

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Adriano Olnei Mallmann

**AMOSTRAGEM DE GRÃOS EM SILOS PARA ANÁLISE DE
MICOTOXINAS E IMPACTO MICOTOXICOLÓGICO E NUTRICIONAL
DE HÍBRIDOS DE MILHO NO CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS**

Santa Maria, RS
2018

Adriano Olnei Mallmann

**AMOSTRAGEM DE GRÃOS EM SILOS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS E
IMPACTO MICOTOXICOLÓGICO E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO
CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS
2018

Mallmann, Adriano Olnei

Amostragem de grãos em silos para análise de micotoxinas e impacto micotoxicológico e nutricional de híbridos de milho no custo da ração de frangos / Adriano Olnei Mallmann.- 2018.

77 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Mallmann

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. Milho 2. Trigo 3. Aflatoxinas 4. Fumonisinias 5. Deoxinivalenol I. Mallmann, Carlos Augusto II. Título.

Adriano Olnei Mallmann

**AMOSTRAGEM DE GRÃOS EM SILOS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS E
IMPACTO MICOTOXICOLÓGICO E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO
CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 16 de fevereiro de 2018:

Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Andréa Machado Leal Ribeiro, Dra. (UFRGS)

Gilmar Roberto Meinerz, Dr. (UFFS)

Maurício Schneider Oliveira, Dr. (Praxis Science)

Ricardo Hummes Rauber, Dr. (BRF)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pelas pessoas boas que fazem parte dela.

À Universidade Federal de Santa Maria, aos seus professores e colaboradores, pela estrutura e qualidade do ensino público e gratuito.

Ao Prof. Carlos Augusto Mallmann, meu orientador, por confiar em minha capacidade para desenvolver este trabalho, pela orientação, convívio profissional e amizade.

Ao Prof. Paulo Dilkin, pela co-orientação, convívio, conselhos, sugestões e amizade. Pelas correções, realizadas em conjunto com sua esposa Ania, meu muito obrigado.

À Cooperativa Cotrijal, representada pelos amigos Renne, Tadeu e Daniela, e à Cooperativa Cotriel, representada pelos amigos César e Odécio, pela disponibilização das instalações, equipamentos e colaboradores para a colheita das amostras de milho e trigo utilizadas neste trabalho.

À Adisseo, representada pelos amigos Cristiane, Márcio e Washington, pela disponibilização do portal online PNE, pela troca de informações e amizade.

À CAPES pela bolsa de estudos recebida em parte do doutorado.

Ao Juliano que foi aluno de iniciação científica neste projeto, pela imensa ajuda concedida nas etapas de colheita das amostras, preparação e análises, pela amizade e confiança.

A toda equipe do LAMIC, Alex, Andrieli, Camila, Carlos, Cristiane B., Cristiane S., Denize, Diego, Dima, Diogo, Eduarda, Érika, Fabiana, Fernanda, Franciane, Francis, Jéssica, Karine, Lidiane, Luciane, Raquel C., Raquel S., Ricardo, Vanessa K., Vanessa S., Vinícius, Wagner, Zoila e a todos que passaram por esse Laboratório, pelo auxílio concedido na execução deste trabalho, pelo convívio, amizade e momentos de descontração.

Agradecimento à banca pelas correções e sugestões efetuadas para melhoria desta tese. Ao Ricardo e Andréa, pela disponibilidade de tempo em viajar à Santa Maria, pelas importantes contribuições e à amizade. Ao Maurício, colega do LAMIC, pela amizade e auxílio nas análises, interpretações e redação. Ao Gilmar, pela amizade e à incondicional ajuda no planejamento dos experimentos, análise dos dados e inúmeras discussões ao longo do meu doutorado.

À minha noiva Luiza, pelo amor, carinho, compreensão, ajuda e apoio nesses quatro anos de doutorado. Por acreditar em mim e sempre me incentivar a lutar pelos meus objetivos. Te amo!

Aos meus pais Jacina e João Pedro, pelo exemplo, atenção, conselhos, incentivo, motivação, ajuda e carinho. Aos meus irmãos Etiane e Fábio, pelo exemplo, incentivo e apoio durante este período. Aos meus cunhados Laura, Marcelle e Marcos, pelo apoio e incentivo. À minha afilhada Manuela pelas brincadeiras e carinho. Aos meus sogros, Mirian e Juraci, pelos conselhos, amizade e todo apoio concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e à minha formação pessoal e profissional, meu muito obrigado!

RESUMO

AMOSTRAGEM DE GRÃOS EM SILOS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS E IMPACTO MICOTOXICOLÓGICO E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS

AUTOR: Adriano Olnei Mallmann

ORIENTADOR: Carlos Augusto Mallmann

Cereais armazenados em silos podem estar contaminados por micotoxinas, que se distribuem de forma heterogênea na massa de grãos. Assim, demandam uma amostragem representativa a fim de minimizar o erro analítico. Maiores exigências para qualidade do milho e trigo têm surgido com as novas demandas e resultados de pesquisas. Estima-se que em torno de 70% do custo de produção de aves e suínos seja composto pela alimentação e que o milho é o ingrediente com maior percentual de inclusão na dieta. Para a formulação de uma dieta segura e que atenda adequadamente as exigências nutricionais dos animais, é necessário considerar os riscos das micotoxinas e a composição química e energética dos ingredientes. O objetivo do primeiro estudo foi determinar a concentração de micotoxinas em grãos de milho e trigo armazenados em silos mediante dois processos de amostragem e no segundo estudo foi avaliar as variáveis micotoxicológicas e nutricionais de híbridos de milho com diferentes características que influenciam no custo da ração para frangos de corte. No primeiro estudo foram coletadas amostras de quatro silos de milho e dois silos de trigo, através da introdução de uma sonda pneumática no centro e nos quatro pontos centrais de cada quadrante da superfície até o fundo do silo (12 m), seguindo-se dois processos de amostragem (A e B). Em cada ponto de amostragem, no processo A, a coleta dos grãos foi dividida em três amostras (terço superior, terzo médio e terzo inferior da profundidade do silo) e no processo B, foi coletada apenas uma amostra composta pelos grãos coletados de toda profundidade do silo. As aflatoxinas (AFLA), fumonisinas (FUM), zearalenona (ZEA) foram detectadas nas amostras de milho, com diferença na média de concentração dos silos. No trigo, detectou-se deoxinivalenol (DON) e ZEA, sem diferença na média de concentração nos silos. Os dois processos de amostragem proporcionam resultados de análises com a mesma variabilidade no milho e apesar do processo A ter menor variabilidade para DON no trigo, os dois processos fornecem amostras com mesma representatividade considerando o silo como um lote, dando suporte à tomada de decisão na compra, venda e destinação dos grãos. No segundo estudo, avaliando 26 híbridos de milho geneticamente modificados nas safrinhas de 2016 e 2017, com diferentes germoplasmas, textura de endosperma e duração do ciclo, a prevalência de FUM, AFLA, ZEA e DON foi de 90, 17, 33 e 0%, com médias de 3067, 1, 38 e 0 µg/kg nos dois anos, respectivamente. A média de energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn) e proteína bruta (PB) foi de 3264 kcal/kg e 8,02%, respectivamente e diferiu nos dois anos. O custo da ração estimado para frangos de corte foi influenciado por FUM, PB, EMAn nos dois anos. Híbridos com tecnologia Viptera apresentam menor concentração de FUM e custo da ração mais baixo. Híbridos de ciclo precoce tiveram menor concentração por FUM, maior PB e aminoácidos digestíveis e menor custo da ração.

Palavras-chave: Milho. Trigo. Aflatoxinas. Fumonisinas. Zearalenona. Deoxinivalenol. Energia metabolizável para aves. Proteína bruta. NIRS.

ABSTRACT

SAMPLING GRAINS IN SILOS FOR MYCOTOXIN ANALYSIS AND MYCOTOXICOLOGICAL AND NUTRITIONAL IMPACT OF MAIZE HYBRIDS ON BROILER CHICKEN FEED COST

AUTHOR: Adriano Olnei Mallmann
ADVISER: Carlos Augusto Mallmann

Cereals stored in silos can be contaminated by mycotoxins, which are distributed heterogeneously in the grain mass. Thus, they require representative sampling in order to minimize the analytical error. Higher requirements for maize and wheat quality have arisen with new demands and research results. Around 70% of poultry and pork production costs are composed of feed with maize having the largest percent of inclusion in the diet. For safe diet formulation, adequately nutritional requirements for animals are necessary, and for this it is important to consider the mycotoxins risks and the chemical and energetic composition of the ingredients. The objective of the first study was to compare mycotoxin detection analysis in stored maize and wheat using two sampling processes and in the second study was to evaluate the mycotoxicological and nutritional variables of maize hybrids with different characteristics that influence the broiler chickens feed costs. In the first study, a pneumatic probe was introduced in the centre and at the four central points of each quadrant, from the top to the bottom of the silo (12 m). For sampling process A, this was divided into three samples (upper third, middle third and lower third of the silo height). No sample subdivision took place for sampling process B. Aflatoxins (AFLA), fumonisins (FUM), zearalenone (ZEA) were detected in the maize samples, with a difference in the mean concentration of the silos. In wheat, deoxynivalenol (DON) and ZEA were detected, with no difference in the mean concentration in the silos. The two sampling processes provide results of analyzes with the same variability in maize and although process A has lower variability for DON in wheat, the two processes provide samples with the same representativity considering the silo as a whole, supporting the decision making in the maize purchase, sale and destination of the grains. In the second study, evaluating 26 genetically modified maize hybrids of 2016 and 2017 winter crops, with different germplasm, endosperm grain texture and cycle length, the prevalence of FUM, AFLA, ZEA and DON was 90, 17, 33 and 0%, with means of 3067, 1, 38 and 0 µg/kg in the two years, respectively. The mean apparent metabolizable energy corrected for nitrogen balance (AMEn) and crude protein (CP) was 3264 kcal/kg and 8.02%, respectively, and differed in the two years. The estimated feed for broilers chickens cost was influenced by FUM, PB, AMEn in the two years. Hybrids with Viptera technology show lower concentration per FUM and lower feed cost. Early cycle hybrids have lower concentrations of FUM, higher percentages of CP and digestible amino acids, and lower feed costs.

Keywords: Maize. Wheat. Aflatoxins. Fumonisins. Zearalenone. Deoxynivalenol. Apparent metabolizable energy for poultry. Crude protein. NIRS.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

Figura 1 - Coleta de amostra em silo vertical, segundo Conab (2015).....26

CAPÍTULO 3 - ASSESSMENT OF MYCOTOXIN CONTAMINATION IN MAIZE AND WHEAT STORED IN SILOS USING TWO SAMPLING PROCESSES

Figure 1 - Sampling positions for introduction of a pneumatic probe (top view) and global sample depth (side view) in silos with maize and wheat using two sampling procedures (A and B).39

Figure 2 - Mean concentration and concentration ranges of mycotoxins at the sampling points (W=West, N=North, C=Centre, S=South, E=East) in maize and wheat samples stored in silos. Samples were obtained using process A, with the collection of three global samples at each probe introduction point (upper third, middle third and lower third of the silo height), or process B, with the collection of only one global sample at each probe introduction point (full height of the silo).....43

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Figura 1. Gráfico dos scores (a), por tipo de textura de grão, e loadings (b) para amostras de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017 analisadas para PCA. Correlação entre grãos avariados, fumonisinas (B₁+B₂) (FUM), energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), proteína bruta (PB), aminoácidos digestíveis para aves (LisD, MetD, CisD e TreD) e custo da ração inicial para frangos de corte (R\$ ração).....60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

Tabela 1 - Limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em milho e trigo estabelecidos pela RDC nº 7 de 2011 (ANVISA, 2011; ANVISA, 2017).....	22
Tabela 2 - Subdivisão de lotes em sublotes, número de incrementos e peso da amostra global de acordo com o peso do lote para cereais e produtos derivados segundo European Commission 401/2006	26
Tabela 3 - Resistência das tecnologias de transgenia em híbridos de milho.....	34

CAPÍTULO 3 - ASSESSMENT OF MYCOTOXIN CONTAMINATION IN MAIZE AND WHEAT STORED IN SILOS USING TWO SAMPLING PROCESSES

Table 1 - Mycotoxin mean concentrations and coefficients of variation for maize and wheat samples stored in silos. Samples were obtained using process A, with the collection of three global samples at each probe introduction point (upper third, middle third and lower third of the silo height), or process B, with the collection of only one global sample at each probe introduction point (full height of the silo).....	41
Table 2 - Analysis of variance and multifactor analysis of variance of the coefficients of variation of mycotoxin concentrations in maize and wheat samples stored in silos. Samples were obtained using process A, with the collection of three global samples at each probe introduction point (upper third, middle third and lower third of the silo height), or process B, with the collection of only one global sample at each probe introduction point (full height of the silo).	42

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Tabela 1. Caracterização dos híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.	52
Tabela 2. Exigências nutricionais e custos dos insumos utilizados para o cálculo de custo de rações para frangos de corte na fase inicial (10º ao 21º dia de idade).	53
Tabela 3. Médias de grãos avariados (AV), fumonisinas (B ₁ +B ₂) (FUM), aflatoxinas (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂) (AFLA), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.	54
Tabela 4. Médias de grãos avariados (AV), fumonisinas (B ₁ +B ₂) (FUM), aflatoxinas (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂) (AFLA), zearalenona (ZEA), energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), proteína bruta (PB), aminoácidos digestíveis para aves e custo da ração inicial para frangos de corte (R\$/t ração) por textura do grão, tecnologia de transgenia, tipo de híbrido e ciclo de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.	56
Tabela 5. Médias de energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), proteína bruta (PB), aminoácidos digestíveis para aves e custo da ração inicial para frangos de corte (R\$/t ração) de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.	58
Tabela 6. Modelos de regressão linear múltipla para o custo da ração inicial para frangos de corte (R\$/t ração) calculados com 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM	Aditivo Antimicotoxinas
ACN	Acetonitrila
AFLA ou AF	Aflatoxinas (B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AV	Grãos avariados
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CisD	Cistina digestível para aves
CV	Coeficiente de variação
DON	Deoxinivalenol
EC	Comissão Europeia (<i>European Commission</i>)
EMAn	Energia Metabolizável Aparente para aves corrigida para balanço de nitrogênio
EUA	Estados Unidos da América
FB	Fumonisininas (B ₁ + B ₂)
FUM ou FB	Fumonisininas (B ₁ + B ₂)
FUM TOTAL	Fumonisininas livres + Fumonisininas ocultas
g	Gramas
H ₂ O	Água
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
kg	Quilograma
kcal	Quilocaloria
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial
LisD	Lisina digestível para aves
LMT	Limites Máximos Tolerados
m	Metro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MetD	Metionina digestível para aves
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NIRS	Espectroscopia no Infravermelho Próximo (<i>Near Infrared-Spectroscopy</i>)
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
P ou p	Probabilidade
PCA	Análise dos Componentes Principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PB	Proteína Bruta
PPFR	Programa Prático para Formulação de Rações
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
R\$/t ração	Custo da t de ração para frangos de corte na fase inicial

t	Tonelada
TreD	Treonina digestível para aves
UE	União Europeia
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
USDA	Departamento de Agricultura dos EUA (<i>United States Department of Agriculture</i>)
v/v	Volume/volume
ZEA	Zearalenona
µg	Micrograma

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2. HIPÓTESES.....	14
1.3. PROPOSIÇÃO	15
1.3.1. Objetivo geral	15
1.3.2. Objetivos específicos	15
CAPÍTULO 2 - ESTUDO BIBLIOGRÁFICO	16
2.1. MILHO: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	16
2.2. TRIGO: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	16
2.3. MICOTOXINAS EM MILHO E TRIGO	17
2.3.1. Aflatoxinas	18
2.3.2. Fumonisinias	19
2.3.3. Zearalenona	20
2.3.4. Deoxinivalenol	21
2.4. LEGISLAÇÃO PARA MICOTOXINAS EM MILHO E TRIGO.....	21
2.5. AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS.....	22
2.5.1. Amostragem em silos para análise de micotoxinas	24
2.6. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MILHO.....	27
2.6.3. Determinação da composição nutricional por NIRS	28
2.7. HÍBRIDOS DE MILHO.....	29
2.7.1. Classificação quanto ao tipo	30
2.7.2. Classificação quanto ao ciclo	31
2.7.3. Classificação quanto à textura dos grãos	31
2.7.4. Classificação quanto à modificação genética	32
CAPÍTULO 3 - ASSESSMENT OF MYCOTOXIN CONTAMINATION IN MAIZE AND WHEAT STORED IN SILOS USING TWO SAMPLING PROCESSES	36
INTRODUCTION.....	37
MATERIAL AND METHODS.....	38
RESULTS.....	41
DISCUSSION.....	42
CONCLUSIONS	44
REFERENCES.....	45
CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE	48
INTRODUÇÃO	50
MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS.....	68

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

Novos conceitos de qualidade do milho e trigo têm surgido com as novas demandas e os resultados das pesquisas. Atualmente, o milho e o trigo não podem mais ser considerados uma *commodity*, dada à importância de seus usos e a existência de cultivares com propriedades distintas para cada espécie animal e aos humanos.

Estima-se que em torno de 70% do custo de produção de aves e suínos seja composto pela alimentação. A busca constante por dietas que possam proporcionar o máximo desempenho dos animais de forma econômica tem levado profissionais da área a aprimorarem o conhecimento sobre as características dos alimentos. Para a formulação de uma dieta que atenda adequadamente às exigências nutricionais dos animais, por exemplo, o conhecimento da composição química e energética dos ingredientes é de suma importância. Além disso, é necessário considerar os riscos das micotoxinas, que causam prejuízos à produção animal, uma vez que contaminam os grãos, como o milho e o trigo, utilizados como ingredientes das rações.

A tomada de decisão baseada em informações prévias à compra desses ingredientes favorece o gerenciamento e destinação correta dos grãos, gerando resultados econômicos mais satisfatórios, em virtude do monitoramento e controle do risco de micotoxinas e da formulação de uma dieta mais precisa aos animais. Em vista disso, é necessário o desenvolvimento de um processo de amostragem dos grãos aplicado ainda na etapa de armazenamento. Para tanto, torna-se necessário que esse processo seja prático, adaptando-se às necessidades da indústria, com informações claras e respaldo científico.

Outro ponto de extrema importância para a saúde pública está relacionado aos níveis micotoxicológicos do milho e trigo e seus respectivos subprodutos destinados à alimentação humana. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina, em legislação os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos, porém não prevê métodos de coleta das amostras de grãos armazenados em silos. Alguns métodos de amostragem em silos estão divulgados na literatura, mas não há determinação legal que estabeleça um método oficial. Isso porque esses métodos não definem critérios de desempenho para os processos de amostragem, de modo que

não é possível mensurar a contribuição da amostragem na incerteza analítica geral. Sendo assim, os procedimentos oficiais de amostragem ainda não estão padronizados.

A Embrapa divulgou um levantamento com 315 cultivares de milho disponíveis no mercado brasileiro para a safra 2016/2017, no qual os pesquisadores afirmaram que a escolha para o plantio de cada cultivar deve atender às necessidades específicas de cada sistema produtivo, pois não existe um material que possa proporcionar o máximo potencial produtivo sem que sejam levadas em consideração todas as situações regionais (PEREIRA FILHO E BORGHI, 2016). No entanto, a precificação do milho no Brasil ainda se dá por três classificações básicas estabelecidas pelo MAPA (BRASIL, 2011) (tipo 1, tipo 2 e tipo 3). Considerando que aproximadamente 44% do volume de milho produzido em 2017 foi utilizado como ingrediente de dietas animais (SINDIRAÇÕES, 2017) e que diferentes cultivares de milho podem apresentar composição nutricional variada, torna-se necessário avaliar o impacto de diferentes cultivares de milho sobre o custo da ração.

Considerando os seguintes elementos: demanda das áreas de formulação de precisão, saúde pública, limites máximos toleráveis de micotoxinas em alimentos, controle de qualidade de grãos armazenados e requisitos de qualidade exigidos na compra ou venda de grãos, objetivou-se desenvolver e avaliar dois processos de amostragem de grãos de milho e trigo armazenados em silos para análises de micotoxinas. Na sequência, avaliou-se a influência das diferentes características de híbridos de milho na qualidade micotoxicológica e nutricional e no custo da ração para frangos de corte.

1.2. HIPÓTESES

- É possível coletar amostras representativas de milho e trigo armazenados estaticamente em silos para análises de micotoxinas;
- A variabilidade dos resultados de análises de micotoxinas de amostras coletadas pelos dois processos de amostragem são estatisticamente iguais;
- Tipo de híbrido, textura do endosperma do grão, duração do ciclo e tipo de transgenia de híbridos de milho tem influência na concentração de micotoxinas, composição nutricional e custo da ração para frangos de corte.

1.3. PROPOSIÇÃO

1.3.1. Objetivo geral

Determinar a concentração de micotoxinas em grãos de milho e trigo armazenados em silos mediante dois processos de amostragem, bem como avaliar as variáveis micotoxicológicas e nutricionais de híbridos de milho com diferentes características que influenciam no custo da ração para frangos de corte.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração de aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona e deoxinivalenol em grãos de milho armazenados em silos;
- Determinar a concentração de deoxinivalenol e zearalenona em grãos de trigo armazenados em silos;
- Avaliar dois processos de amostragem de grãos de milho armazenados em silos para análise de micotoxinas;
- Avaliar dois processos de amostragem de grãos de trigo armazenados em silos para análise de micotoxinas;
- Determinar a concentração de micotoxinas em híbridos de milho geneticamente modificados cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017;
- Determinar a composição nutricional de híbridos de milho geneticamente modificados cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017;
- Estimar o custo da ração para frangos de corte calculada com diferentes híbridos de milho;
- Identificar as variáveis que tem influência sobre o custo da ração para frangos de corte.

