37° C e *Aw* 0,80. As melhores velocidades de crescimento e menor fase de latência, não importando o nível de pH do meio de cultivo, foram encontradas sobre estas condições. Em geral, o efeito inverso comprovava este efeito estimulador, pois observa-se um aumento da fase de latência e diminuição da velocidade de crescimento da cepa, quando a *T* e *Aw* eram diminuídas.

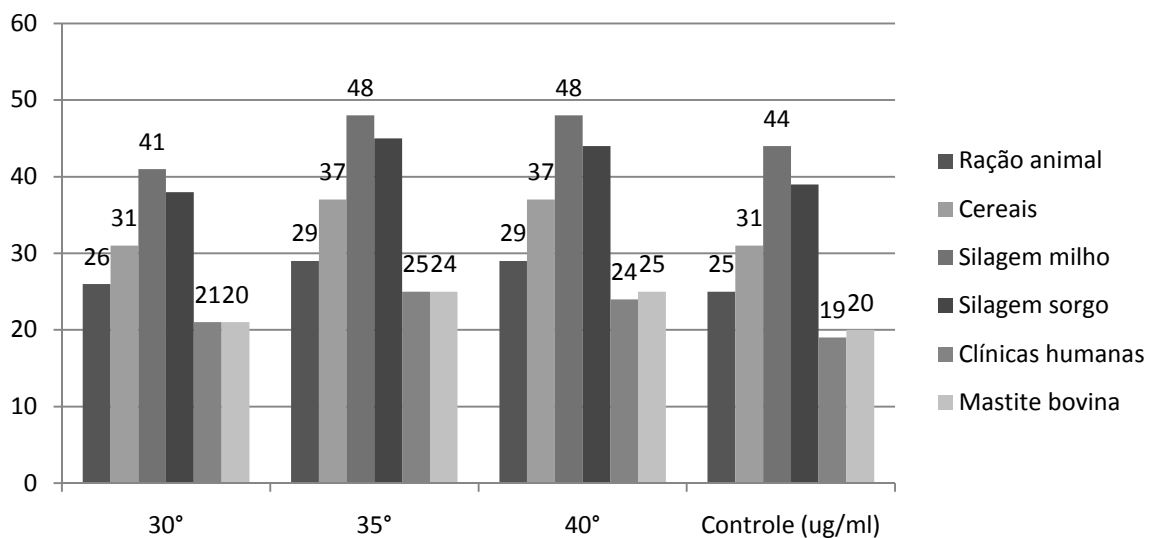
Assim as condições ótimas, estabelecidas no estudo, para o crescimento e produção de GLIO in-vitro, em cepas de *A. fumigatus* foram: de um intervalo de temperatura entre 35°-

40° C, uma Aw 0,80, sem luminosidade presente e pH 6,0. Demonstrando serem condições bastante plausíveis de serem encontradas nos ambientes onde esta espécie fúngica tem ocorrência, pois nestas condições encontramos os maiores índices de produção de GLIO, bem como as maiores velocidades de crescimento das cepas. Demonstrando assim a preocupação e a condição que o microorganismo ainda tem de desenvolver seus metabolitos secundários e assim podendo gerar problemas as populações que virão a ter contato com este material.

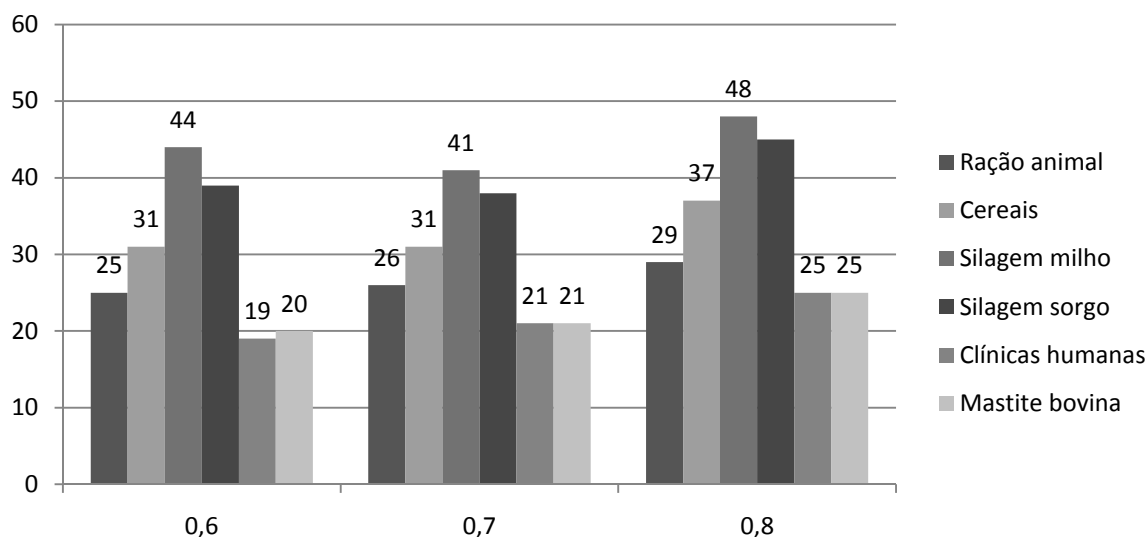
**FIGURA 17:** Gráfico de controle das velocidades de crescimento em milímetros, das cepas de *Aspergillus Fumigatus*.



**FIGURA 18:** Gráfico de Temperatura e níveis de produção de Gliotoxina em ppm das cepas de *Aspergillus Fumigatus*.



**FIGURA 19:** Gráfico de Atividade Aquosa e níveis de produção de Gliotoxina em ppm das cepas de *Aspergillus Fumigatus*.



### 3.2. – Influência das condições físicas de cultivo para variação da microbiota e na produção de gliotoxina por cepas de *Aspergillus fumigatus*.

Condições de ensilagem in-vitro foram testadas onde para tal utilizou-se silos experimentais, segundo Teixeira, 2009. Priorizaram-se duas condições: Ensilagem normal, com a adição de camadas de sal e areia aos ensilados de milho e sorgo. Os silos foram preparados em tubos de PVC, desinfetados e esterelizados, bem como o sal e areia utilizados. Sendo então o material compactado manualmente e após 90 dias avaliados em relação aos mesmos parâmetros dos silos coletados no campo. Os dados podem ser acompanhados nas Tabelas 31 e 32 (abaixo). Após avaliação dos dados não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros avaliados, nível de significancia  $p \leq 0,001$ . A diferença das condições encontradas a campo, em silagens produzidas em laboratório e menor escala, sendo estas preparadas com maiores cuidados no grau de compactação, cuidados com os recipientes onde ocorrerá o processo fermentativo, obtivemos níveis de  $ufg.g^{-1}$  dentro de níveis desejados. Demonstrando que os cuidados durante o processo produtivo deste alimento determinam de maneira categórica o seu grau de inocuidade.

**TABELA 31:** Contagem fúngica em ufc.g<sup>-1</sup> dos silos de milho em PVC.

Tipo de Alimento	Milho
	média ± desvio padrão
Silo Controle	$6,5 \times 10^3 \pm 4,0 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Silagem de Milho + Camada de Sal	$4,3 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Silagem de Milho + Camada de Areia	$5,3 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$ <sup>a</sup>

<sup>a</sup> médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,001$ ).

**TABELA 32:** Contagem fúngica em ufc.g<sup>-1</sup> dos silos de Sorgo em PVC.

Tipo de Alimento	Sorgo
	média ± desvio padrão
Silo Controle	$2,8 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Silagem de Sorgo + Camada de Sal	$3,3 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Silagem de Sorgo + Camada de Areia	$5,2 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$ <sup>a</sup>

<sup>a</sup> médias com mesma letra nas colunas são equivalentes, de acordo com o teste de LSD de Fisher ( $P \leq 0,001$ ).

Detalhes quanto aos fatores que influenciam a produção de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus* ainda são desconhecidos, no entanto se sabe que fatores externos, como alto suprimento de oxigênio, temperatura, pH, bem como outros fatores físicos e químicos pode determinar maiores níveis de produção (WATANABE et al., 2004). A avaliação dos dados destes estudos estará permitindo uma visão mais ampla das condições as quais os silos estão expostos no ambiente e a influência que estes fatores terão na ecofisiologia, especificamente do *A. fumigatus*. Do que podem ser avaliadas neste estudo as condições ideais de crescimento ótimo das cepas, conhecidas com as condições encontradas nos silos, muitas vezes otimizando a produção de micotoxinas. Belkacemi et al. (1999) e Kosalec; Pepeljnjak (2005) em estudos sobre a produção de gliotoxina, analisaram o efeito da composição do meio de cultivo, como: fonte e concentração de carboidrato, e a temperatura de incubação, determinado uma correlação positiva onde o aumento da temperatura de incubação, favorecem a cinética de uso de alguns carboidratos menos solúveis. Holl; Denning (1994) e Willger et al. (2008) estudaram efeitos de baixas pressões de oxigênio sobre o crescimento de cepas de *Aspergillus* spp. inclusive de *A. fumigatus*, e constataram que essas cepas são capazes de crescer em baixas tensões parciais de oxigênio (mínimo 0,1%), o que pode ter implicações tanto na patogenicidade quanto na atividade antifúngica (HOLL; DENNING,

1994). Importante resaltar que em vários estudos os dados conhecem e confirmam que mesmo nas condições do micromeio pobre em oxigênio que ocorrem nos silos ainda temos atividade biológica presente. Em ensaio experimental sobre a produção de gliotoxina, realizado com nove cepas de *A. fumigatus* de origem clínica em dois meios de cultivo líquidos, caldo extrato de levedura sacarose (YES) e caldo Czapek-Dox, a 25 e 37°C, a maior produção da toxina foi obtida em caldo YES, incubado a 37°C, e altas concentrações da toxina foram obtidas depois de 3 dias da inoculação (KOSALEC et al., 2005). Enquanto, Belkacemi et al. (1999) observaram que as melhores condições para a produção dessa toxina eram em caldo Czapek-Dox suplementado com 30% de glicose, icubado a 37°C, e a maior concentração de gliotoxina foi obtida 29 horas depois da incubação, durante a fase exponencial de crescimento.