CAPÍTULO 2 - ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1. MILHO: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O milho (*Zea mays*) é o cereal mais produzido no mundo, segundo estimativas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). A produção mundial na safra de 2016/2017 foi de 1.045 milhões de toneladas, concentrando-se basicamente em três grandes produtores: EUA, China e Brasil, o qual se encontra na terceira posição do ranking mundial de produtores com 95 milhões de toneladas colhidas. Esses três países representam 65,2% da produção mundial de milho (USDA, 2017).

O milho é considerado um alimento energético por sua composição predominante de carboidratos (amido) e lipídeos (óleo), apresenta grande diversidade de utilização na alimentação humana e animal, com mais de 500 derivados empregados em diferentes indústrias, tais como química, alimentícia, mecânica, bebidas, indústria de rações e outras (LIMA, 2001). Segundo Rostagno et al. (2011), o milho é o principal ingrediente que compõem uma formulação de ração para aves e suínos, com alto percentual de inclusão, podendo chegar a 60%. No Brasil, estimativas indicam que 43,7% da produção de milho foi utilizada para fabricação de rações para animais no ano de 2017 (SINDIRAÇÕES, 2017).

2.2. TRIGO: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O trigo (*Triticum* spp.) é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativa importância na economia agrícola global (MAPA, 2012). Segundo estimativas do USDA, a produção mundial na safra de 2017/2018 é estimada em 752 milhões de toneladas. A produção mundial deste cereal concentra-se basicamente na China, Índia, Rússia e EUA. Esses quatro países representam 47,7% da produção mundial de trigo. No Brasil a estimativa é de 4,2 milhões de toneladas para a safra 2017/2018 (USDA, 2017). No entanto, o Brasil não é autossuficiente na produção deste cereal, produzindo aproximadamente a metade do que é consumido, estando sujeito às flutuações do mercado. A região Sul, devido às temperaturas mais amenas, responde por 94,6% da produção nacional de trigo (RAUPP, 2013).

Por suas propriedades nutricionais, o trigo é um dos cereais mais consumidos no mundo e está presente tanto na alimentação humana quanto animal. Esse cereal

é matéria-prima para a elaboração de alimentos consumidos diariamente, na forma de pães, biscoitos, bolos e massas, alimentos que fazem parte da base da pirâmide alimentar (SCHEUER et al., 2011). Além disso, a qualidade dos produtos resultantes do processamento do trigo está relacionada diretamente com os grãos a serem beneficiados, de modo que os cuidados desde o cultivo, colheita e armazenagem do cereal são de extrema importância (CARNEIRO, et al., 2005).

2.3. MICOTOXINAS EM MILHO E TRIGO

Micotoxinas são substâncias resultantes do metabolismo secundário de diversas linhagens de fungos filamentosos, de ocorrência mundial, predominando em climas tropicais e subtropicais, onde o desenvolvimento fúngico é influenciado por fatores como condições de umidade e temperatura bastante favoráveis (MALLMANN e DILKIN, 2007). Quando as micotoxinas são ingeridas, tanto pelo homem quanto por animais, podem produzir diversos efeitos deletérios à saúde, sobretudo por suas propriedades carcinogênicas, teratogênicas, estrogênicas, anabolizantes, mutagênicas, hemorrágicas e nutricionais (KUMAR et al., 2008; MALLMANN e DILKIN, 2007).

O milho está frequentemente contaminado por diversas micotoxinas, dentre elas, as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, e G₂), fumonisinas (B₁ e B₂), zearalenona, deoxinivalenol entre outras (MAZIERO e BERSOT, 2010). Segundo estatísticas do Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o milho é um dos ingredientes com maior percentual de positividade para as principais micotoxinas que afetam a saúde humana e animal. Nas amostras de milho recebidas para análises no laboratório nos anos de 2011 a 2014, a positividade e média de contaminação foi de 80% e 1.585 µg/kg para fumonisinas, 36% e 78 µg/kg para zearalenona, 25% e 6 µg/kg para aflatoxinas e 13% e 88 µg/kg para deoxinivalenol, respectivamente (MALLMANN et al., 2015a).

Na lavoura, o trigo pode ser contaminado por diversas doenças em função das condições climáticas, tipo de solo e susceptibilidade da cultura. Uma das doenças mais conhecidas e que comumente ataca este cereal é a fusariose, desencadeada pela infecção de fungos do gênero *Fusarium*, que além de provocar enfermidades na plantação, podem produzir micotoxinas (CALORI-DOMINGUES et al., 2007). Mallmann et al. (2017), avaliaram amostras de trigo colhidas na região Sul do Brasil

nas safras de 2008 a 2015 e constataram uma positividade e média de contaminação de 73% e 660 µg/kg para deoxinivalenol e 38% e 111 µg/kg para zearalenona, respectivamente. Em outro estudo com amostras de trigo recebidas para análises no LAMIC entre 2011 a 2014 houve uma positividade e média de contaminação de 2% e 38 µg/kg para fumonisinas e 1% e 0,1 µg/kg para aflatoxinas, respectivamente (MALLMANN et al., 2015a).

2.3.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* (RICHARD, 2007). Em climas tropicais e subtropicais, o desenvolvimento desses fungos é favorecido pela presença de umidade e temperatura elevada. Nesse ambiente os fungos crescem e proliferam-se bem em diversos produtos alimentícios, como amendoim, milho, feijão, trigo, entre outros (SANCHIS e MAGAN, 2004). Em milho armazenado, os fatores mais importantes para o crescimento de fungos toxígenos do gênero *Aspergillus* e a produção de aflatoxinas são: a temperatura de armazenamento, a umidade relativa do ar e do substrato. Umidade relativa de 80 a 85% com 17% de umidade do milho e temperaturas de 24 a 35 °C são condições ótimas para a produção de aflatoxinas (DILKIN et al., 2000).

Atualmente são conhecidos 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ (RICHARD, 2007), sendo a B₁ a mais tóxica. Mallmann et al. (2015a) avaliaram a contaminação por aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) (AFLA) em 12.745 amostras de milho recebidas para análise no período de 2011 a 2014, constatando uma contaminação média de 6 µg/kg, com ocorrência em 25% das amostras e média das positivas de 24 µg/kg. No entanto, nas 2.356 amostras de trigo, verificaram uma contaminação média de apenas 0,1 µg/kg, com ocorrência em 4% das amostras e média das positivas de 4 µg/kg.

As AFLA são hepatotóxicas e a susceptibilidade dos animais aos seus efeitos varia conforme a raça, espécie, idade, dose, tempo de exposição e estado nutricional (MALLMANN e DILKIN, 2007). As AFLA podem causar diminuição da produção de leite, ovos, ganho de peso, imunossupressão, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade (MILLER e WILSON, 1994). A Agência Internacional para Pesquisa

sobre Câncer (IARC) classificou a aflatoxina B₁ no grupo I de carcinógenos humanos (IARC, 1993a).

2.3.2. Fumonisinias

As fumonisinias são produzidas por fungos principalmente do gênero *Fusarium* como o *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (ALMEIDA et al., 2005). Os fungos do gênero *Fusarium* se desenvolvem e produzem as maiores quantidades de FUM em condições de clima com temperatura amena (entre 15 e 25 °C) e alto teor de umidade do substrato (acima de 20%) ou atividade de água (Aw) superior a 0,9. Por essas características, esses fungos são frequentemente denominados de “fungos de campo”, pois as maiores concentrações das micotoxinas são observadas em cereais que ficam expostos na lavoura a essas condições favoráveis para o desenvolvimento fúngico (JACKSON e JABLONSKI, 2004; MALLMANN e DILKIN, 2007). Os produtos agrícolas frequentemente contaminados por fumonisinias são: trigo, sorgo, arroz e principalmente o milho e seus derivados (JACKSON e JABLONSKI, 2004).

Atualmente são conhecidas 28 moléculas que foram isoladas e caracterizadas como fumonisinias, sendo representadas principalmente pela fumonisina B₁, que é responsável por cerca de 70% do total das fumonisinias quantificadas em cereais e subprodutos. As fumonisinias B₂ e B₃ ocorrem conjuntamente em menores proporções. Normalmente, apenas as fumonisinias B₁, B₂ e B₃ são detectadas quando a produção de fumonisinias ocorre em condições naturais (KRSKA et al., 2007; RHEEDER et al., 2002). Mallmann et al. (2015a) avaliaram a contaminação por fumonisinias (B₁+B₂) (FUM) em 10.235 amostras de milho no período de 2011 a 2014 e apontaram o milho como produto com maior índice de contaminação, com média de 1.585 µg/kg, ocorrência em 80% das amostras e média das positivas de 1.986 µg/kg. No entanto, nas 894 amostras de trigo, verificaram uma contaminação média de apenas 38 µg/kg, com ocorrência em 2% das amostras e média das positivas de 1.717 µg/kg.

A fumonisina B₁ é hepatotóxica (DILKIN et al., 2003; JASKIEWICS et al., 1987) e pode induzir a leucoencefalomalácia em equinos (MARASAS et al., 1988) e edema pulmonar em suínos (DILKIN et al., 2004). Nos seres humanos, a fumonisina B₁ tem sido associada com câncer de esôfago (RHEEDER et al., 1992). Com base em dados toxicológicos, a IARC estabeleceu que a fumonisina B₁ é potencialmente carcinogênica (classe 2B) para os seres humanos (IARC, 1993b).

2.3.3. Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é um metabólito fúngico estrogênico não esteróide, uma micotoxina produzida por cepas de várias espécies do gênero *Fusarium*, incluindo: *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. graminearum* (ALLDRICK e HAJŠELOVÁ, 2004). Essas espécies colonizam cereais e tendem a tornarem-se particularmente importantes durante estações de alta umidade e temperaturas amenas. Oscilações térmicas com temperaturas baixas são propícias para a produção de grande quantidade desta micotoxina. Temperaturas na faixa de 25 °C favorecem o crescimento fúngico enquanto que redução para aproximadamente 10 °C em presença de umidade superior a 17% desencadeia o metabolismo secundário, responsável pela produção de ZEA (MALLMANN e DILKIN, 2007). Embora a ZEA seja considerada uma micotoxina produzida por fungos de campo, há evidências de que ela também pode ser produzida em grãos armazenados, quando da presença de alta umidade relativa (ALLDRICK e HAJŠELOVÁ, 2004; DESJARDINS, 2006). Assim como outras toxinas produzidas por *Fusarium* spp., a ZEA é associada principalmente com as culturas de cereais como cevada, aveia, trigo, arroz, sorgo e milho em diversos países do mundo (KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

Mallmann et al. (2015a) avaliaram a contaminação por ZEA em 6.010 amostras de milho no período de 2011 a 2014, constatando uma contaminação média de 78 µg/kg, com ocorrência em 36% das amostras e média das positivas de 219 µg/kg. No entanto, nas 3.355 amostras de trigo, verificaram uma contaminação média de 13 µg/kg, com ocorrência em 16% das amostras e média das positivas de 80 µg/kg.

Apesar de sua baixa toxicidade aguda e carcinogenicidade, a ZEA tem sido associada à micotoxicoses em animais de produção, especialmente em suínos, devido ao seu efeito agonista no receptor de estrogênio (ANDRETTA et al, 2008; KUIPER-GOODMAN et al., 1987). Os efeitos patológicos mais comuns são anestro, aborto, aumento de morte embrionária e fetal, fracasso de programas de indução com PGF_{2α} (ALEXOPOULOS, 2001), aumento da incidência de natimortos e *splay leg* em leitões (EDWARDS et al., 1987; ETIENNE e JEMMALI, 1982). A IARC avaliou o potencial carcinogênico da ZEA e concluiu não haver evidências suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais, classificando-a como não carcinogênica (grupo 3) para humanos (IARC, 1993c).

2.3.4. Deoxinivalenol

O deoxinivalenol (DON) é uma micotoxina pertencente à família dos tricotecenos do tipo B e é produzido pelos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* (DIESING et al., 2011). Essa toxina também é conhecida como vomitoxina em virtude de desencadear crises de vômitos, sobretudo quando consumida por suínos. Possui grande importância toxicológica e sua síntese é estimulada sob condições de alta umidade (MILLER, 1995). Estão descritos mais de 180 tricotecenos, sendo o DON o mais frequentemente encontrado em cereais como trigo, centeio, aveia, cevada e milho (MALEKINEJAD et al., 2007).

Mallmann et al. (2015a) avaliaram a contaminação por DON em 4.800 amostras de trigo recebidas para análise no período de 2011 a 2014 e apontaram esse cereal como produto com maior índice de contaminação para DON. Constataram uma contaminação média de 792 µg/kg, com ocorrência em 66% das amostras e média das positivas de 1.200 µg/kg. No entanto, nas 3.963 amostras de milho, verificaram uma contaminação média de apenas 88 µg/kg, com ocorrência em 13% das amostras e média das positivas de 687 µg/kg.

Alimentos contaminados por DON afetam a saúde humana e animal, causando náusea aguda temporária, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre (SOBROVA et al., 2010). A IARC avaliou o potencial carcinogênico do DON e concluiu não haver evidências suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais, classificando-a como não carcinogênica (grupo 3) para humanos (IARC, 1993c).

2.4. LEGISLAÇÃO PARA MICOTOXINAS EM MILHO E TRIGO

No Brasil, a ANVISA estabelece os limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas em alimentos através da RDC nº 7 de 2011 (ANVISA, 2011). Essa resolução possui quatro anexos que listam e classificam os alimentos e estabelecem os limites máximos tolerados (LMT) de AFLA, FUM, ZEA, DON, ocratoxina A e patulina. O anexo I entrou em vigor na data da publicação da resolução, o anexo II entrou em vigor em 1 de janeiro de 2012 e os anexos III e IV entraram em vigor em janeiro de 2017 (ANVISA, 2017) (Tabela 1). Os LMT estabelecidos foram baseados

em resultados obtidos a partir de critérios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, uma coletânea de orientações e recomendações sobre a segurança de alimentos reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em qualquer matéria prima ou ração para consumo animal o nível máximo permitido de aflatoxinas é de 50 µg/kg (BRASIL, 1988).

Tabela 1 - Limites máximos toleráveis (LMT) de micotoxinas em milho e trigo estabelecidos pela RDC nº 7 de 2011 (ANVISA, 2011; ANVISA, 2017)

Micotoxina	Alimento	LMT (µg/kg)
Aflatoxinas (B ₁ +B ₂ + G ₁ +G ₂)	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído).	20
Fumonisinias (B ₁ +B ₂)	Milho em grão para posterior processamento.	5.000
Zearalenona	Trigo integral.	200
	Milho em grão e trigo para posterior processamento.	400
Deoxinivalenol	Trigo integral.	1.250
	Trigo e milho em grãos para posterior processamento.	3.000

De acordo com a legislação da União Europeia (UE), o controle de micotoxinas em alimentos está baseado em LMT, os quais variam de acordo com o tipo de micotoxina e alimento. Baseado nesses valores, os lotes são aceitos ou rejeitados sempre que estiverem abaixo ou acima dos níveis máximos de contaminação permitidos (EUROPEAN COMMISSION, 2006). No entanto, devido ao problema da variabilidade na distribuição das micotoxinas dentro de um lote, é crucial que seja empregado um procedimento de amostragem eficaz, caso contrário, os riscos do produtor, vendedor, comprador ou consumidor são incrementados (MIRAGLIA et al., 2005).

2.5. AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS

Segundo a European Commission (EC) 401/2006, tratando-se de métodos de amostragem para análise de micotoxinas, devem-se seguir as seguintes definições:

- Lote: é uma quantidade de matéria-prima ou de alimento, entregue de uma vez, que apresenta, conforme estabelecido pelo agente responsável, características comuns

tais como a origem, a variedade, o tipo de embalagem, o embalador, o expedidor ou a marcação;

- Sublote: é a divisão do lote em porções menores, a fim de restringir e facilitar o processo de amostragem. Deve estar fisicamente separado e identificado;
- Incremento: é a quantidade de material colhida de um local do lote ou sublote.
- Amostra global: resulta da soma de todos os incrementos coletados de um lote ou sublote e;
- Amostra de laboratório: amostra destinada ao laboratório.

Segundo Whitaker et al. (2011), ao definir um processo de amostragem para análises micotoxicológicas deve-se levar em consideração os procedimentos a serem utilizados para quantificação. Esses procedimentos são constituídos por três fases: uma fase que compreende a própria amostragem; uma de preparação das amostras e finalmente, uma fase de análise. A fase de amostragem consiste em selecionar uma amostra com determinado volume, de acordo com o tamanho do lote. A segunda etapa consiste na preparação, que é dividida em dois pontos: moagem da amostra e subamostragem. A fase de análise é o emprego de metodologias analíticas, onde será determinada a concentração das micotoxinas da amostra representativa do lote. Cada fase do procedimento de quantificação está associada a um nível específico de erro e, conseqüentemente, não é possível estabelecer o valor verdadeiro da contaminação por micotoxinas em um lote. A indicação da eficiência de um procedimento de análise pode ser medida pela variação em cada uma de suas fases. A variação total que constitui o erro é o resultado da soma da variância da amostragem, da variância da preparação da amostra e da variância da análise.

Para exemplificar a complexidade do problema, Mallmann et al. (2013) avaliaram 11 cargas de milho, com 13 a 32 t, suspeitas de contaminação por FUM. O percentual de variação representado pelas fases de amostragem (manual com calador graneleiro), subamostragem (com particionador) e análise (com LC-MS/MS) no índice de variação total foi de 71, 19,6 e 9,4%, respectivamente. Aplicando o mesmo processo de amostragem, Mallmann et al. (2014a) avaliaram a contaminação por AFLA em 8 cargas de milho e verificaram que o percentual do erro associado à etapa de amostragem foi de 95%, enquanto a subamostragem e análise compuseram apenas 4 e 1%, respectivamente. O erro na fase de amostragem é grande porque geralmente as AFLA são encontradas somente em percentagens inferiores a 0,1%

dos grãos do lote. Porém, nesta porção a concentração poderá ser extremamente alta (JOHANSSON et al., 2000).

As estratégias de amostragem podem ser estáticas ou dinâmicas. No primeiro caso, geralmente quando os cereais estão armazenados em containers, caixas de armazenagem, caminhões ou silos, se opta pela coleta manual das amostras (WHITAKER, 2006). Os equipamentos utilizados para a coleta manual das amostras de milho consistem de pás, conchas de bordos retangulares, caladores ou equipamentos pneumáticos compatíveis com o tamanho do lote e das partículas do material a ser amostrado. É importante que esses materiais tenham o comprimento necessário para alcançar o fundo do recipiente armazenador e que o procedimento de coleta de amostras ocorra em diferentes locais e profundidades do lote (MALLMANN e DILKIN, 2007). Já no caso da amostragem dinâmica, geralmente emprega-se a coleta automática em fluxo contínuo, que na maioria das vezes é utilizada para cereais já moídos, mas também se aplica a cereais não moídos que estão sendo transferidos de um local para outro. Pequenos incrementos são coletados ao longo do transporte deste material, que ocorre geralmente por tubulações de rosca sem fim (caracóis), *redlers* ou esteiras (MALLMANN et al., 2015a).

Em empresas armazenadoras de grãos, as duas estratégias podem ser adotadas em momentos diversos. A coleta manual acontece no recebimento da matéria-prima, chamada de amostragem de recebimento (MALLMANN e DILKIN, 2007) ou após o armazenamento. O uso dessas estratégias visa obtenção de dados antecipados sobre o futuro, permitindo assim um planejamento prévio (GOES e LIMA, 2010). No entanto, o maior problema desse tipo de procedimento consiste na dificuldade para homogeneizar corretamente a amostra de grãos. Além disso, a coleta de grãos inteiros aumenta a possibilidade do erro amostral (FAO, 1993). A outra possibilidade de tomada de amostras ocorre depois da moagem, no processamento final dos cereais, utilizando a amostragem automática em fluxo contínuo que permite a verificação de toda a contaminação que ocorreu na matéria prima durante o processo de cultivo, colheita, transporte, secagem, armazenamento e beneficiamento (MALLMANN e DILKIN, 2007; MALLMANN, et al., 2013).

2.5.1. Amostragem em silos para análise de micotoxinas

A UE estabeleceu processos de amostragem detalhados para uma gama de matérias-primas e alimentos, entre elas o milho, no regulamento nº 401/2006 (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Esses processos foram criados para padronizar regimes oficiais de amostragem, porém foram criticados por serem irrealistas em termos de demanda de trabalho necessário (SIEGEL e BABUSCIO, 2011). Por isso, a UE emitiu um documento de orientação para amostragem de cereais para micotoxinas, o qual reconhece que as disposições do Regulamento 401/2006 são praticamente impossíveis de serem aplicadas em lotes de cereais com mais de 500 toneladas armazenados em silos, armazéns e navios (EUROPEAN COMMISSION, 2014). O documento de orientação sugere alguns métodos alternativos de amostragem, em conformidade com a EC 401/2006, permitindo a utilização de métodos de amostragem alternativos em casos de consequências econômicas inaceitáveis ou inviabilidade prática do método oficial (EUROPEAN COMMISSION, 2006). No entanto, uma vez que os métodos alternativos não estão regulamentados, os procedimentos oficiais de amostragem não estão padronizados. Esses regulamentos não definem critérios de desempenho para os processos de amostragem, não havendo, portanto, nenhuma exigência para se estabelecer a contribuição da amostragem na incerteza analítica geral (incerteza proveniente da amostragem, preparação e análise), que pode permanecer em grande parte obscura.

O Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem vegetal elaborado pelo MAPA, segue as recomendações da EC 401/2006 de amostragem para análise de micotoxinas em grãos (Tabela 2) (BRASIL, 2013). Nesse manual, há um exemplo de aplicação em um silo vertical cheio de grãos, sem possibilidade de movimentação e com capacidade estática de 6.000 t. Nesse caso específico, a recomendação da quantidade de incrementos e peso da amostra global difere da recomendação da EC 401/2006. No manual a instrução para proceder com a amostragem é:

- a) dividir o tamanho do lote pela massa do sub-lote indicado na EC 401/2006, ou seja, dividir as 6.000 t por 500 t obtendo o valor igual a 12, o que significa que deve-se amostrar em 12 pontos distribuídos em todo o silo (parte superior, central e inferior);
- b) em cada ponto deve-se coletar 1,5 kg, totalizando a amostra composta (amostra global), que no caso será de 18 kg;
- c) após a obtenção da amostra composta, deve-se homogeneizar e separar 10 kg para análise de micotoxinas;

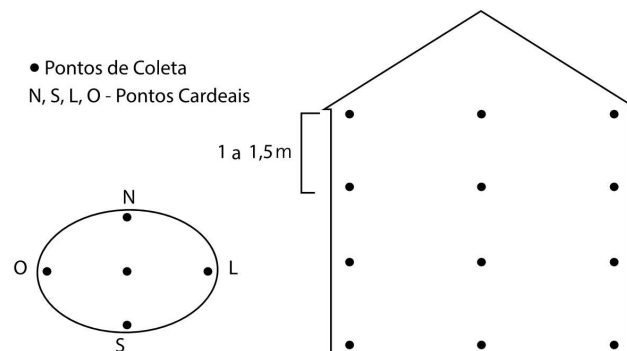
- d) os 10 kg para análise de micotoxinas devem ser ensacados em envoltório plástico de amostra próprio;
- e) o que sobrar da amostra composta deve ser devolvido ao detentor do produto, e
- f) acondicionar e enviar as amostras de acordo com as orientações do Manual.

Tabela 2 - Subdivisão de lotes em sublotes, número de incrementos e peso da amostra global de acordo com o peso do lote para cereais e produtos derivados segundo European Commission 401/2006

Peso do lote (toneladas)	Peso ou número de sublotes	Número de incrementos	Peso da amostra global (kg)
≥ 1500	500 toneladas	100	10
> 300 e < 1500	3 sublotes	100	10
≥ 50 e ≤ 300	100 toneladas	100	10
> 20 e ≤ 50	-	100	10
> 10 e ≤ 20	-	60	6
> 3 e ≤ 10	-	40	4
> 1 e ≤ 3	-	20	2
> 0,5 e ≤ 1	-	10	1
> 0,05 e ≤ 0,5	-	5	1
≤ 0,05	-	3	1

Recentemente a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) emitiu um boletim técnico com instruções para amostragem de grãos (CONAB, 2015). De acordo com as instruções, em caso de inspeções em silos, pode-se estabelecer para a coleta de amostras os quatro pontos cardeais e o centro da massa a alturas pré-determinadas da massa de grãos (profundidade de 1 a 1,5 metros) conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Coleta de amostra em silo vertical, segundo Conab (2015)



Fonte: (Conab, 2015, p. 19).

Mallmann et al. (2014b) coletaram amostras de dois silos, com 7.200 t de milho cada um, utilizando uma sonda pneumática, introduzida em cinco pontos de amostragem, da superfície até o fundo, sendo um no centro e quatro no centro de cada quadrante da superfície do silo. Em cada ponto foi coletada uma amostra de aproximadamente 40 kg, a qual foi quarteada até o peso aproximado de 1 kg, moída e analisada (AFLA, FUM, ZEA, DON, diacetoxiscirpenol, nivalenol e toxina T-2). Também foram determinados os níveis nutricionais de umidade, proteína bruta (PB), extrato etéreo, fibra bruta, matéria mineral, amido, energia metabolizável aparente para aves corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn) e aminoácidos digestíveis para aves (lisina, metionina, metionina+cistina e treonina) com o uso da Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS). Nos dois silos, o coeficiente de variação (CV) médio entre os resultados de micotoxinas dos 5 pontos de amostragem foi de 86% enquanto que o CV médio para os resultados das análises nutricionais dos 5 pontos de amostragem foi de apenas 4%.

2.6. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MILHO

O conhecimento da composição nutricional dos alimentos, representado pelo conteúdo de aminoácidos, coeficientes de digestibilidade dos nutrientes e valores energéticos é de fundamental importância para elaboração de rações para animais monogástricos. A obtenção desses valores permite otimizar o aproveitamento dos nutrientes da ração pelos animais, evitando deficiências ou excesso de nutrientes, o que tanto auxilia na diminuição de custos, quanto na excreção de nutrientes no ambiente (ROSTAGNO et al., 2007). Segundo Albino et al. (2006) em razão dos custos com a alimentação representarem 70% dos custos totais da produção avícola, o conhecimento dos valores energéticos e da composição química dos alimentos usados na formulação de rações torna-se necessário para formular dietas mais precisas.

Em função de condições climáticas, espécie e variedade de grãos, origem, armazenamento e processamento aos quais os ingredientes são submetidos, variações nos valores de composição nutricional dos alimentos são esperados (SANTOS et al., 2005). Estas variações enfatizam a importância do conhecimento da composição química e precisão dos valores energéticos dos alimentos.

O milho é um cereal rico em energia e por isso é considerado um concentrado energético. Isto se deve principalmente ao elevado conteúdo de amido (62,66%) que é um polissacarídeo de fácil digestão no trato gastrointestinal dos animais. O amido do milho é rico em amilopectina, sendo essa fração de mais fácil digestão, quando comparada à fração de amilose (MACHADO e COSTA, 2010). Rostagno et al. (2011) apontam os valores de 3.381 kcal/kg de EMAn para aves e 3.340 kcal/kg de energia metabolizável para suínos. O milho apresenta concentrações de cálcio e fósforo de cerca de 0,03 e 0,25%, respectivamente, sendo que normalmente as rações necessitam do acréscimo de fontes desses minerais. Quanto ao nível de PB, Rostagno et al. (2011) apresentam o nível de 7,88%, sendo esse valor variável. Já quanto à quantidade de metionina+cistina (0,36%), o grão apresenta quantidade satisfatória e nível muito baixo de lisina (0,24%). Quando misturado ao farelo de soja, há a complementação amionoacídica, pois este alimento é rico em lisina mas deficiente em metionina+cistina.

Costa et al. (2013) não detectaram variações no conteúdo de PB no milho coletado em diferentes casas agropecuárias. O nível deste princípio nutritivo também não variou ao longo do ano quando foram comparados seis diferentes meses. No entanto, Mallmann et al. (2015b) avaliaram 43 híbridos e verificaram uma variação de 7,40 a 8,82% na PB e 3.183 a 3.295 kcal/kg na EMn. Vieira et al. (2007), em estudo com 45 híbridos de milho, verificaram uma variação de 2.997 a 3.459 kcal/kg na EMn, 6,85 a 10,08% na PB e oscilação de 24,7% nos níveis de EE.

Em relação à composição nutricional do milho, o grão pode apresentar variações. Isto se deve a fatores como potencial genético, nível de adubação utilizado, fertilidade do solo, condições climáticas, entre outros (EYNG et al., 2009). A informação mais exata e precisa do perfil de aminoácidos dos alimentos é essencial para a formulação de custo mínimo, redução dos riscos de suprimento de níveis marginais ou em excesso dos aminoácidos essenciais dietéticos e, conseqüentemente, diminuição dos custos de alimentação e excreção de nitrogênio para o meio ambiente. Portanto, a utilização mais exata dos valores energéticos dos alimentos otimiza a produtividade e maximiza a rentabilidade na produção animal (SILVA et al., 2008).

2.6.3. Determinação da composição nutricional por NIRS

Nas últimas décadas, vem sendo desenvolvida uma técnica alternativa às tradicionais técnicas de análises bromatológicas, que são demoradas e de custos elevados. Essa técnica que é potencialmente precisa e exata, não destrutiva e capaz de prever características relevantes é conhecida como NIRS (*Near-infrared spectroscopy*) (ALOMAR et al., 1999). Atualmente, o NIRS é amplamente e prosperamente utilizado em muitos campos diferentes como na medicina, no controle de qualidade e também nas análises de alimentos e rações (CAMPESTRINI, 2005). O NIRS emite uma fonte de luz entre 700 e 2.500 nm, a qual permite a obtenção de um quadro completo da composição orgânica de uma substância ou material analisado (VAN KEMPEN, 2001). A radiação no infravermelho, quando absorvida pelas ligações entre os átomos de determinada molécula, provoca movimentos de distensão, de rotação e vibratórios, que são específicos para cada tipo de ligação covalente presente. Os espectros resultantes desta absorção podem ser utilizados para identificar compostos puros ou compostos complexos, pois as curvas espectrais do composto no infravermelho proximal podem ser comparadas a uma “impressão digital” do composto (VOGEL, 1992). Portanto, a técnica baseia-se no princípio de que diferentes ligações químicas na matéria orgânica absorvem ou emitem luz de comprimentos de onda diferentes quando a amostra é irradiada.

Ao se desenvolver uma calibração, relacionam-se as informações espectrais com as informações de métodos de referência, definindo o tratamento matemático dos dados, o segmento do espectro a incluir e o método de regressão a empregar (FONTANELI et al., 2002). Os espectros e os valores de referência são utilizados para calibrar os equipamentos NIRS, utilizando uma correlação matemática entre estes dois grupos de dados, a qual pode ser feita por várias técnicas, tais como regressão linear múltipla e quadrados mínimos parciais. Cada uma destas técnicas estabelece uma correlação matemática entre a variação dos resultados espectrais do NIRS com a variação do parâmetro analisado pela técnica convencional. A correlação pode, então, ser utilizada para prever os valores em novas amostras com teores desconhecidos (CAMPESTRINI, 2005).

2.7. HÍBRIDOS DE MILHO

A Embrapa divulgou um levantamento com 315 cultivares de milho disponíveis no mercado brasileiro para a safra 2016/2017, no qual os pesquisadores afirmaram

que a escolha para o plantio de cada cultivar deve atender às necessidades específicas de cada sistema produtivo, pois não existe um material que possa proporcionar o máximo potencial produtivo sem que sejam levadas em consideração todas as situações regionais (PEREIRA FILHO e BORGHI, 2016). As cultivares/híbridos podem apresentar diferenças quanto ao tipo, ciclo, textura do grão e modificação genética, além evidentemente do seu germoplasma.

2.7.1. Classificação quanto ao tipo

As cultivares diferenciam-se quanto ao tipo: variedade e híbrida. As sementes das variedades melhoradas são de menor custo, com cuidados na condução da lavoura. Plantios subsequentes podem ser feitos até quatro anos, sem perda do potencial produtivo. São recomendadas para produtores que ainda utilizam baixa tecnologia. Os híbridos, por sua vez, só podem ser utilizados em um plantio, sendo necessária, portanto, a aquisição de sementes todos os anos. Caso os grãos colhidos sejam utilizados como sementes, haverá redução da produtividade que gira em torno de 15 a 40%, dependendo do híbrido, além de grande variação entre as plantas (FERREIRA e RESENDE, 2000). Os híbridos podem ser duplos, triplos e simples, sendo que esses dois últimos podem ser modificados ou não:

- Híbridos simples: são os mais produtivos, apresentam grande uniformidade de plantas e espigas. São também os mais caros existentes no mercado.
- Híbridos duplos: apresentam variações quanto às plantas e às espigas, e suas sementes têm o menor preço. O potencial produtivo deste tipo de híbrido é menor que o dos simples e dos triplos nas mesmas condições.
- Híbridos triplos: também apresentam uniformidade entre as plantas e espigas e seu potencial produtivo é intermediário entre os simples e os duplos. Seu preço e sua produtividade também são intermediários.

Para safra de 2016/2017 haviam no mercado de sementes, a disponibilidade das sementes de milho nas proporções de 67,61% de híbridos simples, 16,82% de híbridos triplo, 6,03% de híbridos duplo, 5,07% de variedades, 3,17% de híbridos simples modificado e 0,63% de híbridos triplo modificado (PEREIRA FILHO e BORGHI, 2016).

2.7.2. Classificação quanto ao ciclo

As cultivares de milho são agrupadas, de acordo com o ciclo da planta, em: hiperprecoce, superprecoce, precoce, semiprecoce e normal (MENDES et al., 2010). O ciclo de uma cultivar é determinado pelo número de dias da semeadura ao pendoamento e deste à maturação fisiológica ou colheita:

- Superprecoce: ciclo de 120 dias e florescimento aos 60 dias.
- Precoce: ciclo de 120 a 130 dias, florescimento aos 65 dias.
- Normal: ciclo de 130 a 140 dias, florescimento aos 70 dias.

Das 315 cultivares relacionadas para safra 2016/2017, 214 são precoces (67,93%), 82 superprecoces (23,03%), 10 semiprecoces (3,17%), 5 hiperprecoces (1,58%) e apenas 4 de ciclo normal (1,27%) (PEREIRA FILHO e BORGHI, 2016).

2.7.3. Classificação quanto à textura dos grãos

Em relação à textura do grão, este pode ser classificado como duro, dentado, semidentado ou semiduro. A dureza é uma característica física que influencia na qualidade e no processamento dos grãos de milhos e a vitreosidade é a proporção de endosperma vítreo em relação ao endosperma total do grão (FOX e MANLEY, 2009). Nos grãos de cereais, o amido constitui a maior parte do endosperma, sendo armazenado em estruturas denominadas grânulos. No milho, o endosperma é dividido em farináceo e vítreo, cada qual com características físico-químicas específicas em que quanto mais duro o grão, maior a quantidade de endosperma vítreo e quanto mais dentado o grão, maior a quantidade de endosperma farináceo (HOSENEY, 1994). No Brasil, as opções de cultivares disponibilizadas na safra de 2016/2017 foram de 13,7%, 54,3%, 23,5% e 8,6% para os milhos duro, semiduro, semidentado e dentado, respectivamente (PEREIRA FILHO e BORGHI, 2016). Os milhos duro e semiduro são preferidos pela indústria, pois quanto mais macia a textura do grão, maior a suscetibilidade a incidências de doenças e infestação por insetos que podem causar injúrias aos grãos e conseqüentemente favorecer a colonização de fungos (BÚTRON et al., 2009; ONO et al., 2000).

Os grânulos de amido do endosperma farináceo podem ser mais susceptíveis à ação enzimática, porque a matriz proteica que os circundam é relativamente fina e incompleta, apresentando espaços vazios e menor densidade (HUNTINGTON, 1997).

Ao contrário, os grânulos de amido do endosperma vítreo são embebidos por uma matriz proteica espessa e contínua, tornando-os menos acessíveis às enzimas amilolíticas (CHOCT et al., 2001). Além disso, os grânulos de amido do endosperma vítreo formam uma estrutura compacta e mais densa, quando comparada ao endosperma farináceo (HUNTINGTON, 1997). Portanto, se considerarmos que o endosperma vítreo apresenta uma certa resistência à atuação das enzimas digestivas, a relação deste com o endosperma farináceo pode afetar diretamente a digestibilidade do milho. Resultados de experimentos realizados com suínos em fase de creche e crescimento demonstram a existência de correlação negativa entre dureza e digestão do milho (CANTARELLI et al., 2007; PIOVESAN et al., 2011).

2.7.4. Classificação quanto à modificação genética

O desenvolvimento da biotecnologia permitiu o uso de genes que codificam proteínas com atividades inseticida, tornando-se uma importante forma de controle com amplo potencial. Em diversas culturas como milho, algodão, arroz, soja, entre outras, tem-se utilizado essa forma de controle de insetos, que é eficaz e menos agressiva ao meio ambiente em comparação aos inseticidas usualmente utilizados (SILVA-FILHO e FALCO, 2000; WAQUIL, 2007).

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, entomopatogênica, presente no solo, que pode se manter em latência na forma de endósporos. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos polos da célula (BOBROWSKI et al., 2003). Ao ingerir os cristais de *B. thuringiensis*, as larvas dos insetos suscetíveis sofrem ação do pH intestinal e de proteases que solubilizam os cristais e ativam as toxinas. As toxinas ligam-se a receptores localizados no tecido epitelial do intestino da praga, quebrando o equilíbrio osmótico da célula, que se intumesce e rompe, extravasando o conteúdo intestinal para hemocele do inseto. Consequentemente, a larva para de se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição ou septicemia (PRAÇA et al., 2004).

A primeira liberação de uma planta de milho transgênica no Brasil foi em 2007, com o evento YieldGard®, que expressa a proteína Cry1Ab. Na sequência, para controle das pragas alvo da cultura do milho, em especial a *Spodoptera frugiperda*, a *Diatraea saccharalis* e a *Helicoverpa zea*, foram desenvolvidas as tecnologias

HERCULEX[®], YELDGARD VT PRO[™], VT PRO 2[™], VIPTERA[®], YELDGARD[®] e POWERCORE[™], tendo grande eficiência para o controle dessas pragas e até mesmo dispensar a aplicação de inseticidas (MENDES et al., 2010).

As cultivares transgênicas disponibilizadas no mercado na safra de 2016/2017 apresentam várias tecnologias responsáveis por grande parte de controle das lagartas que atacam a cultura, tanto na parte aérea quanto de solo, bem como a plantas resistentes ao glifosato e glifosinato. As principais tecnologias, com diferentes eventos de transgenia, disponíveis na safra 2015/2016 e 2016/2017 e que foram utilizadas no estudo do capítulo 4 desta tese, segundo Cruz et al. (2015) e Pereira Filho e Borghi (2016) são (Tabela 3):

- Tecnologia YieldGard[®] VT PRO (PRO): resistente a insetos da ordem lepidóptera, promove controle das três principais lagartas que atacam o milho: lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e broca do colmo (*Diatraea saccharalis*).
- O VT PRO2 (PRO2): resistente a insetos da ordem lepidóptera, promove controle das três principais lagartas (lagarta do cartucho, lagarta da espiga e broca do colmo), além da tolerância ao glifosato, permitindo o controle mais eficaz das plantas daninhas.
- O VT PRO3 (PRO3): além da tolerância ao herbicida glifosato, apresenta duas proteínas Bt para controle das principais lagartas da parte aérea do milho (lagarta do cartucho, lagarta da espiga, broca do colmo, e lagarta elasma (*Elasmopalpus lignosellus*)) e uma proteína Bt específica para o controle da larva-alfinete (*Diabrotica speciosa*), praga que fica abaixo da superfície do solo e se alimenta das raízes do milho, diminuindo a capacidade de absorção de água e nutrientes, impactando diretamente no crescimento e na produtividade da lavoura.
- Tecnologia POWERCORE[™] (PW): congrega três modos de ação efetivos, proporcionados pela presença de três proteínas inseticidas (Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2) que conferem controle de lepidópteros que atacam a parte aérea, além do controle de lagartas de solo (lagarta do cartucho, lagarta da espiga, broca do colmo, lagarta elasma, lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*) e lagarta das vagens (*Spodoptera eridania*)), e da presença de duas proteínas (CP4 EPSPS, PAT) para resistência aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio.
- Tecnologia Herculex I[®] (H ou HX): resistente a insetos da ordem lepidóptera (TC 1507: Bt Cry1F 1507) (lagarta da espiga, broca do colmo, lagarta elasma, e lagarta

rosca). Inicialmente apresentava ação sobre a lagarta do cartucho, mas houve o desenvolvimento de resistência para a mesma.

- Tecnologia TL Viptera® (VIPTERA): resistente a insetos da ordem lepidóptera proteção contra lagarta do cartucho, lagarta da espiga, broca do colmo, lagarta elasma e lagarta rosca.

Tabela 3 - Resistência das tecnologias de transgenia em híbridos de milho

Resistência	Tecnologia					
	YieldGard® VT PRO (PRO)	YieldGard® VT PRO 2 (PRO2)	YieldGard® VT PRO 3 (PRO3)	Powercore™ (PW)	Herculex I (H ou HX)	TL Viptera® (VIPTERA)
Lagarta do cartucho (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	x	x	x	x	x*	x
Lagarta da espiga (<i>Helicoverpa zea</i>)	x	x	x	x	x	x
Broca do colmo (<i>Diatraea saccharalis</i>)	x	x	x	x	x	x
Lagarta elasma (<i>Elasmopalpus lignosellus</i>)			x	x	x	x
Larva-alfinete (<i>Diabrotica speciosa</i>)			x			
Lagarta rosca (<i>Agrotis ipsilon</i>)				x	x	x
Lagarta das vagens (<i>Spodoptera eridania</i>)				x		
Glifosato		x	x			
Glufosinato de amônio				x		

*Inicialmente apresentava ação sobre a lagarta do cartucho, mas houve o desenvolvimento de resistência para a mesma.

Alves et al. (2015) avaliaram 18 híbridos de milho e verificaram que há divergência genética entre os híbridos de milho transgênico e as variáveis amilose, extrato etéreo e cisteína foram, nessa ordem, as que mais contribuíram para a divergência genética. Vieira et al. (2007), determinaram a composição química e os valores energéticos de 45 híbridos de milho e constataram uma variação considerável nos valores proteicos e energéticos. Camargos et al. (2000) em estudo com 19 híbridos de milho cultivadas em campos experimentais em três locais no estado de São Paulo, Brasil, durante a safra 1997/1998, constataram que todas as amostras estavam contaminadas com FUM, variando de 2080 a 34290 µg/kg. Essas pesquisas

demonstram que há variações significativas na composição micotoxicológica e nutricional no milho de diferentes materiais genéticos, e conseqüente influência no custo da ração quando utilizado como ingrediente.

CAPÍTULO 3 - ASSESSMENT OF MYCOTOXIN CONTAMINATION IN MAIZE AND WHEAT STORED IN SILOS USING TWO SAMPLING PROCESSES

Artigo submetido ao periódico World Mycotoxin Journal

ASSESSMENT OF MYCOTOXIN CONTAMINATION IN MAIZE AND WHEAT STORED IN SILOS USING TWO SAMPLING PROCESSES

A.O Mallmann, M.S Oliveira, P. Dilkin, J.K. Vidal, G.R. Meinerz,
C.A.A Almeida, C.A. Mallmann

Assessment of mycotoxin contamination in maize and wheat stored in silos using two sampling processes

A.O. Mallmann¹, M.S. Oliveira¹, P. Dilkin¹, J.K. Vidal¹, G.R. Meinerz², C.A.A. Almeida¹, C.A. Mallmann^{1*}

¹Laboratory of Mycotoxicological Analysis (LAMIC), Federal University of Santa Maria (UFSM), P.O. Box 5011, 97105-970 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ²Department of Agronomy, Federal University of Southern Border (UFFS), 97900-000 Cerro Largo, Rio Grande do Sul, Brazil; mallmann@lamic.ufsm.br

Research article

Abstract

Mycotoxin contamination of stored cereals often occurs in a highly heterogeneous manner, demanding representative sampling process to minimise analytical errors. The objective of this study was to compare mycotoxin detection analysis in stored maize and wheat using two sampling processes. Samples were obtained from four maize silos and two wheat silos. A pneumatic probe was introduced in the centre and at the four central points of each quadrant, from the top to the bottom of the silo (12 m). For sampling process A, this was divided into three samples (upper third, middle third and lower third of the silo height). No sample subdivision took place for sampling process B. LC-MS/MS was used for analysis of aflatoxins (AF), fumonisins (FB), zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON) in maize and DON and ZEA in wheat. Sampling procedures were compared with respect to the variability of the collected data. AF, FB, ZEA and DON were detected in 77.5%, 100.0%, 56.7% and 0.0% of the maize samples, respectively, and mean concentration differed ($p < 0.05$) between silos. In wheat, 100.0% and 97.5% of the samples were contaminated with DON and ZEA, respectively, and there was no difference in mean concentration between silos ($p > 0.05$). There was no significant difference ($p > 0.05$) in the coefficients of variation (CVs) of AF (54.9% and 58.6%), FB (19.4% and 27.3%) and ZEA (68.9% and 85.5%) between sampling processes A and B in maize silos. The DON CV in sampling process A (10.1%) was lower ($p < 0.05$) than the CV in sampling process B (22.2%) in wheat silos. Overall, the two sampling processes provided analytical results with the same variability in maize and different variability for DON in wheat, where process A yielded results with lower variability.

Key words: *Aspergillus*, *Fusarium*, mycotoxin variability, stored grains, grain bins

Introduction

The storage of cereals in vertical silos, whether or not equipped with temperature control and aeration, is a common practice throughout the world to preserve grain quality and safety (Lacey, 1989). However, even when the strictest control practices are employed, stored cereals can become contaminated by secondary metabolites produced by several species of filamentous fungi, termed mycotoxins. Several species from the *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus* genera have the ability to produce mycotoxins, and these fungi are frequently found in stored cereals worldwide (Magan *et al.*, 2003).

Water activity in the growing plant does not prevent growth of *Fusarium* species and mycotoxin contamination, and this growth and production of mycotoxins can continue during storage if grains are not dried adequately (Magan and Lacey, 1984a; 1984b; 1984c). Conversely, growth of *Aspergillus* species is limited in the field but storage conditions with

lower grain moisture provide ideal conditions for growth and mycotoxin production (Marin *et al.*, 1998). Maize can be frequently contaminated with several mycotoxins, including aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) (AF), fumonisins (B₁ and B₂) (FB), zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON), among others (Maziero and Bersot, 2010; Oliveira *et al.*, 2017; Streit *et al.*, 2012). The major wheat contaminants are DON and ZEA (Calori-Domingues *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2016; Mallmann *et al.*, 2017; Zaied *et al.*, 2012). Consumption of food or feed contaminated with mycotoxins can produce several deleterious effects on human and animal health, mainly due to their carcinogenic, mutagenic (Bennett and Klich, 2003; IARC, 2012), estrogenic, anabolic (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987) and anti-nutritional (Sobrova *et al.*, 2010) properties.

Mycotoxin contamination can occur in a small percentage of grains in a batch, and concentration in a single grain can be extremely high. This heterogeneous distribution of contamination means that the concentration of mycotoxins in an inspected batch can be easily estimated erroneously if an appropriate sampling procedure is not used (Magan and Olsen, 2004).

The steps in mycotoxicological analysis can be grouped as follows: sampling, sample preparation and mycotoxin quantification (Miraglia *et al.*, 2005; Whitaker *et al.*, 2011). Each step of this analysis is associated with a specific error level, rendering it difficult to establish an accurate assessment of mycotoxin contamination in a batch. An indication of the efficiency of an analysis can be determined from the variation in each of its steps. The total variance that constitutes the error is the result of the variance sum of the three steps.

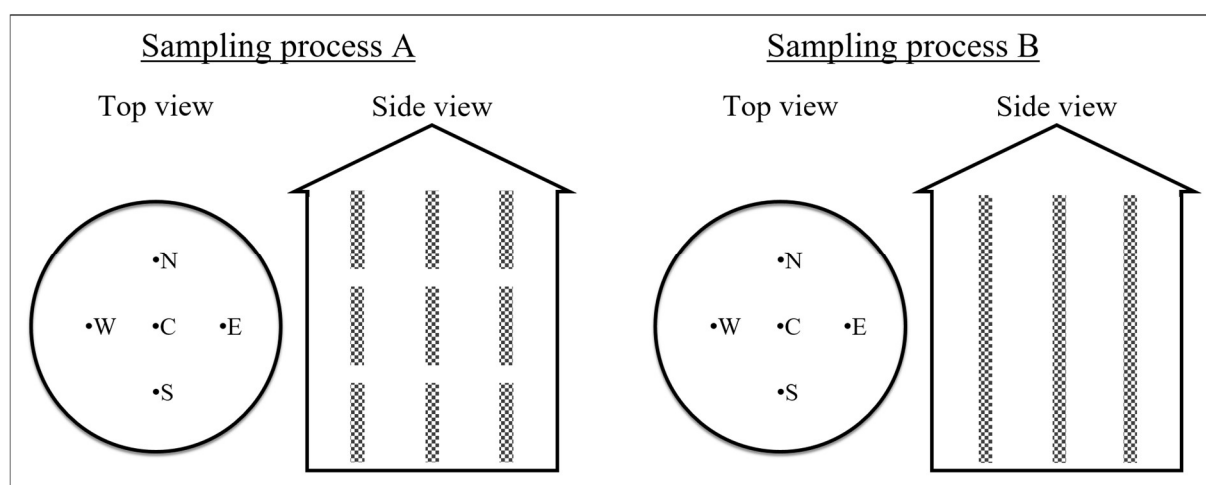
In the European Union, detailed sampling procedures for a range of raw materials and foodstuffs, including maize and wheat, are outlined in Regulation EC 401/2006 (EC, 2006). These processes were designed to standardise official sampling regimes but were criticised for their onerous labour requirements (Siegel and Babuscio, 2011). Consequently, the European Union updated Regulation EC 401/2006 with Regulation EC 519/2014, which, in addition to providing cereal sampling guidance for mycotoxin analysis, recognised that the provisions of EC 401/2006 were practically impossible to apply in lots of cereals of more than 500 tons. The revised Regulation also allows the use of alternative sampling methods in cases of unacceptable economic consequences or impracticability of the official method. In Brazil, for grains in silo storage, the National Supply Company (CONAB, 2015) recommends sampling points at the four cardinal points and the centre of the mass at predetermined heights every 1–1.5 m. However, alternative sampling methods are not regulated, and there are no performance criteria for the sampling procedures, which may compromise analytical quality. Limited information on sampling methodologies for grains stored in silos is available. The objective of this study was therefore to determine the concentration of mycotoxins in maize and wheat grains stored in vertical silos through two sampling processes.

Material and methods

Samples of maize and wheat grains stored in silos ($\varnothing = 12$ m, wall height = 12.5 m and roof height = 3 m), containing approximately 1,000 t of maize or wheat in each silo, were collected. Grain was pre-cleaned and dried prior to storage. Maize samples were collected in July 2015, from four silos containing maize from the 2014/2015 crop. Two silos were located at latitude 28°33'28" S and longitude 52°44'37" W and two at latitude 28°44'7" S and longitude 52°50'3" W. The wheat samples were collected in July 2016, from two silos containing wheat from the 2015/2016 crop. Both silos were located at latitude 28°44'7" S and longitude 52°50'3" W. Each silo contained a mixture of grains from several lots that were produced in regions near to the silo locations in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Sampling

Grain sampling was performed using a SAV 2000 pneumatic probe (Gehaka, São Paulo, Brazil), which was introduced into the centre and into four central points of each quadrant from the top to bottom of the silo. Samples from two different sampling processes (Figure 1) were used for mycotoxicological analysis. In sampling process A, three global samples were collected at each point of introduction of the probe: one global sample was composed of the grains collected in the upper third, another global sample of grains of the middle third and finally one global sample of the lower third of the silo. Each global sample contained approximately 4 kg of grains. In sampling process B, only one global sample was collected at each point of introduction of the probe, contained grains collected from the full depth of the silo and had a weight of approximately 12 kg.



Top view: W=West, N=North, C=Centre, S=South, E=East.

Figure 1 - Sampling positions for introduction of a pneumatic probe (top view) and global sample depth (side view) in silos with maize and wheat using two sampling procedures (A and B).

The pneumatic probe was introduced three times at five points in each silo to give 45 global samples for process A and 15 global samples for process B, totalling 240 global maize samples and 120 global wheat samples in this study. A laboratory sample for mycotoxicological analysis was obtained from the global sample, after samples were ground in a 2 mm sieve hammer mill and reduced in a Jones-type sample divider to 1 kg.

Sample preparation and analysis

Laboratory samples were milled using a 1 mm sieve in an ultra-centrifugal ZM200 mill (Retsch GmbH, Haan, Germany) and then homogenised. After sample homogenisation, samples were used for AF, FB, DON and ZEA analysis in maize and DON and ZEA analysis in wheat.

AF analysis was performed using a method adapted from that of Sulyok *et al.* (2007). The sample (5 g) was added to 20 mL of acetonitrile:water solution (84:16, v/v) and shaken for 1 hour at 70 rpm (Lucadema, São Paulo, Brazil). The resulting extract was diluted with a methanol:water (1:1, v/v) solution, and 20 μ L was injected into a 1200 Series Infinity HPLC (Agilent, Palo Alto, USA) coupled to a 5500 QTRAP mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, USA) equipped with an Electrospray ionisation (ESI) source in positive mode. Chromatographic separation was performed at 30 °C using an Eclipse XDB-C8 column (4.6 \times 150 mm, 5 μ m particle diameter) (Agilent, Palo Alto, USA), with a mobile phase gradient

composed of solutions of methanol:water:ammonium acetate (95:4:1, v/v/v) (solution A) and water:ammonium acetate (99:1, v/v) (solution B).

For FB analysis, an adaptation of the method described by Mallmann *et al.* (2013) was used. Sample (3 g) was added to 15 mL of acetonitrile:water solution (1:1, v/v) and vortexed using an MA563 instrument (Marconi, Piracicaba, Brazil) for 20 minutes. The resulting extract was diluted in acetonitrile:water:formic acid solution (5:4:1, v/v/v), and 10 μ L was injected into a 1200 Series Infinity HPLC (Agilent, Palo Alto, USA) coupled to an API mass spectrometer 5000 (Applied Biosystems, Foster City, USA) equipped with an ESI source in positive mode. Chromatographic separation was performed at 40 °C using an Eclipse XDB-C8 column (4.6 \times 150 mm, 5 μ m particle diameter) (Agilent, Palo Alto, USA), with a mobile phase gradient composed of solutions of water:formic acid (95:5, v/v) (solution A) and acetonitrile:formic acid (95:5, v/v) (solution B).

For DON and ZEA analysis, an adaptation of the method described by Berthiller *et al.* (2005) was used. Sample (3 g) was added to 24 mL of the methanol:water solution (7:3, v/v) and vortexed for 20 minutes using an MA563 instrument (Marconi, Piracicaba, Brazil). The resulting extract was diluted in methanol:water:ammonium acetate 1 M solution (90:9:1, v/v/v), and 10 μ L was injected into a 1200 Series Infinity HPLC (Agilent, Palo Alto, USA) coupled to a 4000 QTRAP mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, USA), equipped with an ESI source in positive mode. Chromatographic separation was performed at 40 °C using a Zorbax SB-C18 column (4.6 \times 150 mm, 5 μ m particle diameter) (Agilent, Palo Alto, USA), with a mobile phase gradient composed of solutions of methanol:water:ammonium acetate (90:9:1, v/v/v) (solution A) and water:ammonium acetate (90:10, v/v) (solution B).

Analytical quality assurance

To ensure analytical quality, limits of quantification (LOQs) and limits of detection (LODs) were established through the signal-to-noise ratio (LOQ = 10/1, LOD = 3/1). For recovery estimate calculation of each analyte, analyses were performed with seven replicates of spiked samples at three different concentrations of the analyte of interest. The linearity was evaluated using the coefficient of determination (R^2), calculated after triplicate injection of analytical curves with seven different sample concentrations. Analytical curves with $R^2 > 0.99$ were used. Certified reference materials (CRMs) with known contamination values were analysed together with the samples. The CRM results were evaluated through z-scores, with values between -2 and +2 being considered satisfactory. CRM numbers 4105 (AF), 22114 (ZEA) and 4307 (DON) were analysed. As no CRM was available for FB, a sample was spiked at a known contamination level and used as a quality control sample.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XV software (Manugistics Inc., Rockville, USA). The normality of the residues was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. The F-test (parametric variables) and the Mann-Whitney test (non-parametric variables) were used to determine statistical differences between the concentration of mycotoxins and coefficients of variation (CVs) of the two sampling processes by grain type. The Kruskal-Wallis test (non-parametric variables) or ANOVA followed by Tukey's test (parametric variables) were used to verify differences in mycotoxin concentrations in the different silos. Multifactor ANOVA was applied to verify the effect of silos as blocks in the two sampling processes studied. The significance level of 5% was used for all analyses.

Results

In total, 240 maize samples were collected from four silos. AF were detected in 77.5% (1–28 µg/kg) of samples, FB in 100% of samples (379–10,300 µg/kg) and ZEA in 56.7% of samples (20–418 µg/kg). DON was not detected (>200 µg/kg). Maize from silos 1 and 2 had the lowest concentration of AF and ZEA ($p<0.05$), and maize from silo 3 had the lowest concentration of FB ($p<0.05$). Maize samples from silo 3 sampled using process A had a lower concentration of AF than samples produced by process B ($p<0.05$) (Table 1).

Table 1 - Mycotoxin mean concentrations and coefficients of variation for maize and wheat samples stored in silos. Samples were obtained using process A, with the collection of three global samples at each probe introduction point (upper third, middle third and lower third of the silo height), or process B, with the collection of only one global sample at each probe introduction point (full height of the silo).

Silo	AF ¹ (CV ²)		FB ³ (CV)		ZEA ⁴ (CV)	
	A ⁵	B ⁶	A	B	A	B
Maize 1	2.0b (84.9)	1.8c (55.6)	2,297ab (25.6)	2,316a (23.8)	17.6bc (79.4)	15.8 (78.0)
Maize 2	1.6b (81.9)	1.7bc (94.0)	2,069a (19.9)	2,280ab (22.7)	19.8c (85.8)	30.9 (107.1)
Maize 3	6.1aB (22.9)	9.3aA (33.7)	1,282b (9.8)	1,235b (27.2)	47.9a (55.1)	48.8 (69.1)
Maize 4	4.4a (29.7)	4.8b (50.9)	2,175a (22.5)	1,784ab (35.9)	52.4ab (53.6)	57.8 (88.0)
Average	3.5 (54.9)	4.4 (58.6)	1,956 (19.4)	1,904 (27.3)	34.4 (68.9)	38.3 (85.5)
Silo	DON ⁷ (CV)		ZEA (CV)			
	A	B	A	B		
Wheat 1	425 (12.5)	420 (23.5)	26.8B (17.6)	35.8A (27.4)		
Wheat 2	388 (7.7)	440 (20.8)	29.0 (20.4)	30.7 (23.4)		
Average	406 (10.1)	430 (22.2)	27.9 (19.0)	33.2 (25.4)		

¹AF: Aflatoxins (B₁+B₂+G₁+G₂) (µg/kg). ²CV: Coefficient of variation (%). ³FB: Fumonisin (B₁+B₂) (µg/kg). ⁴ZEA: Zearalenone (µg/kg). ⁵Sampling process A. ⁶Sampling process B. ⁷DON: Deoxynivalenol (µg/kg). Means followed by different lowercase letters in the same column indicate differences between maize silos using the same sampling process as assessed using a Kruskal-Wallis test ($p<0.05$). Means followed by different uppercase letters indicate differences between the sampling processes in the same maize silo as assessed using a Mann-Whitney test ($p<0.05$) and in the same wheat silo by the F-test ($p<0.05$).

For both the A and B sampling procedures, higher concentrations of mycotoxins were observed in maize samples collected from the centre than in the samples from the surrounding quadrants. In silo 1, FB levels were 4,750 and 3,631 µg/kg for the A and B samples, respectively. FB levels in silo 2 were 3,318 and 4,340 µg/kg, respectively, and levels in silo 4 were 3,939 and 2,543 µg/kg. Levels of AF in silo 3 were 10 and 10 µg/kg for A and B samples, respectively, and levels of ZEA in maize in silo 4 were 68 and 104 µg/kg, respectively (Figure 2). There were no significant differences ($p>0.05$) in the CVs of AF, FB or ZEA between the A and B sampling processes. There was also no silo effect ($p>0.05$) on AF, FB or ZEA CVs (Table 2).

All of the 120 wheat samples collected were contaminated with DON (200–888 µg/kg), and 97.5% of the wheat samples were contaminated with ZEA (20–75 µg/kg). No differences in DON or ZEA concentrations were seen per silo. However, wheat samples collected from silo 1 using sample process A showed lower contamination by ZEA than samples obtained using process B ($p<0.05$) (Table 1). Comparing the CV of the two sampling processes, the DON CV for sampling process A was smaller ($p<0.05$) than the CV for sampling process B, whereas the CVs for ZEA showed no difference. No silo effects ($p>0.05$) were observed for DON and ZEA CVs (Table 2).

Table 2 - Analysis of variance and multifactor analysis of variance of the coefficients of variation of mycotoxin concentrations in maize and wheat samples stored in silos. Samples were obtained using process A, with the collection of three global samples at each probe introduction point (upper third, middle third and lower third of the silo height), or process B, with the collection of only one global sample at each probe introduction point (full height of the silo).

Silo	CV ¹ of mycotoxin	ANOVA	Multifactor ANOVA	
		P	P – sampling process effect	P – silo effect
Maize	AF ²	0.773	0.764	0.052
Maize	FB ³	0.105	0.103	0.246
Maize	ZEA ⁴	0.279	0.283	0.552
Wheat	DON ⁵	0.002*	0.002*	0.269
Wheat	ZEA	0.169	0.181	0.897

¹CV: Coefficient of variation (%). ²AF: Aflatoxins (B₁+B₂+G₁+G₂) (µg/kg). ³FB: Fumonisin (B₁+B₂) (µg/kg). ⁴ZEA: Zearalenone (µg/kg). ⁵DON: Deoxynivalenol (µg/kg). *P<0.05.

Discussion

Mycotoxin concentrations detected in maize samples were similar to the concentrations of AF, FB and ZEA found by Oliveira *et al.* (2016) in maize samples from the southern Brazilian states and the concentrations of AF and FB found by Moreno *et al.* (2009) in maize samples from Paraná state, Brazil. In wheat, the levels of DON and ZEA contamination found in this study were similar to those reported by Mallmann *et al.* (2017) in wheat samples collected in southern Brazil in the 2015 wheat crop and by Duffeck *et al.* (2017) in wheat samples collected in the states of Rio Grande do Sul, Paraná and São Paulo, Brazil.

In maize samples, the variability of AF concentrations did not differ between the two sampling processes. Johansson *et al.* (2000) estimated the total variance components for quantification of AF in maize lots with 45 kg samples in each batch, reduced to 1.13 kg for milling and analysis. Applying the AF total variance equation proposed by Johansson *et al.* (2000) in the data collected from four maize silos and two sampling processes evaluated in the present study, we found minimum and maximum CVs of 67.3% and 141.5%, respectively. However, the CVs found in this study were lower, in the 33.7–94.0% range. Similarly to Johansson *et al.* (2000), Whitaker *et al.* (1998) proposed an equation to estimate the total variance from the mean concentration of FB in a maize batch. Calculation of CVs for FB analysis in maize samples using the Whitaker *et al.* (1998) approach resulted in minimum and maximum CVs of 20.8 and 23.2%, respectively. However, in the present study, CVs were in the 9.8–35.9% range.