Devido à importância da gliotxina tanto para a saúde humana quanto animal, métodos para a detecção e quantificação dessa toxina têm sido desenvolvidos na análise de amostras de diversas origens, e recentemente em alimentos destinados a animais domésticos (PENA et al., 2010, PEREYRA et al., 2008). As metodologias usadas são baseadas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (SANTOS et al., 2003; BOUDRA; MORGAVI, 2005; KOSALEC, 2005; LEWIS et al., 2005; PEREYRA et al., 2008) ou uma combinação de técnicas que incluem TLC, CLAE e Espectrometria de Massa (MS) ou Ressonância Magnética nuclear (RMN) (BAUER et al., 1989; BELKACEMI et al., 1999; RAMOS et al., 2002; NIEMINEN et al., 2002). Procedimentos baseados em CCD permitem a investigação rápida de cultivos fúngicos, bem como uma triagem rápida em estudos como o realizado, onde se trabalham com muitas amostras de forma simultanea, porém carecem de seletividade e sensibilidade quando comparadas com os métodos baseados em CLAE. A CLAE acoplada a espectrometria de massas (CLAE MS/MS) tem sido usada para determinações quantitativas de micotoxinas e muitas delas se baseiam em métodos que permitem a determinação simultânea de várias micotoxinas (multitoxina) presentes em uma amostra (SULYOK et al., 2006), essa tecnologia analítica permite a obtenção de resultados precisos e confiáveis.

#### 4- CONCLUSÕES

As condições estabelecidas como ótimas para as cepas de *A. fumigatus* (in-vitro) demonstraram um risco potencial, pois são semelhantes às que os silos são armazenados no ambiente.

As condições supostamente adversas, ainda sim permitem os microorganismos se desenvolver, produzir metabolitos secundários e assim podendo gerar problemas as populações que virão a ter contato com este material.

A análise de forma simples de cada efeito estudado: Temperatura (T), Aw, pH e intensidade de luz demonstraram exercer influências direta na velocidade de crescimento, bem como na produção de gliotoxina (GLIO).

Das condições de ensilagem in-vitro testadas, pode ser observado que os cuidados durante o processo produtivo deste alimento determinam de maneira categórica o seu grau de inocuidade do produto final.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Archives of Microbiology*, v. 192, n. , p.409–425, 2010.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023 - Informação e documentação - Referências - Elaboração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24 p.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10522 - Informação e documentação - Citações em documentos - Apresentação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 7 p.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Editado por HELRICH, K., Secciones: 935.76, 936.20, Washington, DC, EUA: AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Editado por HELRICH, K. Secciones: 975.35, 976.22, Washington, DC, EUA: AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- ALMEIDA, J.C.C. **Avaliação das características agrônomicas e das silagens de milho e de sorgo cultivados em quatro densidades de semeadura**. Jaboticabal, São Paulo: UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2000. Tese de Doutorado em Zootecnia 82 p.
- AMIGOT, S.L.; FULGUEIRA, C.L.; BOTTAIB, H.; BASÍLICO, J.C. New parameters to evaluate forage quality. **Postharvest Biology and Technology**. v. 41, n. 1.2, p. 215-224, 2006.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC Nº 274 - Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim, no milho**. 2002. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm)>. Acesso em: 13 mar 2008.

- ASPLIN, F.D.; CARNAGHAN, R.B.A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their affect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1215-1219, 1961.
- BENNETT, J; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BHATNAGAR, D.; TAKAHASHI, T.; CHANG, P.K.; MATUSIHIMA, K.; YU, J.; ABE, K.; CLEVELAND, T.E.; KOYAMA, Y. Mycotoxins: Current issues in U.S.A. **Meeting the Mycotoxin Menace Book**, 2003.
- BIEHL, M.L.; BUCK, W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.
- BLOUNT, W.P. Turkey “x” Disease. **Turkey**, v.9, p.55-58, 1961.
- BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.113-131, 2005.
- CAMPOS, S.G. de; CAVAGLIERI, L.R.; KELLER, L.A.M. ; JURI, M.G.F. ; DALCERO, A. M.; MAGNOLI, C.; ROSA, C.A.R. Mycoflora and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 377-383, 2008.
- CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Micotoxins: risks in plant, animal and humans systems**. Iowa, USA: Task Force Report nº 139, 2003. 199 p.
- CEPETEC / INPE - CENTRO DE PREVISÃO DO TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS / INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Boletins Climatológicos**. n. 350 - 355. Disponível em: < [http://www.agritempo.gov.br/boletins/boletim\\_RSE.html](http://www.agritempo.gov.br/boletins/boletim_RSE.html)>. Acesso em: 20 dez 2007 e 27 jun 2008.



- COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York: Academic Press, 1981.
- CRUZ, L. C.H.; ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G. **Aflatoxicose aguda em suínos no Estado do Rio de Janeiro**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, v. 7, n. 5, p. 127-128, 1985.
- CRUZ, L.C.H.; CAMPOS, S.G.; ROSA, C.A.R. **Aplicação do Ágar-Coco como Meio Diferencial para o isolamento de Fungos Citrinogênicos**. Itaguaí, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v.15 n.1, p. 39-60, 1992.
- CRUZ, L.C.H. Micotoxinas são tão importantes. In: Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana, RJ. **Anais do Encontro de Micotoxinas: Perspectiva Latinoamericana**. Itaguaí, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. p. 1-12.
- CRUZ, L.C.H. **Citrinina – uma micotoxina produzida por *Penicillium citrinum* Thom: aspectos microbiológicos, bioquímicos e toxicológicos**. Seropédica, RJ: UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 267p.. Tese de Doutorado em Sanidade Animal
- DALCERO, A.M.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO, M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 137, n. 3, p. 179-184, 1997.
- DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M.M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.
- DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 781-803, 1998.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. Piracicaba, SP. **Anais do XI Encontro Nacional de Micotoxinas**, SP: Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. p. 32-35.

D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.

DOKO, M. B.; BROWN, N.; SYDENHAM, E. W. MPUCHANE, S.; SIAME, B. A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n.10, p. 3240-3243, 1996.