The distribution of DON contamination on wheat grains may be less heterogeneous than for other mycotoxins (Hart and Schabenberger, 1998), including AF in maize (Johansson *et al.*, 2000; Whitaker *et al.*, 1979), AF in peanut (Whitaker *et al.*, 1994), AF in cottonseed (Whitaker *et al.*, 1976), FB in maize (Whitaker *et al.*, 1998) and ochratoxin A in wheat (Biselli *et al.*, 2008). This lower variability of DON in wheat at the sampling step may be partly explained by the amount of grains per mass unit: whereas wheat has approximately 30 grains per gram, maize and peeled peanuts have approximately 3 and 2 grains per gram, respectively. In addition, a higher percentage of wheat grains are contaminated with DON, which increases the sample representativity and reduces the sampling step error (Biselli *et al.*, 2008; Whitaker *et al.*, 2000).

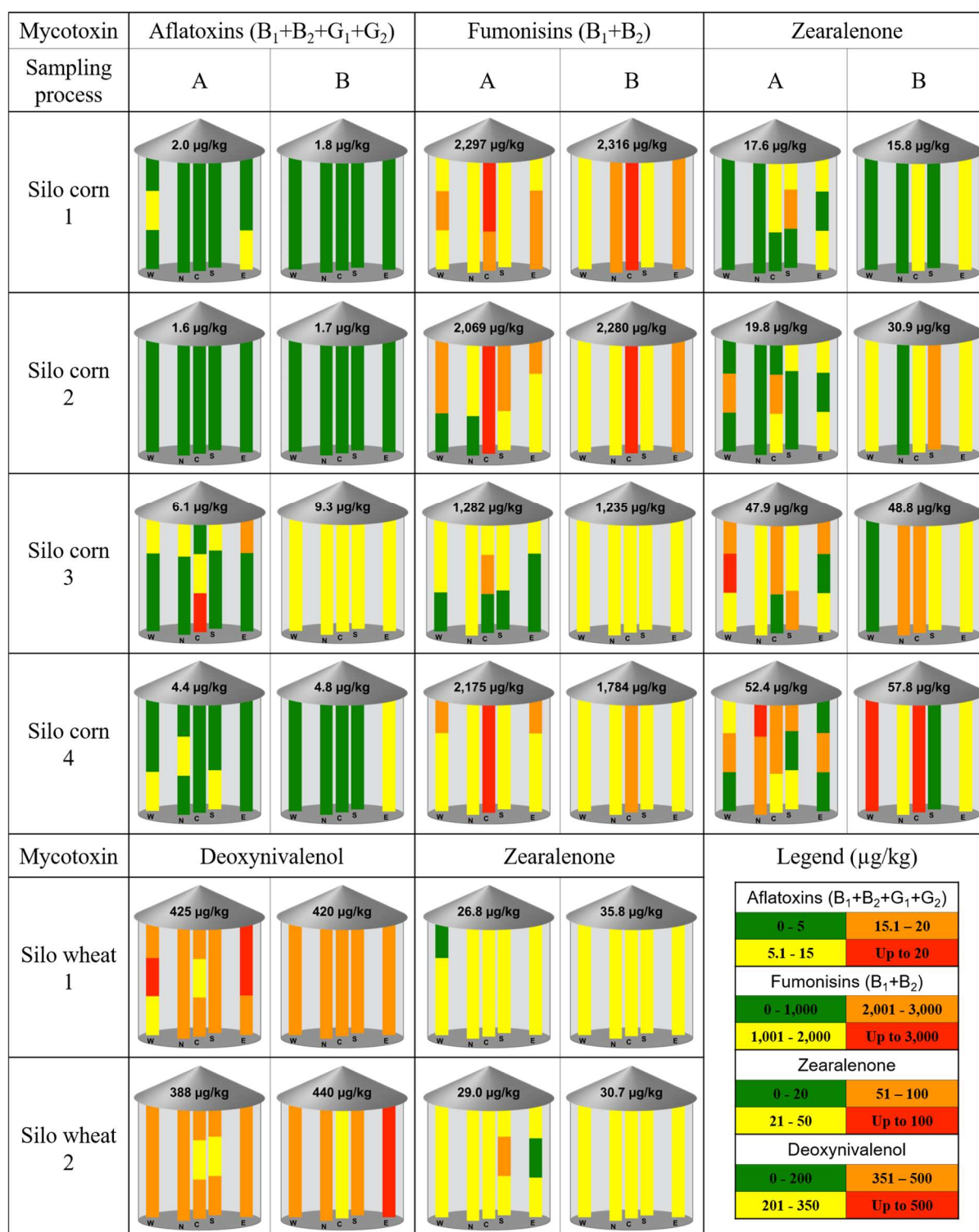


Figure 2 - Mean concentration and concentration ranges of mycotoxins at the sampling points (W=West, N=North, C=Centre, S=South, E=East) in maize and wheat samples stored in silos. Samples were obtained using process A, with the collection of three global samples at each probe introduction point (upper third, middle third and lower third of the silo height), or process B, with the collection of only one global sample at each probe introduction point (full height of the silo).

Whitaker *et al.* (2000) estimated the variability of sampling, sample preparation and analysis associated with the DON test in 24 commercial wheat lots that were intended for

processing. For each batch, 20 kg of wheat was collected and subdivided into 32 samples of 0.454 kg for analysis. The CV associated with the DON wheat test was approximately 13.4% at concentrations of 5,000 µg/kg. Calculation of CVs for the highest and lowest DON concentrations from wheat samples in the two silos with the two sampling processes in the present study using the total variance equation proposed by Whitaker *et al.* (2000) resulted in minimum and maximum CVs of 55.5% and 59.7%, respectively. However, CV values in this study were lower, in the 7.7–23.5% range. Although the samples obtained using process B had a higher CV (22.2%) ($p < 0.05$), this value can be considered low as it was lower than the variability of AF and ZEA found in maize in the present study.

AF in maize, FB in maize and DON in wheat had lower CVs in this study than those in earlier studies by Johansson *et al.* (2000), Whitaker *et al.* (1998) and Whitaker *et al.* (2000), respectively. This can be explained by the different sampling protocols used as well as by the milling of the whole sample prior to subsampling as milling increases the number of particles and improves the dispersion of mycotoxins in the global sample, reducing the error at this step (Miraglia *et al.*, 2005).

In the four maize silos, at least one mycotoxin was present at a higher concentration in samples from the centre of the silo than in those from peripheral samples. This may be explained by the way in which silos are filled from the upper central position, causing the initially deposited grains to be in the centre of the silo. This induces a particle segregation, in which a larger proportion of broken grains and impurities remain at the centre. Several previous studies showed that the segregation of the lighter fraction of maize from the denser fraction concentrates the AF and FB in the lighter fraction, which probably consists of grains that have been damaged by fungi, broken grains and impurities (Huff, 1980; Meinders and Hurburg, 1993; Shetty and Bhat, 1999). According to Pabis *et al.* (1998), the accumulation of fine particles, weed seeds and other foreign materials decreases the efficiency of aeration and increases the activity of fungi and insects, which can lead to the formation of storage hot spots with higher grain deterioration. The use of forced aeration directly influences the maintenance of uniformity of temperature and relative humidity, reducing the growth of fungi. Temperature variations within the grain mass can cause water to transfer from the hotter to the cooler portions of the store, where it can condense and create conditions conducive to fungal growth (Lazzari, 1993).

Variations in mycotoxin concentration in different parts of the silo are better characterised by sampling process A than by process B, because of the higher number of samples collected and the ability to distinguish between points with higher or lower concentrations of mycotoxins. However, to take advantage of this information and segregate the grains by concentration range, it would be necessary to know the discharge pattern of the silo and its variants (Costa *et al.*, 2014; Neto and Nascimento, 2013).

Conclusions

AF, FB and ZEA mean concentration differed between maize silos and DON and ZEA mean concentration did not differ between wheat silos. Mycotoxin analysis performed in maize samples obtained using A and B sampling procedures exhibited the same variability. For wheat samples, process A provided lower variability for DON detection than process B. However, considering the silo as a whole, the two sampling procedures yielded samples that were similarly representative. The A or B sampling processes are both applicable in practice by the industry and may increase confidence in purchasing, sales and grain destination, increasing security in commercial transactions and adding value to stored grain.

Acknowledgements

We would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), for the scholarship to the first author.

References

- Bennett, J.W. and Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G. and Krska, R., 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1062: 209-216.
- Biselli, S., Persin, C. and Syben, M., 2008. Investigation of the distribution of deoxynivalenol and ochratoxin A contamination within a 26 t truckload of wheat kernels. *Mycotoxin Research* 24: 98-104.
- Calori-Domingues, M.A., Almeida, R.R., Tomiwaka, M.M., Gallo, C.R., Gloria, E.M. and Dias, C.T.S., 2007. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 27: 181-185.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), 2015. Instruções para amostragem de grãos. Boletim Técnico: Série Armazenagem. Conab, Brasília, DF, Brazil, 32 pp.
- Costa, C.A., Lopes Neto, J.P., Nascimento, J.W.B., Diniz, M.J. and Silva, V.R., 2014. Propriedades mecânicas e de fluxo de produtos agroindustriais. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 18: 774-780.
- Duffeck, M.R., Tibola, C.S., Guarienti, E.M. and Del Ponte, E.M., 2017. Survey of mycotoxins in Southern Brazilian wheat and evaluation of immunoassay methods. *Scientia Agrícola* 74: 343-348.
- European Commission (EC), 2006. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 70: 12-34.
- European Commission (EC), 2014. Guidance document for the implementation of Commission Regulation No 519/2014 of 16 May. 2014 amending regulation (EC) No 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in food. 2014. Available at: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>.
- Hart, L.P. and Schabenberger, O., 1998. Variability of vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year. *Plant Disease* 82: 625-630.
- Huff, W.E., 1980. A physical method for the segregation of aflatoxin-contaminated corn. *Cereal Chemistry* 57: 236-238.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations, volume 100 F. Working group on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC Press, Lyon, France, pp. 225-248.
- Johansson, A.S., Whitaker, T.B., Hagler Jr, W.M., Giesbrecht, F.G., Young, J.H. and Bowman, D.T., 2000. Testing shelled corn for aflatoxin, Part I: Estimation of variance component. *Journal of AOAC International* 83: 1264-1269.
- Kuiper-Goodman T., Scott, P.M. and Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7: 253-306.
- Kumar, V., Basu, M.S. and Rajendran, T.P., 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection* 27: 891-905.

- LAZZARI F.A., 1993. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Editora do Autor, Curitiba, PR, Brazil, 140 pp.
- Liu, Y., Lu, Y., Wang, L., Chang, F. and Yang, L., 2016. Occurrence of deoxynivalenol in wheat, Hebei Province, China. *Food Chemistry* 197: 1271-1274.
- Lacey, J. (1989). Pre and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 67: 11S-25S.
- Magan, N. and Lacey, J., 1984a. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 82: 71-81.
- Magan, N. and Lacey, J., 1984b. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 82: 83-93.
- Magan, N. and Lacey, J., 1984c. Effects of gas composition and water activity on growth of field and storage fungi and their interactions. *Transactions of the British Mycological Society* 82: 305-314.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V. and Aldred, D., 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* 109: 723-730.
- Magan, N. and Olsen, M. (eds.), 2004. *Mycotoxins in food*. Woodhead Publishing, Cambridge, England, 488 pp.
- Mallmann, A.O., Marchioro, A., Oliveira, M.S., Minetto, L., Wovst, L.R.S., Rauber, R.H., Dilkin, P. and Mallmann, C.A., 2013. Two sampling plans for fumonisins analysis in maize. *Ciência Rural* 43: 551-558.
- Mallmann, C.A., Dilkin, P., Mallmann, A.O., Oliveira, M.S., Adaniya, Z.N.C. and Tonini, C., 2017. Prevalence and levels of deoxynivalenol and zearalenone in commercial barley and wheat grain produced in Southern Brazil: an eight-year (2008 to 2015) summary. *Tropical Plant Pathology* 42: 146-152.
- Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Vinas, I. and Magan, N., 1998. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* 102: 831-837.
- Maziero, M.T. and BERSOT, L.S., 2010. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 12: 89-99.
- Meinders, B.L. and Hurburg Jr., C.R., 1993. Properties of corn screenings. *Transactions of the ASAE* 36: 811-819.
- Miraglia, M., De Santis, B., Minardi, V., Debegnach, F. and Brera, C., 2005. The role of sampling in mycotoxin contamination: an holistic view. *Food Additives and Contaminants: part A* 22: 31-36.
- Moreno, E.C., Garcia, G.T., Ono, M.A., Vizoni E., Kawamura, O., Hirooka, E.Y. and Ono, E.Y.S., 2009. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry* 116: 220-226.
- Neto, J.P.L. and Nascimento, J.W.B., 2013. Características de fluxo e projeto de tremonhas cônicas em silos verticais. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17: 339-345.
- Oliveira, M.S., Rocha, A., Sulyok, M., Krska, R. and Mallmann, C.A., 2017. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control, Part B* 73: 127-132.
- Pabis, S., Jayas, D.S. and Cenkowski, S., 1998. Resistance to Airflow through grains and oilseeds. In: Pabis, S., Jayas, D.S. and Cenkowski, S. (eds.) *Grain Drying: Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, pp. 229-247.

- Shetty, P.F. and Bhat, R.V., 1999. A physical method for segregation of fumonisin contaminated maize. *Food Chemistry* 66: 371-374.
- Siegel, D. and Babuscio, T., 2011. Mycotoxin management in the European cereal trading sector. *Food Control* 22: 1145-1153.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L. and Kizek, R., 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3: 94-99.
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O. and Oswald, I.P., 2012. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed - focus on Europe. *Toxins* 4: 788-809.
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R. and Schuhmacher, R., 2007. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1505-1523.
- Whitaker, T.B., Whitten, M.E. and Monroe, R.J., 1976. Variability associated with testing cottonseed for aflatoxin. *Journal of the American Oil Chemists Society* 53: 502-505.
- Whitaker, T.B., Dickens, J.W., and Monroe, R.J., 1979. Variability associated with testing corn for aflatoxin. *Journal of the American Oil Chemists Society* 56: 789-794.
- Whitaker, T.B., Dowell, F.E., Hagler, W.M., Giesbrecht, F.G. and Wu, J., 1994. Variability associated with sampling, sample preparation, and chemically testing for aflatoxin in farmers' stock peanuts. *Journal of AOAC International* 77: 107-116.
- Whitaker, T.B., Trucksess, M.W., Johansson, A.S., Giesbrecht, F.G., Hangler, W.M. and Bowman, D.T., 1998. Variability associated with testing corn for fumonisin. *Journal of AOAC International* 81: 1162-1168.
- Whitaker, T.B., Hagler Jr, W.M., Giesbrecht, F.G. and Johansson, A.S., 2000. Sampling, sample preparation, and analytical variability associated with testing wheat for deoxynivalenol. *Journal of AOAC International* 83: 1285-1292.
- Whitaker, T.B., Slate, A.B., Doko, M.B., Maestroni, B.M. and Cannavan, A. (eds.), 2011. *Sampling procedures to detect mycotoxins in agricultural commodities*. Springer, New York, USA, 58 pp.
- Zaied, C., Zouaoui, N., Bacha, H. and Abid, S., 2012. Natural occurrence of zearalenone in Tunisian wheat grains. *Food Control* 25: 773-777.

CAPÍTULO 4 - INFLUÊNCIA DA QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Artigo a ser submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

INFLUÊNCIA DA QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA E NUTRICIONAL DE HÍBRIDOS DE MILHO NO CUSTO DA RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Influência da qualidade micotoxicológica e nutricional de híbridos de milho no custo da ração de frangos de corte

Influence of mycotoxicological and nutritional quality of maize hybrids on broiler chickens feed cost

Adriano Olnei Mallmann¹, Carlos Augusto Mallmann¹

¹Laboratório de Análises Micotoxicológicas – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS

RESUMO

Objetivou-se avaliar as variáveis micotoxicológicas e nutricionais de híbridos de milho com diferentes características que influenciam no custo da ração para frangos de corte. Foram avaliados 26 híbridos de milho geneticamente modificados nas safrinhas de 2016 e 2017, com diferentes germoplasmas, textura de endosperma e duração do ciclo. Nos híbridos foram avaliados grãos avariados, fumonisinas (B₁+B₂) (FUM), aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) (AFLA), zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON), umidade, proteína bruta (PB), energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), aminoácidos digestíveis para aves (lisina, metionina, cistina e treonina) e o respectivo custo da ração inicial para frangos de corte calculadas pelo custo mínimo. A prevalência de FUM, AFLA, ZEA e DON foi de 90, 17, 33 e 0%, com médias de 3067, 1, 38 e 0 µg/kg nos dois anos, respectivamente. A média de EMAn e PB foi de 3264 kcal/kg e 8,02%, respectivamente e diferiu (P<0,05) nos dois anos. O custo da ração foi influenciado significativamente (P<0,05) por FUM, PB, EMAn nos dois anos. Híbridos com tecnologia Viptera apresentam menor concentração por FUM e menor custo da ração. Híbridos de ciclo precoce têm menor concentração de FUM, maiores percentuais de PB e aminoácidos digestíveis e menor custo da ração.

Palavras-chave: aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, energia, proteína bruta.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the mycotoxicological and nutritional variables of maize hybrids with different characteristics that influence the broiler chickens feed costs. In 2016 and 2017 winter crops 26 genetically modified hybrids of maize with different germplasm, endosperm texture and cycle duration were evaluated. The analyzed variables were damaged grains, fumonisins (B₁+B₂) (FUM), aflatoxins

(B₁+B₂+G₁+G₂) (AFLA), zearalenone (ZEA), deoxynivalenol (DON), moisture, crude protein (CP), apparent metabolizable energy corrected for nitrogen balance (AMEn), digestible amino acids for poultry (lysine, methionine, cystine and threonine) and the respective cost of the initial feed for broiler chickens calculated at the minimum cost. The prevalence of FUM, AFLA, ZEA and DON was 90, 17, 33 and 0%, with means of 3067, 1, 38 and 0 µg/kg in the two years, respectively. The mean of AMEn and CP was 3264 kcal/kg and 8.02%, respectively, and differed (P<0.05) in the two years. The feed cost was significantly influenced (P<0.05) by FUM, PB, AMEn in two years. Hybrids with Viptera technology show lower concentration per FUM and lower feed cost. Early cycle hybrids have lower concentrations of FUM, higher percentages of CP and digestible amino acids, and lower feed costs.

Keywords: aflatoxins, fumonisins, zearalenone, energy, crude protein.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo, com produção projetada em 1.044 milhões de toneladas na safra de 2017/2018. Esta produção concentra-se principalmente nos EUA, China e Brasil, com 370, 216 e 95 milhões de toneladas colhidas, respectivamente (USDA, 2017). No Brasil, estimativas indicam que 41,5 milhões de toneladas foram utilizadas para fabricação de rações para animais no ano de 2017 (Sindirações, 2017), demonstrando que o milho é o cereal mais utilizado como ingrediente de dietas para animais.

O crescimento fúngico e produção de micotoxinas no milho são influenciados por diversos fatores bióticos e abióticos (Dilkin *et al.*, 2002). O milho brasileiro está frequentemente contaminado com diversas micotoxinas, dentre elas, as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), fumonisinas (B₁ e B₂), zearalenona, deoxinivalenol, entre outras (Oliveira *et al.*, 2017). As micotoxinas afetam os animais de forma individual ou sinérgica na presença de mais de uma micotoxina, podendo afetar vários órgãos, como o trato gastrointestinal, fígado e sistema imunológico, resultando essencialmente na redução da produtividade das aves e na mortalidade em casos extremos (Murugesan *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, houve um vasto desenvolvimento de híbridos de milho geneticamente modificados, aos quais foram inseridos genes de *Bacillus thuringiensis*, que levam à produção de proteínas que são tóxicas a algumas ordens de insetos

consideradas pragas da cultura do milho. Plantas de milho de híbridos com essa tecnologia sofrem menor ataque de insetos, fazendo com que a planta, teoricamente, seja menos vulnerável aos fungos produtores de micotoxinas (Hammond *et al.*, 2004). Em estudo realizado com 36 cultivares de milho, Pinto *et al.* (2007) relataram também efeito de diferentes híbridos na incidência de grãos ardidos e mofados, bem como acentuada interação entre as cultivares e o fungo toxigênico *Fusarium subglutinans* quanto à biossíntese de fumonisina B₁ em grãos de milho. Assim, fica evidenciado que a variabilidade genética dos híbridos de milho e sua relação com a contaminação por micotoxinas é um fator relevante na escolha do material genético mais adequado para cultivo.

Não obstante o aspecto micotoxicológico, o milho é o mais importante componente energético das rações (Moreira *et al.*, 1994), mas que pode apresentar variações na sua composição nutricional, ocasionadas por fatores como potencial genético, nível de adubação utilizado, fertilidade do solo e condições climáticas (Eying *et al.*, 2009). Nesse sentido, a informação mais exata e precisa da matriz nutricional dos alimentos é essencial para a formulação de rações com custo mínimo, redução dos riscos de suprimento de níveis marginais ou em excesso com a finalidade de otimizar a produtividade e maximizar a rentabilidade na produção animal (Silva *et al.*, 2008).

Como consequência desses fatores, a indústria precisa exigir maior qualidade de grãos para evitar a necessidade de uso exagerado de aditivos antimicotoxinas para minimizar os efeitos tóxicos das micotoxinas bem como de óleos e aminoácidos sintéticos para suprir as exigências nutricionais. Considerando que a recomendação de híbridos de milho que atendam a esses requisitos ainda carece de pesquisas, o objetivo deste trabalho foi avaliar as variáveis micotoxicológicas e nutricionais de híbridos de milho com diferentes características que influenciam no custo da ração para frangos de corte.

MATERIAIS E MÉTODOS

Empregou-se 26 híbridos de milho geneticamente modificados, em cultivos extemporâneos (safrinha) (fevereiro a junho) dos anos de 2016 e 2017 em uma área experimental localizada no extremo oeste do estado do Paraná, Brasil (Tab. 1). O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com quatro repetições. As parcelas foram constituídas de seis fileiras de 5 m de comprimento, com espaçamento de

0,45 m e avaliação das quatro fileiras centrais. Após a colheita, foram coletados 1,25 kg de grãos de cada parcela, dos quais 250 g foram separados visualmente em grãos aparentemente saudáveis e avariados (Brasil, 2011). As amostras de 1 kg foram parcialmente secas em estufa de ar forçado a 55 °C por 48 h, moídas empregando peneira de 1 mm e homogeneizadas.

Tabela 1. Caracterização dos híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.

Híbrido	Transgenia	Tipo de híbrido ¹	Ciclo ²	Cor ³	Textura ⁴	Híbrido	Transgenia	Tipo de híbrido	Ciclo	Cor	Textura
1	PW	HT	SP	AM/AL	SMDU	14	PW	HS	P	AM	SMDE
2	PW	HT	SP	AM/AL	SMDU	15	PW	HT	P	AL	SMDU
3	PW	HT	P	AL	SMDU	16	VIPTERA	HSm	P	AM/AL	DURO
4	PW	HS	P	AM/AL	SMDE	17	PRO2	HS	SP	AM/AL	SMDE
5	PW	HS	P	AM/AL	SMDE	18	PRO3	HS	SP	AM/AL	DENT
6	PW	HT	P	AM/AL	SMDU	19	VIPTERA	HD	P	AL	DURO
7	PW	HS	N	AL	SMDU	20	VIPTERA	HS	SP	AL	DURO
8	PRO3	HS	P	AM/AL	SMDE	21	PW	HS	P	AM/AL	SMDU
9	PRO3	HS	SP	AM	SMDE	22	PW	HSm	P	AM/AL	SMDU
10	PRO3	HS	SP	AL	SMDU	23	PRO	HS	P	LR	SMDU
11	PRO3	HS	SP	AL	SMDU	24	HX	HS	SP	AL	SMDU
12	PW	HT	SP	AM/AL	SMDU	25	HX	HS	SP	AV	DURO
13	PW	HT	P	AM/AL	SMDE	26	VIPTERA	HS	P	AL	DURO

¹Tipo de híbrido: HS - híbrido simples; HS_m - híbrido simples modificado; HD - híbrido duplo; HT - híbrido triplo. ²Ciclo: SP - superprecoce; P - precoce; N - normal. ³Cor do Grão: AL - alaranjado; LR - laranja; AV - avermelhado; AM - amarela. ⁴Textura de endosperma: DENT - dentado; SMDE - semidentado; SMDU - semiduro.

Uma fração da amostra foi submetida à extração das aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) (AFLA), fumonisinas (B₁+B₂) (FUM), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) em solução de ACN e H₂O agitada por 20 min a 2.500 rpm em multivórtex. Uma alíquota do extrato foi injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência 1200 Series Infinity (Agilent, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS/MS) 5500 QTRAP (Applied Biosystems, EUA). As análises foram efetuadas seguindo-se os parâmetros propostos por Sulyok *et al.* (2007), Mallmann *et al.* (2013) e Berthiller *et al.* (2005), para AFLA, FUM e ZEA/DON, respectivamente.

A determinação dos valores de energia metabolizável aparente para aves corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), proteína bruta (PB), umidade e os aminoácidos lisina (LisD), metionina (MetD), cistina (CisD) e treonina (TreD) digestíveis para aves foram realizadas pelo método de Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIRS), efetuadas pelo Laboratório CEAN Adisseo Brasil e Adisseo France S.A.S. (Adisseo, 2017). O espectrômetro NIRS XDS (Foss, Dinamarca) utilizado foi calibrado com equações de predição baseadas em análises de aminoácidos, ácido fítico e conteúdo total de fósforo

por cromatografia líquida de alta eficiência e em métodos *in vivo* para determinar a digestibilidade de aminoácidos e EMAn.

Todas as variáveis foram ajustadas para 87% de matéria seca para o cálculo do custo de rações para frangos de corte na fase inicial (10^o ao 21^o dia de idade) (R\$/t ração) utilizando a planilha PPRF (UNESP, Brasil) de formulação não linear (ração de custo mínimo). As exigências nutricionais seguiram as recomendações de Rostagno *et al.* (2011) e os padrões da agroindústria e os custos dos insumos foram os praticados no mercado regional do oeste do estado do Paraná em julho de 2017 (Tab. 2). A dose de inclusão de Aditivo Antimicotoxinas (AAM) foi calculada proporcionalmente ao nível de concentração micotoxicológica de cada híbrido após o ajuste das FUM para fumonisinas totais, que são a soma das fumonisinas livres (FUM) e as fumonisinas ocultas, conforme a equação proposta por Oliveira *et al.* (2014): fumonisinas totais (mg/kg) = $(0,8583+0,5615 \cdot FUM)^2$. Em seguida, a dose de AAM foi calculada na proporção de 2,5 kg de AAM/t de ração para cada 10.000 µg/kg de fumonisinas totais acrescida da proporção de 2,5 kg de AAM/t de ração para cada 28 µg/kg de AFLA.

Tabela 2. Exigências nutricionais e custos dos insumos utilizados para o cálculo de custo de rações para frangos de corte na fase inicial (10^o ao 21^o dia de idade).

Exigências nutricionais	Quantidade	Custo dos ingredientes	R\$/kg
Energia metabolizável aves (corr. balanço de N) (kcal/kg)	3100	Milho	0,30
Proteína bruta (%)	21,20	Farelo de soja 46%	0,98
Metionina digestível aves (%)	0,5541	Farinha de carne e ossos 45%	0,77
Metionina + cistina digestível aves (%)	0,8590	Óleo de soja	2,27
Lisina digestível aves (%)	1,1940	DL Hidroxi-Metionina 88%	6,71
Treonina digestível aves (%)	0,7760	L Lisina HCL 64,1%	2,55
Cálcio total (%)	0,83	L Treonina 98,5%	6,60
Fósforo disponível (%)	0,38	Calcário calcítico	0,06
Sódio (%)	0,22	Fosfato bicálcico	1,30
Premix vitamínico mineral (%)	0,20	Sal Comum	0,33
		Premix vitamínico mineral	10,43
		Aditivo antimicotoxinas	7,35

Todas as variáveis foram submetidas a análise de variância e verificação do efeito de blocos. Utilizou-se o teste de Scott-Knott (variáveis paramétricas) para agrupar os híbridos com características semelhantes ou o teste de Kruskal-Wallis (variáveis não-paramétricas) por ano de cultivo. Utilizou-se o teste-F (variáveis paramétricas) ou o teste de Mann-Whitney (variáveis não-paramétricas) para verificação do efeito de ano. As variáveis foram submetidas à análise de regressão simples e análise de regressão múltipla pelo procedimento Stepwise para gerar o modelo de predição do custo da ração. Utilizou-

se o nível de significância de 5% para todas as análises. Realizou-se uma Análise dos Componentes Principais (PCA). Os dados foram analisados no programa estatístico Statgraphics Centurion XV, versão 15.2.11 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise dos grãos avariados, apesar do percentual ter sido maior ($P < 0,05$) no ano de 2016 em relação à 2017, apenas três híbridos tiveram média superior ao limite de classificação para o milho tipo 1 que é de 6% (Brasil, 2011). Em 2016, a distribuição dos híbridos foi em três grupos e em 2017 em dois grupos. Os índices médios variaram entre 1,2 a 10,9% nos dois anos de avaliação, demonstrando que a variabilidade nos percentuais de grãos avariados foi influenciada ($P < 0,05$) por híbrido e por ano de cultivo (Tab. 3).

Tabela 3. Médias de grãos avariados (AV), fumonisinas (B_1+B_2) (FUM), aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) (AFLA), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.

Híbrido	AV (%)			FUM ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			AFLA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			ZEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	2016	2017	P	2016	2017	P	2016	2017	P	2016	2017	P	2016	2017	P
1	2,48c	4,50a	0,039	14833a	1198a	0,006	0	4,9	0,131	5	275a	0,018	0	0	-
2	2,13c	2,33b	0,794	5195c	1402a	0,017	0	0,0	-	0	7b	0,248	0	0	-
3	1,87c	1,93b	0,816	2560c	184b	0,017	0	0,0	-	0	142a	0,037	0	0	-
4	4,87c	2,33b	0,079	3289c	933a	0,167	0	0,0	-	0	55b	0,121	0	0	-
5	3,58c	3,83a	0,879	2400c	334b	0,001	0	3,3	0,248	0	43b	0,078	0	0	-
6	4,37c	1,33b	0,073	2262c	333b	0,031	0	0,0	-	0	8b	0,317	0	0	-
7	10,9a	3,50a	0,081	8380b	1802a	0,004	0	11,8	0,121	0	266a	0,037	0	0	-
8	2,90c	3,00a	0,374	3432c	1093a	0,035	0	0,0	-	0	0b	-	0	0	-
9	7,67b	2,17b	0,045	2318c	776b	0,064	0	0,0	-	18	0b	0,317	0	0	-
10	2,93c	3,83a	0,554	9210b	958a	0,026	0	5,2	0,121	7	354a	0,246	0	0	-
11	3,15c	1,17b	0,008	5840c	52b	0,000	0	0,0	-	0	28b	0,248	0	0	-
12	4,70c	1,83b	0,062	7383b	214b	0,004	0	0,0	-	17	40b	0,487	0	0	-
13	2,58c	1,50b	0,422	2553c	612b	0,045	0	0,0	-	0	17b	0,131	0	0	-
14	3,03c	2,67b	0,787	6690c	902a	0,247	0	0,4	0,248	7	86a	0,067	0	0	-
15	3,47c	2,50b	0,076	5406c	236b	0,019	0	22,9	0,186	0	43b	0,079	0	0	-
16	4,00c	1,83b	0,211	2542c	295b	0,021	0	0,0	-	0	58a	0,037	0	0	-
17	5,43c	3,67a	0,125	11798a	916a	0,015	0	0,0	-	10	33b	0,266	0	0	-
18	3,70c	1,83b	0,437	5600c	344b	0,000	0	2,1	0,414	0	21b	0,414	0	0	-
19	4,40c	3,33a	0,398	3448c	281b	0,001	0	0,0	-	0	164a	0,037	0	0	-
20	1,90c	2,00b	0,872	4525c	231b	0,005	0	0,0	-	0	56b	0,078	0	0	-
21	3,23c	1,67b	0,076	4405c	1544a	0,165	0	0,0	-	0	10b	0,317	0	0	-
22	3,60c	2,50b	0,596	4044c	741b	0,292	0	0,0	-	0	26b	0,317	0	0	-
23	7,37b	2,00b	0,036	4024c	650b	0,146	0	0,0	-	0	25b	0,317	0	0	-
24	1,75c	2,00b	0,841	5023c	1402a	0,128	0	0,0	-	0	54b	0,078	0	0	-
25	3,77c	2,17b	0,038	11080a	1767a	0,003	0	0,9	0,317	0	19b	0,317	0	0	-
26	3,27c	1,63b	0,247	1632c	443b	0,003	0	0,6	0,186	0	83b	0,186	0	0	-
Ano	2016	2017	Média	2016	2017	Média	2016	2017	Média	2016	2017	Média	2016	2017	Média
Média	4,0A	2,4B	3,2	5380A	755B	3067	0,0B	2,0A	1,0	2B	74A	38	0	0	0
Mín	1,8	1,2	1,2	1632	52	52	0,0	0,0	0,0	0	0	0	0	0	0
Máx	10,9	4,5	10,9	14833	1802	14833	0,0	22,9	22,9	18	354	354	0	0	0
CV ¹	51,4	36,0	54,3	61,8	68,8	108,1	0,0	250,2	364,6	212,2	125,9	195,2			

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença entre os anos pelo teste-F a 5% de significância para AV e FUM e pelo teste de Mann-Whitney a 5% de significância para AFLA e ZEA. ¹CV: coeficiente de variação (%).

Na análise das FUM, a distribuição dos híbridos se deu em três grupos no ano de 2016 e em apenas dois grupos no ano de 2017. As FUM foram detectadas em 90% das amostras e houve interação ($P < 0,05$) entre os anos de avaliação, em que 19 dos 26 híbridos avaliados tiveram média de concentração maior ($P < 0,05$) no ano 2016 em relação à 2017, o que demonstra a variabilidade das FUM nos híbridos em função do ano (Tab. 3). Prevalência, variabilidade e média de concentração por FUM semelhante foi relatada por Camargos *et al.* (2000) que compararam 19 híbridos de milho cultivados em campos experimentais em três locais no estado de São Paulo, Brasil, durante a safra 1997/1998 e constataram que todas as amostras estavam contaminadas com FUM, com média de 7470 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (2080-34290 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A concentração de FUM nos híbridos associada à textura dos grãos, não apresentou interação ($P > 0,05$), que é uma característica dos híbridos que vem sendo discutida com relação à susceptibilidade a infestação fúngica (Tab. 4). No entanto, dos cinco híbridos com textura dura, quatro são da tecnologia de transgenia Viptera, os quais tiveram menores ($P < 0,05$) concentrações de FUM. Quanto mais macia a textura do grão, maior a suscetibilidade a incidências de doenças e infestação por insetos que podem causar injúrias aos grãos e conseqüentemente favorecer a colonização de fungos (Ono *et al.*, 2000; Buerstmayr *et al.*, 2003; Bútron *et al.*, 2009). Ao avaliar 20 variedades crioulas de milho da região Sul do Brasil, Oliveira *et al.* (2009), constataram que, quanto maior a proporção de endosperma vítreo, que é mais denso em relação ao farináceo, maior a força necessária até a ruptura do grão e menor a contaminação por *Fusarium* sp. No entanto, no mesmo estudo, os autores não observaram correlação com a concentração de ZEA, que foi detectada em 75% das amostras (50-640 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Quanto às classificações dos híbridos por ciclo e tipo, híbridos de ciclo precoce tiveram menores ($P < 0,05$) concentrações de FUM e não foi observada interação ($P > 0,05$) com o tipo de híbrido (Tab. 4).

As AFLA não foram detectadas nas amostras do ano de 2016, mas em 2017 foram detectadas em 17% das amostras (Tab. 3). Essa prevalência foi similar à encontrada por Oliveira *et al.* (2017), que relataram uma prevalência de 19% em amostras de milho da região Sul do Brasil. As AFLA são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e consideradas micotoxinas de grãos armazenados, pois requerem menor atividade de água do que os fungos do gênero *Fusarium* (Marin *et al.*, 1998), que são produtores de FUM e

ZEA, consideradas micotoxinas de campo e que neste estudo estiveram mais prevalentes. Provavelmente neste estudo não tenha havido tempo e/ou condições adequadas após a colheita para o desenvolvimento e produção de AFLA. As variações nas concentrações de AFLA em diferentes híbridos de milho podem estar relacionadas às concentrações de ácido linoleico e da enzima lipoxigenase (Zeringue *et al.*, 1996). Segundo os autores, a lipoxigenação do ácido linoleico seria capaz de produzir aldeídos voláteis com cadeias de 6 até 12 carbonos, inibindo ou impedindo o crescimento de fungos e a formação de AFLA.

Tabela 4. Médias de grãos avariados (AV), fumonisinas (B₁+B₂) (FUM), aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) (AFLA), zearalenona (ZEA), energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), proteína bruta (PB), aminoácidos digestíveis para aves e custo da ração inicial para frangos de corte (R\$/t ração) por textura do grão, tecnologia de transgenia, tipo de híbrido e ciclo de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.

Textura	AV (%)	FUM (µg/kg)	AFLA (µg/kg)	ZEA (µg/kg)	EMAn (kcal/kg)	PB (%)	LisD (%) ¹	MetD (%) ²	CisD (%) ³	TreD (%) ⁴	R\$/t ração
Dentado	2,58	2447	1,3	13	3273	8,37ab	0,200ab	0,159ab	0,151ab	0,286ab	673,83
Semidentado	3,49	2940	0,2	18	3256	7,99ab	0,194b	0,159b	0,145b	0,271b	680,28
Semiduro	3,16	3573	1,9	50	3268	7,93b	0,192b	0,158b	0,146b	0,270b	684,35
Duro	2,76	2615	0,2	38	3259	8,18a	0,201a	0,163a	0,150a	0,280a	676,49
P-Textura	0,533	0,436	0,547*	0,803*	0,276	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,069
P-Ano	<0,001	<0,001			<0,001	0,025	<0,001	<0,001	0,620	<0,001	<0,001
Tecnologia											
HX	2,37	4834ab	0,2	17	3281	7,91b	0,200	0,160ab	0,148ab	0,267b	685,17ab
PRO	4,68	2337ab	0,0	127	3292	8,14ab	0,193	0,159ab	0,147ab	0,276ab	670,28b
PRO2	4,67	7134a	0,0	20	3239	7,80b	0,194	0,154b	0,144ab	0,263b	700,86a
PRO3	3,22	2970b	0,7	43	3278	8,05ab	0,196	0,16ab	0,148ab	0,274ab	677,99b
PW	3,16	3177b	1,8	41	3259	7,94b	0,192	0,159b	0,145b	0,270b	683,40ab
VIPTERA	2,72	1737b	0,1	45	3250	8,27a	0,200	0,163a	0,150a	0,285a	674,18b
P-Tecnologia	0,073	0,002	0,914*	0,461*	<0,001	0,001	0,009	<0,001	0,003	<0,001	<0,001
P-Ano	<0,001	<0,001			<0,001	0,020	<0,001	<0,001	0,575	<0,001	<0,001
Tipo de híbrido											
Simples	3,37	3358	0,7	36	3266	7,93b	0,194	0,159b	0,147b	0,269b	683,02
Simples mod. ⁵	2,98	1905	0,0	21	3251	8,40a	0,202	0,165a	0,151a	0,292a	671,43
Duplo	3,87	1864	0,0	82	3265	8,48a	0,204	0,166a	0,149ab	0,289a	667,67
Triplo	2,67	3286	2,3	42	3261	8,01b	0,193	0,159b	0,146b	0,273b	682,18
P-Tipo	0,239	0,372	0,599*	0,433*	0,286	<0,001	0,007	<0,001	0,022	<0,001	0,013
P-Ano	<0,001	<0,001			<0,001	0,017	<0,001	<0,001	0,544	0,001	<0,001
Ciclo											
Superprecoce	3,04b	4431a	0,6	43	3268	7,95b	0,194a	0,158b	0,147a	0,269b	686,33b
Precoce	2,98b	2053b	1,2	27	3260	8,09a	0,196a	0,161a	0,148a	0,277a	675,91c
Normal	7,20a	5091a	5,9	133	3264	7,45c	0,178b	0,153c	0,138b	0,248c	704,66a
P-Ciclo	<0,001	<0,001	0,051*	0,446*	0,122	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P-Ano	<0,001	<0,001			0,000	0,019	<0,001	<0,001	0,538	0,001	<0,001
CV ⁶ (%)	68,6	122,9	661,0	261,6	1,7	4,8	6,5	3,6	4,0	6,0	3,9

Médias seguidas de letras distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ¹LisD: lisina digestível para aves. ²MetD: metionina digestível para aves. ³CisD: cistina digestível para aves. ⁴TreD: treonina digestível para aves. *Valor do P para o teste de Kruskal-Wallis. ⁵Simples mod.: simples modificado. ⁶CV: coeficiente de variação.

Em 2016 somente 8% das amostras apresentaram contaminações por ZEA, enquanto que em 2017 essa toxina foi detectada em 59% das amostras. Houve diferença de concentração em apenas 5 híbridos nos dois anos ($P < 0,05$) sendo que a maior concentração média ($P < 0,05$) ocorreu na safrinha de 2017 (Tab. 3). Essas variações são descritas na literatura, em Oliveira *et al.* (2017), que diagnosticaram prevalência de ZEA de 74%, e em De Souza *et al.* (2013), que verificaram apenas 12% de prevalência dessa micotoxina.

Não foi detectado DON ($\geq 200 \mu\text{g}/\text{kg}$) nas amostras de milho cultivados nos dois anos. Esses dados diferenciam da prevalência de 33% constatada por Oliveira *et al.* (2017), porém mais próxima dos 4% encontrados por De Souza *et al.* (2013) ao avaliar 74 amostras de milho coletadas de uma integradora de frangos localizada no Paraná.

Grãos que sofreram danos por fungos, fragmentos de grãos e impurezas podem ter maior concentração de micotoxinas que grãos aparentemente sadios (Shetty e Bhat, 1999). No entanto, neste estudo observou-se fraca correlação linear no ano de 2017 entre grãos avariados e FUM ($P \leq 0,028$ e $R^2 = 0,06$) e grãos avariados e ZEA ($P < 0,001$ e $R^2 = 0,16$) e moderada correlação de postos de Spearman entre grãos avariados e AFLA ($P < 0,001$ e $R = 0,42$).

Não houve agrupamento dos híbridos para EMAn no ano de 2016 e, em 2017, os híbridos distribuíram-se em três grupos distintos ($P < 0,05$). Dos 26 híbridos avaliados, 21 tiveram média de EMAn maior ($P < 0,05$) na safrinha do ano 2017 em relação a 2016. A EMAn média nos dois anos foi de 3264 kcal/kg, apresentando interação ($P < 0,05$) entre os anos (Tab. 5). Rostagno *et al.* (2011) apontam o valor médio de 3.381 kcal/kg para o milho, o qual foi semelhante ao grupo de híbridos com maior EMAn no ano de 2017 neste estudo. Vieira *et al.* (2007) ao avaliarem 45 híbridos, constataram EMAn média de 3251 kcal/kg, muito semelhante a este estudo, porém com maior amplitude de variação (506 kcal/kg).