ELLING, F. ; MOLLER, T. Mycotoxic nephropaty in pigs. Bull. **Wld. Hlth. Org.**, v. 49, p. 411-418.1973.

EMBRAPA – Embrapa Gado de Leite. **Sistema de Produção 4. Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>> Acesso em 05 mai. 2011.

EMBRAPA – Embrapa Gado de Leite. **Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>> Acesso em 11 jul. 2011.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZACION. Pan-European Conference on Food Safety and Quality 2003. **Compendium FAO Veterinary Public Health and Food and Feed Safety Programme: the Safety of Animal Products from Farm to Fork**. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/livestock/AGAP/FRG/FEEDSAFETY/feedsafety.htm>>. Acesso em: 27 Jun 2008.

- FRAGA, M.E.; CURVELLO, F.A.; GATTI, M.J.; CAVAGLIERI, L.R.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.
- FRIIS, P.; HASSELAGER, E.; KROGH, P. Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* Westling and their nephrotoxicity in rats and pigs. **Acta Path. Microbiol. Scand**, v. 77-B, p. 559-560, 1969.
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. CHELKOWSKI, J. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 441-476.
- GARDINER, D. M.; HOWLETT, B. J. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. , p. 241-248, 2005.
- GEISEN, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.19, p.388-392, 1996.
- GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, F.; JIMENEZ, M.; MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 196–203, 2008.
- GMP – GOOD MANUFACTURE PRATICE. Certification Scheme Animal Feed Sector. **Appendix 1: Product standards (including residue standards)**. The Hague, the Netherlands: Productschap Diervoeder, 2006. p. 1-39.
- GONZÁLEZ PEREYRA, M.L.; ALONSO, V.A.; SAGER, R.; MORLACO, M.B.; MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre and

- postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1034–1041, 2007.
- GOURAMA, N.; BULLERMAN, L. B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v.58, n.12, p.1395-1404, 1995.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**. v.95, p.641-655, 1991.
- HENNIGEN, M. R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v.12, n.5, p.677-681, 1995.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, 2nd ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 445p.
- HOCKING, A.D.; PITT, J. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied. Environment. Microbiology**, v.39, p.488-492, 1980.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-521, 1993. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. São Paulo: IBGE, v. 31, p.1-31, 2006.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. São Paulo: IBGE, v. 29, p.1-33, 2010.

- KEEHN, D.M.; FRANK-STROMBORG, M. A worldwide perspective on the epidemiology and primary prevention of liver cancer. **Cancer Nurs**, v. 14, n. 4, p. 163-174, 1991.
- KELLER, L. A. M. **Avaliação micológica e micotoxicológica de silagens destinadas à alimentação de bovinos de fazendas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – Rio de Janeiro. 2009.
- KELLER, K.M.; KELLER, L.A.; M OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X., GARCIA, R.S., ROSA, C.A.R. Avaliação micotoxicológica em produtos destinados à alimentação de caprinos leiteiros em Teresópolis, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v.30, n. 2, p.91-96, 2008.
- KELLER, K.M.; QUEIROZ, B.D.; KELLER, L.A.M.; RIBEIRO, J.M.M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The mycobiota and toxicity of equine feeds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, 2007.
- KHOUFACHE, K; PEUL, O; LOISEAU, N; DELAFORGE, M.; RIVOLLET, D.; COSTE, A.; CORDONNIER, C.; ESCUDIER, E.; BOTTEREL, F.; BRETAGNE, S. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysical properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology*, v. 7, Art. 5, 2007.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I., **Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. Sydney, Austrália: Academic Press, 1988. 116p.
- KLICH, M.A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 122 p.
- KUPFAHL, C.; HEINEKAMP, T.; GEGINAT, G.; RUPPERT, T.; HARTL, A.; HOF, H.; BRAKHAGE, A. A. Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of

gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 292-302, 2006.

- KWON-CHUNG, K. J.; SURGUI, J. A. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? **Medical Mycology**, v. 47, suplemento 1, p. S97-103, 2009.
- LILLEHOJ, E.B. Aflatoxins: an ecologically elicited genetic activation signal. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (Eds.). **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Ratón: CRC Press, 1991. p. 1-35.
- LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A coconut – Agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, n.12, p. 1466-1469, 1976.
- LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 597–609, 2002.
- MADHYASTHA, S.M., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., PLATFORD, G., ABRAMSON, D. Effects of different cereals and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *A. alutaceus* and *P. verrucosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1506-1510, 1990.
- MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, p. 27-32, 1998.
- MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; PALACIOS, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A. The mycobiota and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 7-22, 2002.
- MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.M.; PALACIOS, G.; DALCERO, A. Surveillance of Toxigenic Fungi and Ochratoxin A in

- Feedstuffs from Córdoba Province, Argentina. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 5, p. 431-445, 2005.
- MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochatoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 249-260, 2007.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria nº 07** de 09 nov 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, p. 21968, 1988.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções de Agronegócio Mundial e Brasil 2006/2007 a 2017/2018**. AGE - Agência de Acessória Estratégica. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2909DCC5111A4D7BE040A8C0750251C9>>. Acesso em: 21 out 2008.
- MILLER, J.D. Global Significance of Mycotoxins and Phycotoxins. In: **Proceedings of IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. Rome, 1996. 31p.
- MORGAVI, D.P.; RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with Fusarium toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 201–212, 2007.
- MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 23-51.
- MORTIMER, D.N.; GILBERT, J., SHEPHERD, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxins M<sub>1</sub> in liquid and powdered milk using affinity column cleanup. **Journal of Chromatography**, v. 407, p. 393-398, 1987.
- MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 27, p. 62S-72S, 1998.

- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence?. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- NIEMINEN, S. M.; MÄKI-PAAKKANEN, J.; HIRVONEN, M. R.; ROPONEN, M.; WRIGHT, A. von. Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in a battery of short-term test systems **Mutation Research**, v. 520, n. 1-2, p. 161–170, 2002.
- NEUMANN, M.; RESTLE, J.; BRONDANI, I. L. Avaliação de silagens de sorgo (*sorghum bicolor*, L. Moench) ou milho (*zea mays*, L.) Na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.3, p.438-452, 2004.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. (Eds.). **Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification**. USA: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- OLIVEIRA, G.R.; RIBEIRO, J.M.; FRAGA, M.E.; CAVAGLIERI, L.R.; DIREITO, G.M.; KELLER, K.M.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 355-362, 2006.
- OHYAMA, Y.; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.26, p.1137-1147, 1975.
- OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Criterios de Salud Ambiental, 11: Micotoxinas**. Washington: OPS. 1983. (OPS. Publicación Científica, 453).
- OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.



- PASTER, N., BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, p.257-265, 1988.
- PARKER GF, JENNER PC. Distribution of tryptacidin in cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology*; v. 16, n. 8, p. 1251-1252, 1968.
- PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; RIBEIRO, J.M.M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciências e agrotecnologia de Lavras**, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
- PEREYRA, M.L.G.; Alonso, V.; MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L.R. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 1034-1041, 2008.
- PIMENTEL, D. World resources and food losses to pests. In: GORHAM, J.R. (Ed.). **Ecology and Management of Food Industry Pests**. Arlinton, Virginia: FDA Technical Bulletin n. 4, Association of Official Analytical Chemists. 1991. p. 5-11.
- PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins en foods and feeds - an updated review. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.
- PITT, J.I. **A Laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2<sup>nd</sup> ed. Sydney, Australia: CSIRO - Division of Food Processing, 1988. 186p.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

- RAMOS, C. M.; MARTÍNEZ, S. E. V.; OLIVARES, R. A. C. Gliotoxin production in 10 strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical cases. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, v. 40, n. 2, p. 139-148, 2002.
- RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIERI, L. R.; FRAGA, M. E.; GATTI, M. J. de A.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M., ROSA, C.A.R. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. **Letters in Applied Microbiology**. Holanda, v. 113, n. 1-2, p. 89-96, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3479–3484, 2006.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, p.2420-2425, 2007.
- RICHARD, E; HEUTTE, N.; BOUCHART, V., GARON, D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.02.004, v. 6, 2008.
- RINALDI, M.G. Invasive aspergillosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1061-1077, 1983.
- ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de Nefropatia Micotóxica Suína causada pela ingestão de cevada contaminada por citrinina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.3, n.7, p. 87-90, 1985.
- ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Seropédica, Rio de Janeiro: UFRRJ- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002, 147p. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias.

- ROSA, CAR; RIBEIRO, JMM; FRAGA, ME; GATTI, M; CAVAGLIERI, LR; MAGNOLI, CE; DALCERO, AM; LOPES, CWG. Mycobiota of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 89–96, 2006.
- RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.
- SAMSON, R. A. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its telemorphs. In: BENNETT, J.W; KLICH, M.A.. (Eds.). ***Aspergillus: the biology and industrial applications***. Bulteworth, Heineman, Stoneman, London, 1995, p. 353-388.
- SAMSON, R.A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to Food and Airborne Fungi**. 6 ed., Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. 2000. 388 p.
- SCUDAMORE, K. A., NAWAS, S., HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addition Contaminate**, v.15, p. 30-55, 1998.
- SIDHU, G.S. Mycotoxin genetics and genes clusters. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 705-711, 2002.
- SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some Brazilian Foods by using Multi-toxin Thin-Layer Chromatographic Method. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
- STANZANI, M.; ORCIUOLO, E.; LEWIS, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARTINS, S. L. R.; JOHN, L. S. ST.; KOMANDURI, K. V. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. **Blood**, v. 105, n. 6, p. 2258-2265, 2005.

- STOLOFF, L. Aflatoxin: a overview. In: RODRICKS, J.V.C.; HESSELTINE, W.; MEHLMAN, M.A. (Ed.) **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Patholox Publishers. 1977. cap. 1, p. 7-28.
- SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 18, p. 2649-2659, 2006.
- TÉREN J., VARGA J., HAMARI Z., RINYU E., KEVEI F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v.134, p.171-176, 1996.
- TRUCKSESS, M.W. Mycotoxins. **Journal of AOAC Internacional**, v. 89, n. 1, p. 270–284, 2006.
- TURNER, W. B. **Fungal metabolites**. London: Academic Press, 632p. 1978.
- TURNER, W. B.; ALDERIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. London: Academic Press, 632p. 1983.
- VAN EGMOND, H.P. Chapter 6 – Mycotoxins? Detection, reference material and regulation In: In:Introduction to Food-borne Fungi. R.A.Samson, E. S. Hoesktra, J.C. Frisvad & O. Filtenborg (Eds) 6<sup>th</sup> Edition, **Centraalbureau Voor Schimmelcultures**, Baarn, 2000, p.332-338.
- VAN EGMOND, H.P. Methods for determining ochratoxin A. and other nephrotoxic mycotoxins. In: mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. **IARC Scientific Publications**, Ryon, France v.115, p. 57-70, 1991.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WHITLOW, L. W.; HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**. São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p. 151-181.

YAMADA, A.; KATAOKA, T.; NAGAI, K. The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. **Immunology Letters**, v. 71, n. 1, p. 27-32, 2000.

## 1- ANEXO DE FIGURAS



**FIGURA 20:** Vista frontal do silo, após período de fermentação de  $\pm$  90 dias. Neste momento a pá mecânica retirava a quantidade de alimento fornecida aos bovinos.



**FIGURA 21:** Vista frontal do silo, após período de fermentação de  $\pm$  90 dias. Esquema dos pontos de coleta nos silos.



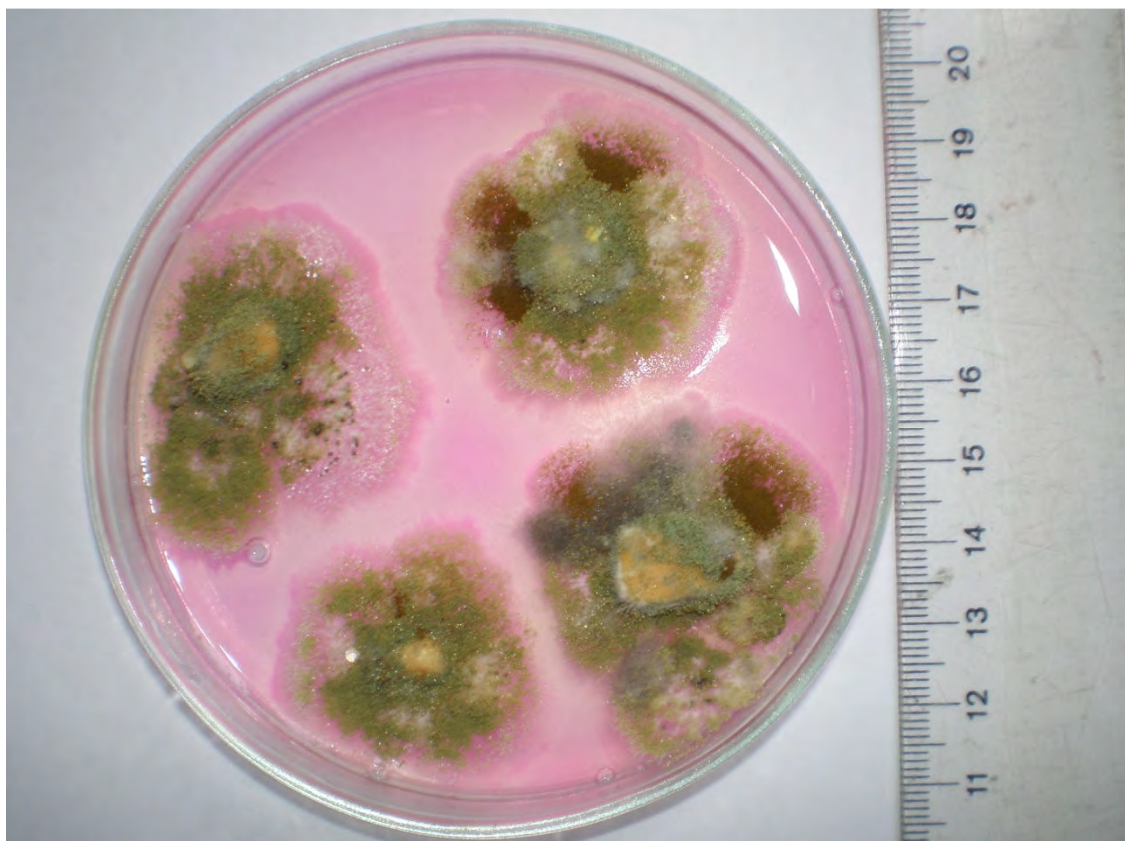
**FIGURA 22:** Localização geográfica dos pontos de coleta, no mapa brasileiro e no estado de São Paulo.