Os resultados de PB dos híbridos de milho distribuíram-se em três grupos em 2016 e quatro grupos em 2017 (Tab. 5). Somente três híbridos tiveram média de PB maior ($P < 0,05$) na safrinha do ano 2017 em relação a 2016. Contudo, a média de concentração do ano de 2017 foi maior ($P < 0,05$). Valor médio superior (8,61%) foi encontrado por Piovesan *et al.* (2010) em trabalho com 45 amostras de grãos de milho na região do oeste do Paraná. Valores inferiores (7,17%) e variação maior (5,82-8,80%) foram reportados

por Vieira *et al.* (2007) em estudo com 45 híbridos, demonstrando que a PB sofre influência de híbrido, safra e região de cultivo. No presente estudo, a PB teve fraca correlação negativa com EMAn ($R^2=0,15$ e $P<0,001$) em 2016 e também em 2017.

Tabela 5. Médias de energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), proteína bruta (PB), aminoácidos digestíveis para aves e custo da ração inicial para frangos de corte (R\$/t ração) de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.

H ¹	EMAn (kcal/kg)		PB (%)		LisD ² (%)		MetD ³ (%)		CisD ⁴ (%)		TreD ⁵ (%)		Ração (R\$/t)	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
1	3236aA	3317bB	7,72b	7,73c	0,191bA	0,180bB	0,151bB	0,157bA	0,141b	0,145b	0,261c	0,254b	720,13aA	667,13bB
2	3227aB	3313bA	8,12a	7,84c	0,198bA	0,183bB	0,161aA	0,159bB	0,143b	0,143b	0,284aA	0,259bB	703,00aA	663,11bB
3	3235aB	3263cA	7,73bB	8,08bA	0,194b	0,193a	0,157b	0,160b	0,140bB	0,150aA	0,271b	0,276a	688,61bA	666,96bB
4	3213aB	3313bA	8,14aB	8,46aA	0,200b	0,193a	0,160a	0,159b	0,140bB	0,150aA	0,284a	0,276a	693,72bA	651,90cB
5	3168aB	3292cA	7,99a	8,20b	0,207a	0,189a	0,153bB	0,160bA	0,148a	0,146a	0,273b	0,273a	698,61bA	661,68bB
6	3219aB	3296cA	7,96b	8,32b	0,201b	0,194a	0,161a	0,167a	0,147a	0,150a	0,281a	0,281a	686,97bA	655,64cB
7	3230a	3297c	7,42c	7,49d	0,180b	0,176b	0,15b	0,156b	0,137b	0,140b	0,244c	0,253b	726,05aA	683,26aB
8	3215a	3316b	8,14a	8,64a	0,206a	0,196a	0,155b	0,166a	0,149a	0,149a	0,281a	0,285a	692,44b	648,48c
9	3264a	3321b	7,93b	7,49d	0,193b	0,176b	0,160a	0,160b	0,140b	0,140b	0,270b	0,249b	677,55bA	664,66bB
10	3216aB	3350aA	7,81b	7,75c	0,212aA	0,179bB	0,157b	0,163a	0,157a	0,149a	0,277a	0,252b	721,26aA	658,65bB
11	3235aB	3333bA	7,88b	8,32b	0,205a	0,193a	0,154b	0,163a	0,147a	0,150a	0,276b	0,276a	710,86aA	645,96cB
12	3204aB	3272cA	8,12aB	8,48aA	0,201bA	0,190aB	0,157b	0,160b	0,147a	0,150a	0,281a	0,283a	716,58aA	659,15bB
13	3235aB	3287cA	7,91b	8,10b	0,198b	0,192a	0,160a	0,165a	0,145b	0,150a	0,278a	0,272a	686,14bA	662,33bB
14	3223a	3312b	7,60c	7,79c	0,194b	0,183b	0,156b	0,159b	0,146a	0,143b	0,265b	0,256b	704,72a	662,96b
15	3205aB	3319bA	7,90b	8,20b	0,203a	0,192a	0,155b	0,162b	0,145b	0,147a	0,273b	0,271a	708,76a	663,06b
16	3203aB	3281cA	8,47a	8,63a	0,213a	0,197a	0,162a	0,167a	0,152a	0,151a	0,301a	0,301a	684,2bA	654,05cB
17	3198aB	3295cA	7,64c	8,00b	0,200b	0,186a	0,152b	0,156b	0,144b	0,143b	0,268b	0,256b	728,77aA	663,64bB
18	3203aB	3320a	8,23a	8,46a	0,209a	0,194a	0,153b	0,164a	0,153a	0,150a	0,290a	0,284a	710,57aA	649,34cB
19	3227aB	3304cA	8,35a	8,59a	0,212a	0,196a	0,162aB	0,169aA	0,148a	0,150a	0,293a	0,286a	685,76bA	649,59cB
20	3196aB	3303cA	8,07a	7,88c	0,197b	0,187a	0,154b	0,160b	0,149a	0,150a	0,278aA	0,263bB	706,54aA	660,62bB
21	3223aA	3346aB	7,38c	7,23d	0,192bA	0,173bB	0,155b	0,160b	0,141b	0,143b	0,259c	0,243b	712,20aA	665,54bB
22	3202a	3318b	8,33a	8,18b	0,214a	0,183b	0,163a	0,166a	0,153a	0,150a	0,292a	0,276a	693,01b	654,47c
23	3233a	3351a	8,19a	8,08b	0,203a	0,183b	0,159a	0,159b	0,149a	0,146a	0,284a	0,269a	692,24bA	648,33cB
24	3228a	3318b	7,94b	8,11b	0,200b	0,190a	0,154b	0,160b	0,147a	0,146a	0,273b	0,266b	703,26aA	658,46bB
25	3235a	3361a	7,76b	7,80c	0,214a	0,196a	0,163a	0,166a	0,149a	0,150a	0,271b	0,256b	718,23aA	654,72cB
26	3174a	3308b	8,08a	8,16b	0,208a	0,192a	0,163a	0,167a	0,156a	0,147a	0,292a	0,269a	691,22bA	656,57cB
Média	3217B	3312A	7,95B	8,08A	0,202A	0,188B	0,157B	0,162A	0,147	0,147	0,277A	0,269B	702,36A	658,86B
Min	3168	3263	7,38	7,23	0,180	0,173	0,150	0,156	0,137	0,14	0,244	0,243	677,55	645,96
Máx	3264	3361	8,47	8,64	0,214	0,197	0,163	0,169	0,157	0,151	0,301	0,301	728,77	683,26
CV ⁶	0,6	0,7	3,4	4,6	4,1	3,7	2,5	2,3	3,5	2,3	4,4	5,2	2,0	1,2

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença entre os anos pelo teste-F a 5% de significância. ¹H: híbrido. ²LisD: lisina digestível para aves. ³MetD: metionina digestível para aves. ⁴CisD: cistina digestível para aves. ⁵TreD: treonina digestível para aves. ⁶CV: coeficiente de variação (%).

Os níveis de LisD, MetD, CisD e TreD nos diferentes híbridos distribuíram-se em dois grupos nas safrinhas de 2016 e 2017, com exceção da TreD que em 2016 se distribuiu em três grupos (Tab. 5). Na média geral por ano, percebeu-se que LisD e TreD foram maiores ($P<0,05$) em 2016. MetD teve maior ($P<0,05$) concentração em 2017 e CisD não teve efeito de ano de cultivo.

Verificou-se que híbridos com grãos duros tiveram maior ($P<0,05$) PB e aminoácidos digestíveis (Tab. 4). Dos cinco híbridos com textura dura, quatro são da tecnologia de transgenia Viptera, os quais tiveram maiores ($P<0,05$) concentrações de PB, MetD, CisD, TreD e menor custo da ração ($P<0,05$). Quanto ao tipo, constatou-se que híbridos simples modificado e duplo tiveram maiores ($P<0,05$) percentuais de PB, MetD, CisD e TreD. Quanto ao ciclo, o precoce teve maiores ($P<0,05$) percentuais de PB, LisD, MetD, CisD, TreD e menor ($P<0,05$) custo da ração.

O custo da ração foi maior ($P<0,05$) no ano de 2016, em que os híbridos se distribuíram em dois grupos. Em 2017 houveram três grupos e a média de custo dos dois anos foi de R\$ 680,60 por tonelada (Tab. 5). O custo da ração ajustou-se aos modelos de regressão linear múltipla, no qual as variáveis FUM, EMAn e PB apresentaram interação ($P<0,05$) no ano de 2016 e na avaliação conjunta dos dois anos e FUM, EMAn, PB e grãos avariados apresentaram interação em 2017 (Tab. 6).

Tabela 6. Modelos de regressão linear múltipla para o custo da ração inicial para frangos de corte (R\$/t ração) calculados com 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017.

Ano	Equação	R ² ajustado	% do R ² ajustado			
			EMAn	PB	FUM	AV
2016	Custo = 1651,83-17,12*PB-0,26*EMAn+0,0029*FUM	0,76	18,9	9,7	71,4	NS
2017	Custo = 1634,85-17,34*PB-0,25*EMAn+0,0031*FUM+1,12*AV	0,74	61,0	29,4	7,9	1,7
2016 e 2017	Custo = 1729,68-18,35*PB-0,28*EMAn+0,0030*FUM	0,92	69,5	24,2	6,3	NS

EMAn: energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio. PB: proteína bruta. FUM: fumonisinas (B₁+B₂). AV: grãos avariados.

As dietas comumente utilizadas na avicultura de corte têm o milho como principal ingrediente e fonte de energia (Moreira *et al.*, 1994), porém, constatou-se neste estudo que além da EMAn, as FUM e PB também tiveram efeito significativo no custo da ração, inclusive com variações de uma safra para outra. Em 2016, o custo da ração foi fortemente influenciado pela concentração de FUM, pois quanto maior a concentração no milho, maior a inclusão de AAM e, conseqüentemente, maior o custo da ração. No entanto, em 2017, quando a concentração por FUM foi menor, a EMAn teve maior influência no modelo.

Realizou-se um PCA para cada ano com as variáveis FUM, grãos avariados, EMAn, PB, LisD, MetD, TreD, CisD e custo da ração, em que dois componentes principais (PCs) foram observados: PC1 e PC2 (Fig. 1). Em 2016, o PC1 e PC2

contribuíram com 50% e 21%, respectivamente, explicando 71% da variação total dos dados. Em 2017, o PC1 e PC2 contribuíram com 57% e 17%, respectivamente, explicando 74% da variação total. Nos dois anos de experimento houve cinco híbridos com textura dura dos quais quatro, com tecnologia Viptera formaram um grupo, que se correlacionaram negativamente ao custo da ração e de FUM. Além disso, é possível observar que, quanto menor o percentual de PB e aminoácidos digestíveis, maior é o custo da ração e maior é a concentração de FUM.

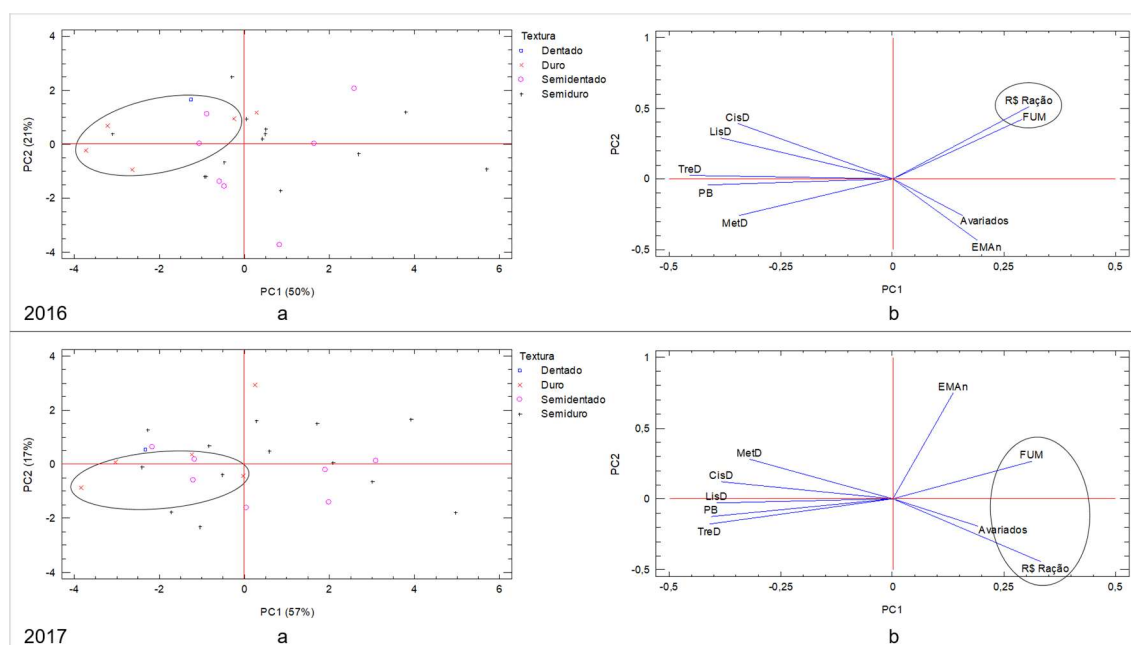


Figura 1. Gráfico dos *scores* (a), por tipo de textura de grão, e *loadings* (b) para amostras de 26 híbridos de milho cultivados nas safrinhas de 2016 e 2017 analisadas para PCA. Correlação entre grãos avariados, fumonisinas (B_1+B_2) (FUM), energia metabolizável aparente corrigida para balanço de nitrogênio (EMAn), proteína bruta (PB), aminoácidos digestíveis para aves (LisD, MetD, CisD e TreD) e custo da ração inicial para frangos de corte (R\$ ração).

Mesmo que não tenha havido efeito significativo dos aminoácidos digestíveis sobre o custo da ração no modelo de regressão linear múltipla, na PCA é possível visualizar correlação positiva entre PB e aminoácidos digestíveis e correlação negativa entre PB+aminoácidos digestíveis e custo da ração+FUM (Figura 1).

CONCLUSÃO

A composição micotoxicológica e nutricional é influenciada pelos diferentes híbridos e também pelo ano de cultivo e por isso deve ser constantemente monitorada para a produção de rações. A correlação entre grãos avariados e micotoxinas é de fraca magnitude, evidenciando a necessidade de análises laboratoriais para quantificação da concentração de micotoxinas. Altas concentrações de micotoxinas influenciam negativamente no custo da ração, pois requerem a inclusão de aditivos antimicotoxinas. Híbridos com tecnologia Viptera apresentam menor concentração de FUM, maiores percentuais de PB, MetD, CisD e TreD e, conseqüentemente, produzem ração de custo mais baixo. Híbridos simples modificado e duplo têm maiores percentuais de PB, MetD, CisD e TreD e híbridos de ciclo precoce tem menor concentração de FUM, maiores percentuais de PB, LisD, MetD, CisD, TreD e produzem ração de menor custo.

REFERÊNCIAS

- ADISSEO. PNE: Precise Nutrition Evaluation Service. Adisseo France S.A.S., Antony, France. 2017. Disponível em: <<https://pne.adisseo.com>>. Acessado em: 25 jun. 2017.
- BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; BUTTINGER, G.; KRŠKA, R. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v.1062, p.209-216, 2005.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011. Estabelece o regulamento técnico do milho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n.246, 23 dez. 2011. Seção 1, p.3-5.
- BUERSTMAYR, H.; STEINER, B.; HARTL, L. *et al.* Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor. Appl. Genet.*, v.107, p.503-508, 2003.
- BÚTRON, A, REVILLA, P, ORDÁS, A, MALVAR, R.A. Resistance to reduce corn borer damage in maize for bread, in Spain. *Crop Prot.*, v.28, p.1-5, 2009.
- CAMARGOS, S.M; SOARES, L.M.V; SAWAZAKI, E. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. *Braz. J. Microbiol.*, v.31, p.226-229, 2000.

- DE SOUZA, M.D.L.M.; SULYOK, M. *et al.* Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *ScientificWorldJournal*, v.2013, p.1-9, 2013.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; ALMEIDA, C.A.A. *et al.* Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. *Braz. J. Microbiol.*, v.33, p.111-118, 2002.
- EYNG, C.; NUNES, R.V.; POZZA, P.C. *et al.* Composição química e valores energéticos de cultivares de milho para aves. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, n.1, p.60-72, 2009.
- HAMMOND, B.G.; CAMPBELL, K.W.; PILCHER, C.D. *et al.* Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grow in the United States in 2000-2002. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.1390-1397, 2004.
- MALLMANN, A.O.; MARCHIORO, A.; OLIVEIRA, M.S. *et al.* Two sampling plans for fumonisins analysis in maize. *Cienc. Rural*, v.43, p.551-558, 2013.
- MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. *et al.* Environmental factors, *in vitro* interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycol. Res.*, v.102, p.831-837, 1998.
- MOREIRA, I.; ROSTAGNO, H.S.; COELHO, D.T. *et al.* Determinação dos coeficientes de digestibilidade, valores energéticos e índices de controle de qualidade do milho e soja integral processados a calor. *R. Soc. Bras. Zootec.*, v.23, p.916-929, 1994.
- MURUGESAN, G.R.; LEDOUX, D.R.; NAEHRER, K. *et al.* Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poult. Sci.*, v.94, p.1298-1315, 2015.
- OLIVEIRA, M.S.; DIEL, A.C.L.; RAUBER, R.H. *et al.* Free and hidden fumonisins in Brazilian raw maize samples. *Food Control*, v.53, p.217-221, 2015.
- OLIVEIRA, M.S.; ROCHA, A.; SULYOK, M. *et al.* Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control*, v.73, part B, p.127-132, 2017.
- OLIVEIRA, T.R.; JACCOUD-FILHO, D.S.; HENNEBERG, L. Maize (*Zea mays* L.) landraces from the southern region of Brazil: contamination by *Fusarium* sp., zearalenone, physical and mechanical characteristics of the kernels. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, p.1-5, 2009.

- ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M. *et al.* Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.49, p.63-71, 2006.
- PINTO, N.F.J.A. Grãos ardidos em milho. Circular Técnica n.66, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), 2005. 6p.
- PIOVESAN, V.; OLIVEIRA, V.; ARAÚJO, J.S. Predição do conteúdo de aminoácidos essenciais do grão de milho. *Ciênc. Agrotec.*, v.34, p.758-764, 2010.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. *et al.* Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2011. 252 p.
- SHETTY, P.F.; BHAT, R.V. A physical method for segregation of fumonisin contaminated maize. *Food Chem.*, v.66, p.371-374, 1999.
- SILVA, C. S.; COUTO, H.P.; FERREIRA, R.A. *et al.* Valores nutricionais de milhos de diferentes qualidades para frangos de corte. *R. Bras. Zootec.*, v.37, p.883-889, 2008.
- SINDIRAÇÕES. Efeitos da gangorra agropecuária. Boletim informativo do setor, maio/2017. Disponível em: <<http://sindiracoes.org.br/produtos-e-servicos/boletim-informativo-do-setor/>>. Acessado em: 02 jan. 2018.
- SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R.A. liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.389, p.1505-1523, 2007.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). World agricultural supply and demand estimates, WASDE-572, 2017. Disponível em: <<https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acessado em: 02 jan. 2018.
- VIEIRA, R.O.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F. *et al.* Composição química e energia metabolizável de híbridos de milho para frangos de corte. *R. Bras. Zootec.*, v.36, p.832-838, 2007.
- ZERINGUE, H.J., BROWN, R.L., NEUCERE, J.N., *et al.* Relationships between C6-C12 alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *J. Agric. Food Chem.*, v.44, p.403-407, 1996.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, as conclusões do capítulo 3 foram:

- Foram constatadas diferenças de concentrações médias de micotoxinas entre os silos de milho amostrados;
- Amostras de milho coletadas seguindo-se os processos de amostragem A e B proporcionam resultados de análises de micotoxinas com a mesma variabilidade;
- O processo de amostragem A, proporciona menor variabilidade em amostras de grãos de trigo.
- Ambos processos de amostragem proporcionam amostras de trigo com a mesma representatividade se o silo for considerado como um lote;
- Os dois processos de amostragem são aplicáveis na prática pela indústria e podem dar suporte à tomada de decisão na compra, venda e destinação dos grãos, o que aumenta a segurança nas transações comerciais e agrega valor aos grãos armazenados.

A inovação na amostragem de grãos armazenados em silos permite uma tomada de decisão baseada em informações prévias à compra ou à utilização dos mesmos, proporcionando um gerenciamento adequado na destinação dos grãos. Os resultados de análises de micotoxinas de amostras coletadas seguindo-se os dois processos abordados neste estudo servem como alternativa prática ao gerenciamento dos riscos de micotoxinas em empresas que atuam no ramo de comercialização e beneficiamento de grãos na cadeia de alimentação humana e/ou animal. Os dois processos de amostragem são práticos, baratos e adaptam-se às necessidades da indústria.

O desenvolvimento e a avaliação dos dois processos de amostragem abordados neste estudo vêm ao encontro das necessidades da indústria. Recentemente, em 2011, 2013 e 2017, a ANVISA estabeleceu legislação com limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos, porém não estabeleceu procedimentos de coleta das amostras de grãos armazenados em silos. Alguns métodos de amostragem em silos estão divulgados na literatura, mas não são padronizados por legislação. A Conab publicou uma recomendação em que aborda simplificadaamente a amostragem de grãos armazenados em silos, mas não faz menção às micotoxinas. Na União Europeia não há definição de critérios de desempenho para os processos de amostragem aplicados nessa situação. Portanto,

este trabalho contribui com duas alternativas para realizar a amostragem de grãos armazenados estaticamente em silos verticais.