**FIGURA 23:** Condições dos silos de milho, com a utilização de lonas de alta desidade e revestimento duplo.

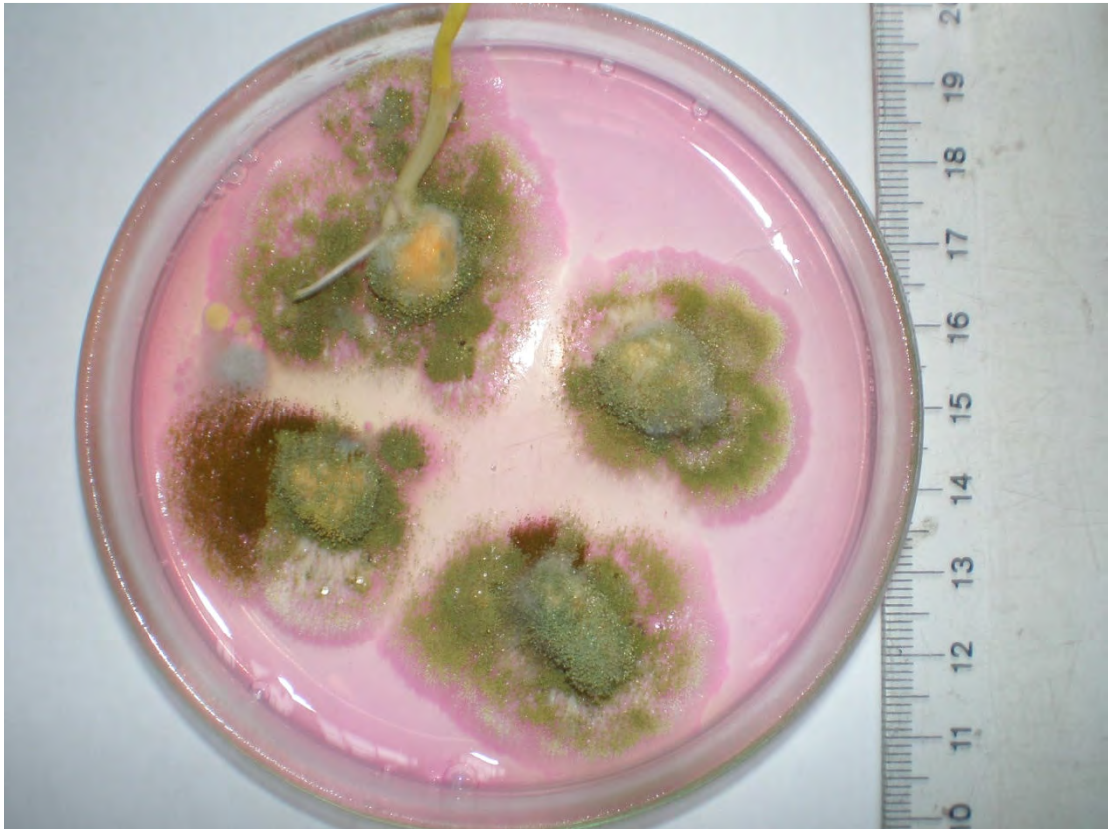


**FIGURA 24:** Avaliação das condições do milho pós-fermentado, com a utilização de lonas de alta desidade e revestimento duplo.