Pelo fato das micotoxinas apresentarem distribuição heterogênea na massa de grãos, entende-se que se um procedimento de amostragem é eficiente para verificar o nível de concentração por micotoxinas, também fornece amostras representativas para demais avaliações, como por exemplo, da composição nutricional dos grãos. Desta forma, utilizando-se os dois processos de amostragem abordados nesta tese, é possível que a partir da análise dessas amostras se proceda uma certificação dos silos quanto às concentrações por micotoxinas.

Em resumo, as conclusões do capítulo 4 foram:

- A composição micotoxicológica e nutricional é influenciada pelos diferentes híbridos e também pelo ano de safra, e por isso deve ser constantemente monitorada para produção de rações;
- A correlação entre grãos avariados e micotoxinas é de fraca magnitude, evidenciando a necessidade de análises laboratoriais para verificação da concentração de micotoxinas;
- Altas concentrações de micotoxinas influenciam negativamente no custo da ração, pois requerem a inclusão de AAM na ração;
- Híbridos com tecnologia Viptera apresentam menor concentração de FUM, maiores percentuais de PB, MetD, CisD, TreD e, conseqüentemente, custo da ração mais baixo;
- Híbridos simples modificado e duplo tem maiores percentuais de PB, MetD, CisD e TreD;
- Híbridos de ciclo precoce tem menor concentração de FUM, maiores percentuais de PB, LisD, MetD, CisD, TreD e menor custo da ração.

A biotecnologia tem avançado constantemente no melhoramento de variedades e híbridos de milho, principalmente no controle de enfermidades e pragas, objetivando um maior rendimento de grãos. No entanto, ao considerar-se que quase a metade do milho produzido no Brasil é consumido como ingrediente de rações animais, essa *commodity* necessita ser valorizada em função do seu valor nutritivo. Atualmente a maior parte do comércio do milho no Brasil considera apenas a classificação por tipo, estabelecida pelo MAPA, que basicamente leva em consideração o percentual de grãos avariados, não havendo descontos e/ou bonificações pela concentração de micotoxinas ou composição química e energética.

Segundo dados publicados pelo Sindirações (2017), o frango de corte consome aproximadamente um quarto do milho produzido no Brasil. Para esta espécie, o milho é o ingrediente com maior inclusão na ração e dependendo do custo, e também do custo do farelo de soja, pode ser o ingrediente com maior participação no custo da ração. Portanto, isso justifica o porquê da necessidade da valorização desta importante *commodity* ser influenciada pela sua qualidade nutricional.

Atualmente existem metodologias de análises rápidas, como por exemplo o NIRS, que permitem a estimativa da composição nutricional e micotoxicológica de matérias-primas e rações. Usualmente esta metodologia já é utilizada para qualificação de algumas matérias-primas no momento do recebimento nas fábricas de rações e demais setores de produção. Um exemplo comum em fábricas de rações para aves e suínos, é a determinação da PB do farelo de soja como fator de aceitação ou rejeição de carga. Essa mesma ideia pode ser aplicada para o milho com o objetivo de valorização e segregação por qualidade.

Nos últimos anos, com exceção de 2017, a Embrapa divulgou levantamento com as sementes de cultivares de milho disponíveis para comercialização no mercado brasileiro. No último levantamento realizado, Pereira Filho e Borghi (2016) apresentaram 315 cultivares de milho disponíveis, com diferentes tecnologias de transgenia, ciclo, tipo de híbrido e textura de grãos. Essas diferentes características, juntamente com as condições climáticas, nível de adubação, fertilidade do solo, condições de manejo, infestação por pragas e doenças, entre outros, têm influência significativa sobre a composição nutricional e concentração por micotoxinas no milho.

Foi constatado nesse estudo que híbridos de milho geneticamente modificados podem ter diferentes respostas em safras distintas para variáveis quantitativas que influenciam no custo da ração para frangos de corte. Constatou-se fraca correlação entre grãos avariados e micotoxinas (FUM, AFLA e ZEA), o que evidencia a necessidade de análises laboratoriais para pesquisar a concentração de micotoxinas e não somente realizar a avaliação dos grãos avariados. A concentração de micotoxinas, principalmente as FUM, são responsáveis pela necessidade de adição de AAM na ração, aumentando o custo da ração. A EMAn tem participação importante no custo da ração, pois para atender a exigência nutricional, frequentemente necessita-se complementar a ração com uma fonte alternativa de energia, comumente o óleo de soja, que tem custo aproximado de 4 a 7 vezes o valor do milho. Outra variável importante no custo da ração é a PB do milho. Apesar dos aminoácidos não

terem se ajustado ao modelo de predição do custo da ração, a LisD, MetD, CisD e TreD têm correlação com a PB. Maiores teores de PB no milho reduzem a inclusão de farelo de soja, liberando mais espaço na fórmula para ser preenchido com milho, o que conseqüentemente aumenta a EMAn da ração, exigindo menor inclusão de fonte adicional de energia, possibilitando um menor custo da ração.

Dessa forma, a partir dos dois estudos desenvolvidos nesta tese, espera-se contribuir com o aprimoramento do controle dos riscos das micotoxinas, dando subsídios às questões regulatórias e de gerenciamento de risco micotoxinas, apresentando dois processos de amostragem aplicáveis à indústria produtora e consumidora de grãos. Ademais, a divulgação da variabilidade nutricional e de concentração com micotoxinas em híbridos de milho evidencia a necessidade de pesquisas em melhoramento genético para aprimorar a qualidade dos grãos e diminuir o custo da ração, bem como a necessidade da valorização comercial do milho ser influenciada pelo custo da ração que o mesmo proporciona.

REFERÊNCIAS

- ALBINO, L. F. T. et al. Valores energéticos e composição química de alguns alimentos à base de soja usados na alimentação de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos/SP. **Anais...** Santos/SP: APINCO, 2006. p.117.
- ALEXOPOULOS, C. Association of *Fusarium* mycotoxicosis with failure in applying an induction of parturition program with PGF₂ alpha and oxytocin in sows. **Theriogenology**, v. 55, n. 5, p. 1745-1757. 2001. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(01\)00517-9/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(01)00517-9/abstract)>. Acesso em: 21 mar. 2015. DOI: 10.1016/S0093-691X(01)00517-9.
- ALLDRICK, A. J.; HAJŠELOVÁ, M. Zearalenone. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Org.). **Mycotoxins in food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap. 15, p. 353-366.
- ALMEIDA, A.P. et al. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de micotoxinas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 1-9. 2005. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/23506>>. Acesso em: 18 dez. 2015.
- ALOMAR, D.; MONTERO, R.; FUCHSLOCHER, R. Effect of freezing and grinding method on near-infrared reflectance (NIR) spectra variation and chemical composition of fresh silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 57-63. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840198002685>>. Acesso em: 20 dez. 2015.
- ALVES, B. M. et al. Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e à qualidade nutricional. **Ciência Rural**, v. 45, n.5, p. 884-891, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/2015nahead/1678-4596-cr-0103_8478cr20140471.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2017.
- ANDRETTA, I. et al. Alimentação de leitões pré-púberes com dietas contendo zearalenona. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1227-1233. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v60n5/27.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2015.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de mar. 2011. Seção 1, p. 66-67.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017 que altera a Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua

aplicação. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de fev. 2017. Seção 1, p. 45.

BOBROWSKI, V. L. et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843-844. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v33n5/17128.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2017. DOI: 10.1590/S0103-84782003000500008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/SNAD/SFA nº 07, de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 de nov. 1988. Seção 1, p. 21.968.

BRASIL. Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011. Estabelece o regulamento técnico do milho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 246, 23 dez. 2011. Seção 1, p.3-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem vegetal / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2013. 37 p.

BÚTRON, A. et al. Resistance to reduce corn borer damage in maize for bread, in Spain. **Crop Protection**, v. 28, n. 2, p. 1-5. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219408001804>>. Acesso em: 21 dez. 2017. DOI: 10.1016/j.cropro.2008.09.007.

CALORI-DOMINGUES, M. A. et al. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 181-185. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n1/31.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2015. DOI: 10.1590/S0101-20612007000100032.

CAMARGOS, S. M; SOARES, L. M. V; SAWAZAKI, E. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3. p. 226-229. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v31n3/v31n3a15.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2017. DOI: 10.1590/S1517-83822000000300015.

CAMPESTRINI, E. Utilização de equipamento NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) nos estudos de valores nutricionais (composição química e digestibilidade) de alimentos para não ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 5, p. 240-251. 2005. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/025V2N5P240_251_SET2005.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2015.

CANTARELLI, V. de S. et al. Composição química, vitreosidade e digestibilidade de diferentes híbridos de milho para suínos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 860-864. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n3/a36v31n3.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2017. DOI: 10.1590/S1413-70542007000300036.

CARNEIRO, L. M. T. A. Diferentes épocas de colheita, secagem e armazenamento na qualidade de grãos de trigo comum e duro. **Bragantia**, v. 64, n. 1, p. 127-137. 2005.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v64n1/23860.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

CHOCT, M. et al. Microstructure of grains as an indicator of nutritive value. **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**, v. 13, p. 223-228, 2001. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/bf3d/df92ee34c64f832dd21dcf26394c6185ff4d.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Instruções para amostragem de grãos. **Boletim Técnico Série Armazenagem**, v. 1, n. 1, p. 1-32. 2015. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_07_15_09_23_08_boletim_tecnico_de_armazenagem.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2015.

COSTA, D. M. et al. Qualidade do milho para nutrição animal comercializado a varejo e métodos para determinação da umidade. **Revista Agrogeoambiental**, v. 5, n. 2, p. 25-34. 2013. Disponível em: <<https://agrogeoambiental.ifsuldeminas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/view/436>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

CRUZ, J. C. et al. **Quatrocentos e setenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2015/2016**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 28 p.

DESJARDINS, A. E. **Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology**. Minnesota: APS Press, 2006. 260 p.

DIESING, A. K. et al. Vulnerability of Polarised Intestinal Porcine Epithelial Cells to Mycotoxin Deoxynivalenol Depends on the Route of Application. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1-9. 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0017472&representation=PDF>>. Acesso em: 21 mar. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0017472.

DILKIN, P. et al. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, v. 1, n. 1, p. 137-141. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v30n1/a22v30n1.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2015. DOI: 10.1590/S0103-84782000000100022.

DILKIN, P. et al. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 10, p. 1345-1353. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691503001376>>. Acesso em: 21 mar. 2015. DOI: 10.1016/S0278-6915(03)00137-6.

DILKIN, P. et al. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 175-181. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n1/a27v34n1.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2015. DOI: 10.1590/S0103-84782004000100027.

EDWARDS, S. et al. The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant sexually mature gilts. **Theriogenology**, v. 28, n. 1, p. 43-49. 1987. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/0093-691X\(87\)90184-1/pdf](http://www.theriojournal.com/article/0093-691X(87)90184-1/pdf)>. Acesso em: 21 mar. 2015.

ETIENNE, M.; JEMMALI, M. Effects of zearalenone (F2) on estrus activity and reproduction in gilts. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 1, p. 1-10. 1982. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/55/1/JAN0550010001>>. Acesso em: 21 mar. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation EC nº 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, Commission of the European Communities, 23 of fev. 2006. L 70/12.

EUROPEAN COMMISSION. Guidance document for the implementation of Commission Regulation nº 519/2014 of 16 may. 2014 amending regulation (EC) nº 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in food. 2014. Disponível em <http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_contaminants_sampling_guidance-sampling-final_en.pdf>. Acesso em: 31 jan. 2016.

EYNG, C. et al. Composição química e valores energéticos de cultivares de milho para aves. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 60-72. 2009. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1368/769>>. Acesso em: 18 dez. 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization. Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 55, p. 27-56, 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-t0838e.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

FERREIRA, L. F.; RESENDE, J. S. A Cultura do Milho. Belo Horizonte: EMATER. 2000. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/doc%5Csite%5Cserevicoseprodutos%5CClivraria%5CCulturas%5CCultura%20do%20Milho.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

FONTANELI, R. S. et al. Validação do método de reflectância no infravermelho proximal para análise de silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 594-598, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982002000300008>>. Acesso em: 20 dez. 2015. DOI: 10.1590/S1516-35982002000300008.

FOX, G.; MANLEY, M. Hardness methods for testing maize kernels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5647-5657, 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf900623w>>. Acesso em: 12 jan. 2018. DOI: 10.1021/jf900623w.

GOES, R. H. T. B.; LIMA, H. L. **Técnicas laboratoriais na análise de alimentos**. Dourados, MS: UFGD, 2010. 52 p.

HOSENEY, R. C. **Principles of cereal science and technology**. 2. ed. St Paul: American Association of Cereal Chemists, 1994. 378p.

HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants: from basics to bulk. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 852-867. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9078506>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins: occurring aflatoxins (group 1), aflatoxin M₁ (group 2B). **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v. 56, p. 245-396. 1993a. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: Fumonisin B₁ and B₂ and Fusarin C (group 2B). **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v. 56, p. 445-466. 1993b. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone x (group 3). **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v. 56, p. 397-444. 1993c. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

JACKSON, L.; JABLONSKI, J. Fumonisin. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Org.). **Mycotoxins in food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap.16, p. 367-391.

JASKIEWICS, K. et al. Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 78, n. 2, p. 321-325. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3468296>>. Acesso em: 22 mar. 2015. DOI: 10.1093/jnci/78.2.321.

JOHANSSON, A. S. et al. Testing shelled corn for aflatoxin, part I: estimation of variance components. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, n. 5, p. 1264-1269. 2000. Disponível em: <<http://www.bae.ncsu.edu/usda/www/researchpaperstbw.htm>>. Acesso em: 17 fev. 2012.

KUIPER-GOODMAN, T. et al. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 253-306, Sep. 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0273230087900377>>. Acesso em: 21 mar. 2015. DOI: 10.1016/0273-2300(87)90037-7.

KUMAR, V. et al. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905. 2008. Disponível

em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026121940700333X>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

LIMA, G. J. M. M. Milho e subproduto na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas/SP. **Anais...** CBNA: Campinas/SP, 2001. p.13-32.

MACHADO, L. C.; COSTA, D. M. Qualidade do milho para utilização na alimentação animal. In: III SEMANA SE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFMG CAMPUS BAMBUÍ, 2010, Bambuí/MG. **Anais da III Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG Bambuí**, Bambuí/MG: Instituto Federal de Minas Gerais, 2010.

MALEKINEJAD, H. et al. Exposure of oocytes to the fusarium toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 840–847. 2007. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/77/5/840.full.pdf+html>>. Acesso em: 21 mar. 2015. DOI: 10.1095/biolreprod.107.062711.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Pallotti, 2007. 238 p.

MALLMANN, A. O. et al. Dois planos de amostragem para análise de fumonisinas em milho. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 551-558, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v43n3/a8113cr6528.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

MALLMANN, A. O. et al. Comparison of the efficiency between two sampling plans for aflatoxins analysis in maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 35-42. 2014a. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v45n1/v45n1a06.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2015. DOI: 10.1590/S1517-83822014000100006.

MALLMANN, A. O. et al. Avaliação macroeconômica da qualidade micotoxicológica e nutricional de milho estocado em diferentes unidades armazenadoras destinado à ração para frangos de corte. In: VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, Estância de São Pedro, SP. **Anais dos Trabalhos Científicos aves do VI CLANA**. Campinas/SP: CBNA, 2014b.

MALLMANN, C. A., et al. Micotoxinas e micotoxicoses em suínos: situação atual no Brasil. In: BARCELLOS, D. E., et al. (Org.). **Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos**. 1. ed. Porto Alegre: UFRGS, Setor de Suínos, 2015a. p. 221-237.

MALLMANN, A. O. et al. Avaliação nutricional de híbridos de milho para frangos de corte. In: XIV SEMINÁRIO TÉCNICO CIENTÍFICO DE AVES E SUÍNOS - AVESUI 2015, Curitiba/PR. **Anais do XIV Seminário Técnico Científico de Aves e Suínos**. Itu/SP: Instituto Oswaldo Gessulli, 2015b.

MALLMANN, C. A. et al. Prevalence and levels of deoxynivalenol and zearalenone in commercial barley and wheat grain produced in Southern Brazil: an eight-year (2008 to 2015) summary. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 146-152. 2017. Disponível em

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s40858-017-0152-6>>. Acesso em: 09 jan. 2018. DOI: 10.1007/s40858-017-0152-6.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Política agrícola brasileira para a tricultura e demais culturas de inverno**. Brasília: MAPA/ACS, 2012. 54 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Sala%20de%20Imprensa/Publica%C3%A7%C3%B5es/Politica%20Agricola%20Brasileira.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2016.

MARASAS, W. F. et al. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 4, p. 197-203. 1988. Disponível em: <<http://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/42389/43marasas1988.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2015.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99. 2010. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev121/Art12112.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. Manejo integrado de pragas em lavouras plantadas com milho geneticamente modificado com gene bt (Milho Bt). In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29431/1/Pragas-manejo.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

MILLER, D. M.; WILSON, D. M. Veterinary diseases related to aflatoxin. In: EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Org.). **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 347-364.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Product Research**, v. 31, p. 1-6. 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022474X9400039V>>. Acesso em: 20 dez. 2015. DOI: 10.1016/0022-474X(94)00039-V.

MIRAGLIA, M. et al. The role of sampling in mycotoxin contamination: an holistic view. **Food Additives and Contaminants: part A**, v. 22, n. 1, p. 31-36. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02652030500389055>>. Acesso em: 20 jul. 2015. DOI:10.1080/02652030500389055.

ONO, E.Y.S. et al. Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 1, p. 63-71. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/babt/v49n1/28489.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2017. DOI: 10.1590/S1516-89132006000100008.

PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. **Mercado de sementes de milho no Brasil: safra 2016/2017**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 28 p.

PIOVESAN, V.; OLIVEIRA, V.; GEWEHR, C. E. Milhos com diferentes texturas de endosperma e adição de alfa-amilase na dieta de leitões. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 2014-2019. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n11/a15311cr2972>>. Acesso em: 27 dez. 2017. DOI: 10.1590/S0103-84782011005000134.

PRAÇA, L. B. et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v39n1/19578.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2017. DOI: 10.1590/S0100-204X2004000100002.

RAUPP, W. J. Contribution Systems from Brazilian agricultural research Corporation. **Annual Wheat Newsletter**, v. 59, p. 5-9. 2013. Disponível em: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/awn/59/AWN_VOL59.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2016.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 353-357. 1992. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n03_353.PDF>. Acesso em: 22 mar. 2015. DOI: 10.1094/Phyto-82-353.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105. 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/68/5/2101.full.pdf+html>>. Acesso em: 22 mar. 2015. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2101-2105.2002.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their micotoxicoses - An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 3-10. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507003790>>. Acesso em: 18 dez. 2015. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019.

ROSTAGNO, H. S. et al. Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para aves e suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, suppl. esp., p. 295-304, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007001000027>>. Acesso em: 18 dez. 2015. DOI: 10.1590/S1516-35982007001000027.

ROSTAGNO, H.S. et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos** - Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2011. 252 p.

SANCHIS, V.; MAGAN, N. Environmental conditions affecting mycotoxins. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Org.). **Mycotoxins in food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap. 8, p. 174-186.

SANTOS, Z. A. S. et al. Valor nutricional de alimentos para suínos determinado na Universidade Federal de Lavras. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 29, n. 1, p. 232-237.

2005. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v29n1/a29.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2015. DOI: 10.1590/S1413-70542005000100029.

SCHEUER, P. M. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 211-222. 2011. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev132/Art13211.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

SIEGEL, D.; BABUSCIO, T. Mycotoxin management in the European cereal trading sector. **Food Control**, v. 22, p. 1145-1153. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511000818>>. Acesso em: 23 fev. 2015. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.02.022.

SILVA, C. S. et al. Valores nutricionais de milho de diferentes qualidades para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 883-889, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008000500016>>. Acesso em: 18 dez. 2015. DOI: 10.1590/S1516-35982008000500016.

SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-42, 2000. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/262920112/interac-a-o-planta-inseto>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

SINDIRAÇÕES. Efeitos da gangorra agropecuária. Boletim informativo do setor, maio/2017. 2017. Disponível em: <<http://sindiracoes.org.br/produtos-e-servicos/boletim-informativo-do-setor/>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

SOBROVA, P. et al. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, n. 3. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2984136/pdf/ITX-3-094.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2015. DOI: 10.2478/v10102-010-0019-x.

USDA - United States Department of Agriculture. World agricultural supply and demand estimates, WASDE-572, 2017. Disponível em: <<https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2018.

VAN KEMPEN, L. Infrared technology in animal production. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, p. 29-48, 2001. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=62208>>. Acesso em: 20 dez. 2015. DOI: 10.1079/WPS20010004.

VIEIRA, R. O. et al. Composição química e energia metabolizável de híbridos de milho para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007000400012>>. Acesso em: 18 dez. 2015. DOI: 10.1590/S1516-35982007000400012.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.712.

WAQUIL, J. M. Manejo Fitossanitário e Ambiental: Milho transgênico Bt e resistência das plantas ao ataque da lagarta-do-cartucho. 2007. Disponível em: <www.infobibos.com/Artigos/2007_1/manfito/index.htm>. Acesso em: 17/1/2018.

WHITAKER, T. B. Sampling food for mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 1, p. 50-61. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02652030500241587>>. Acesso em: 17 fev. 2012. DOI: 10.1080/02652030500241587.

WHITAKER, T.B. et al. **Sampling procedures to detect mycotoxins in agricultural commodities**. New York: Springer, 2011. 58 p.