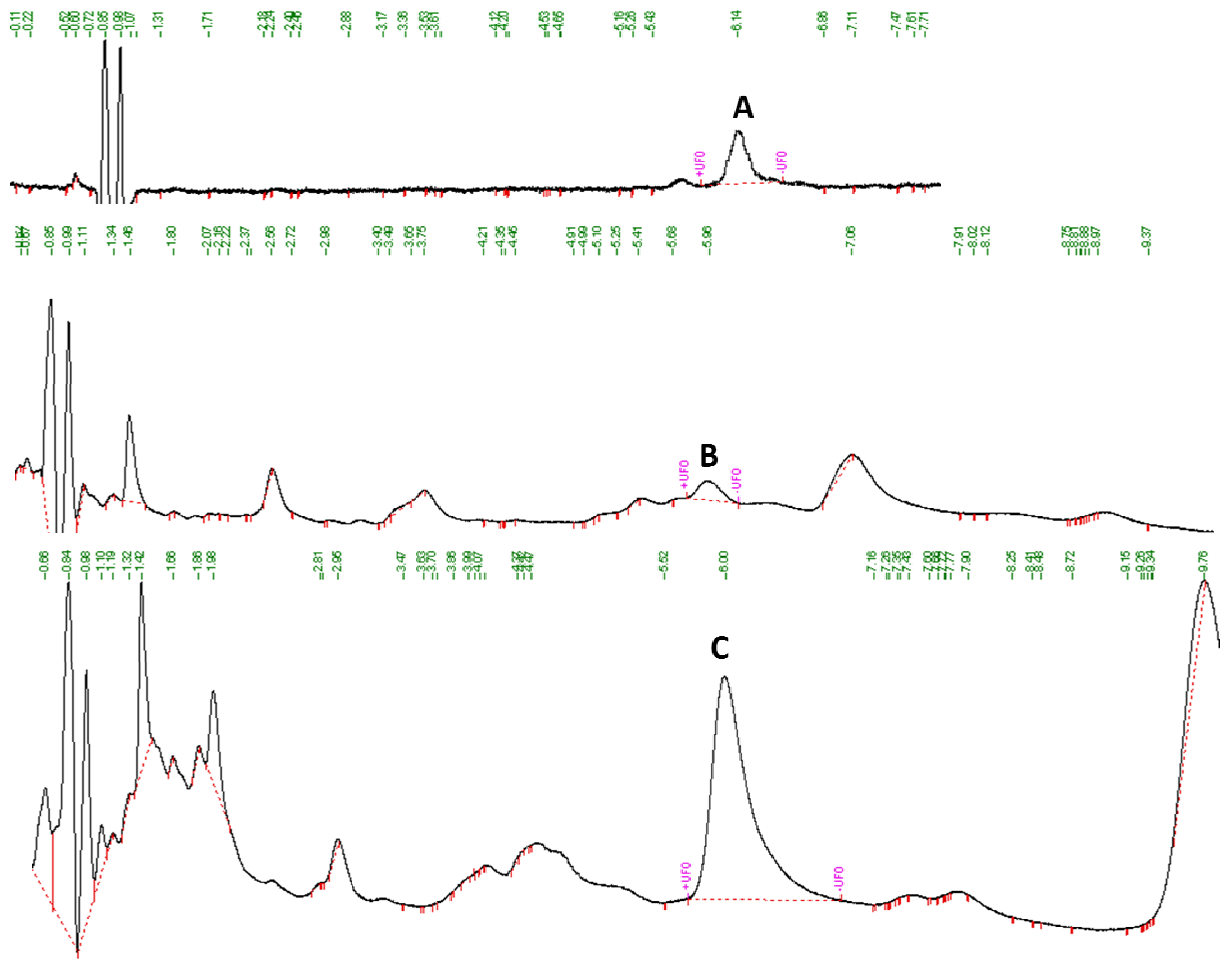


**FIGURA 25:** Avaliação das condições dos grãos de milho com a utilização de técnica de plaqueamento direto.





**FIGURA 26:** Avaliação das condições dos grãos de milho com a utilização de técnica de plaqueamento direto.

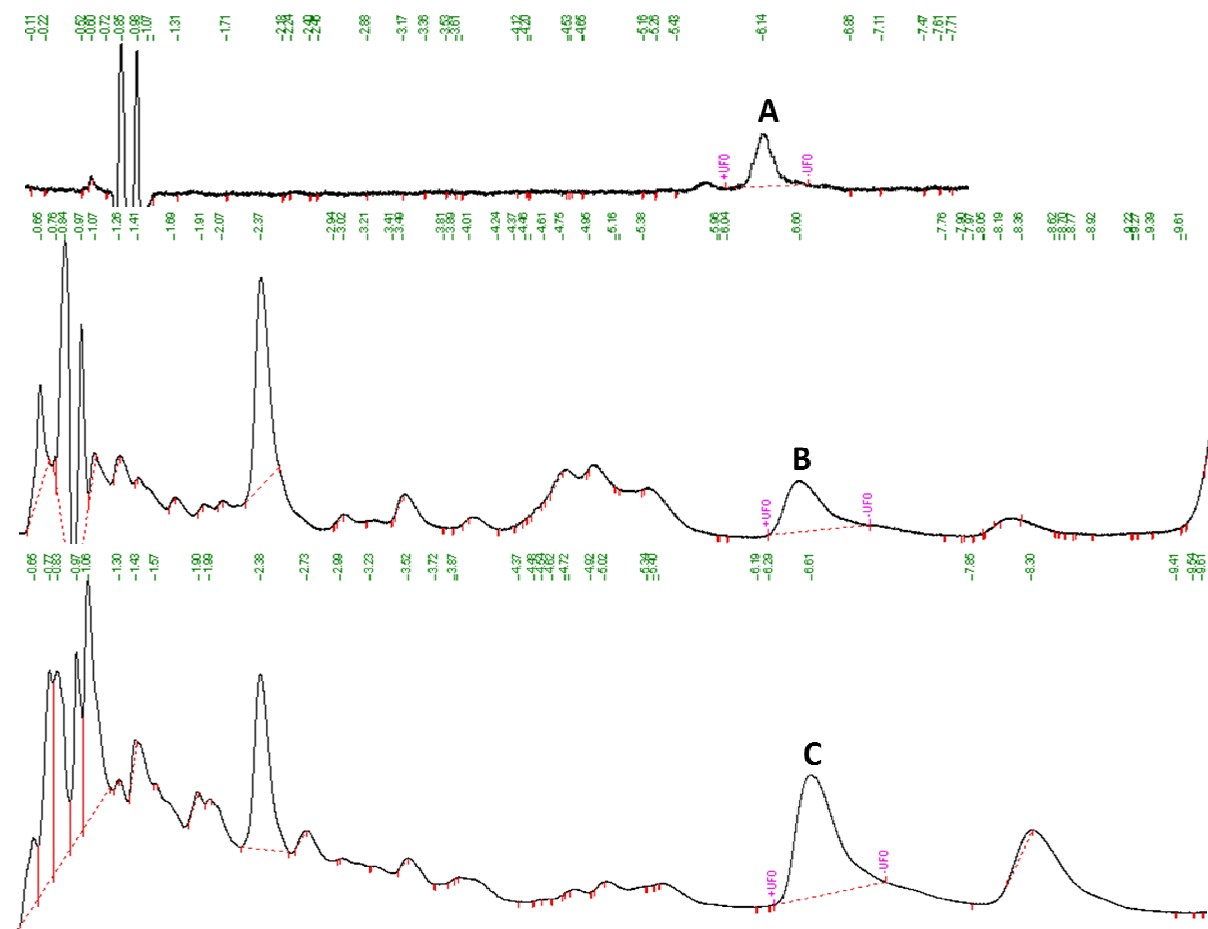


**A - Standard Gliotoxina 2 ppm; (Tempo de Retenção 6,10 min, Volume Injetado 10 uL, Area 10240).**

**B - Amostra Capacidade Toxigena 1,2 ppm (Ref. AF 166); (Tempo de Retenção 6,00 min, Volume Injetado 20 uL, Area 5780).**

**C - Coinjeção 3,2 ppm (Std 2ppm + AF 166); (Tempo de Retenção 6,00 min, Volume Injetado 20 uL, Area 16020).**

**FIGURA 27a:** Coinjeção de amostras e padrões de Gliotoxina.



**A - Standard Gliotoxina 2 ppm; (Tempo de Retenção 6,10 min, Volume Injetado 10 uL, Area 10240).  
 B - Amostra Incidência 2,4 ppm (Ref. Si 48); (Tempo de Retenção 6,00 min, Volume Injetado 20 uL, Area 12363).  
 C - Coinjeção 4,4 ppm (Std 2ppm + Si 48); (Tempo de Retenção 6,00 min, Volume Injetado 20 uL, Area 22603).**

**FIGURA 27b:** Coinjeção de amostras e padrões de Gliotoxina.

