



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**NEUZA MOREIRA MARQUES BIRCK**

**CONTAMINAÇÃO FÚNGICA, MICOTOXINAS E SUA  
RELAÇÃO COM A INFESTAÇÃO DE INSETOS EM TRIGO  
(*Triticum aestivum*) PÓS-COLHEITA**

**Florianópolis - SC**

**2005**

NEUZA MOREIRA MARQUES BIRCK

**CONTAMINAÇÃO FÚNGICA, MICOTOXINAS E SUA  
RELAÇÃO COM A INFESTAÇÃO DE INSETOS EM TRIGO  
(*Triticum aestivum*) PÓS-COLHEITA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora:** Profa. PhD. Vildes Maria Scussel

**Co-orientador:** PhD. Irineu Lorini

Florianópolis – SC, 2005

**CONTAMINAÇÃO FÚNGICA, MICOTOXINAS E SUA  
RELAÇÃO COM A INFESTAÇÃO DE INSETOS EM TRIGO  
(*Triticum aestivum*) PÓS-COLHEITA**

Por

**Neuza Moreira Marques Birck**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente:

\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Vildes Maria Scussel

Membro:

\_\_\_\_\_  
Dr. Irineu Lorini

Membro:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Honório Domingos Benedet

Membro:

\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Zavariz de Miranda

Florianópolis, 07 de dezembro de 2005.

"AS CIRCUNSTÂNCIAS FAZEM OS HOMENS, ASSIM  
COMO OS HOMENS FAZEM AS CIRCUNSTÂNCIAS".

(K. MARX & f. ENGELS)

## DEDICATÓRIA

A Deus por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida principalmente nos mais difíceis.

Ao meu esposo **Arley**, pela força e incentivo e pelos momentos que estive ausente.

Aos **meus pais**, pelo incentivo, amor e dedicação. Muito obrigado por tudo o que vocês fizeram para que eu chegasse até aqui. Eu amo muito vocês.

A toda **minha família** que apesar da distância, estiveram sempre presentes com seu carinho.

Cada momento deste trabalho requer o reconhecimento leal de todas as pessoas com quem me encontrei e que participaram de alguma forma da minha caminhada até aqui. Diante disto, agradeço sinceramente a Deus pelo dom da vida.

A toda a minha equipe de trabalho do Laboratório do Moinho Cotriguaçu, **Roseli Moscon, Célia Kotz, Valdirene Santos, Marizete Salino, Marinalda Juchem, Aline Bavaresco, Maiara Aguiar, Jaqueline Perreira, Flávia Kler e Gracieli Turatto** que se fizeram sempre presente compartilhando comigo os momentos difíceis, alegres e produtivos desta caminhada, ressaltando a pessoa da **Célia Kotz e Ademir Armani**, pelo comprometimento e dedicação durante a coleta das amostras.

**MUITO OBRIGADA.**

## AGRADEÇO ESPECIALMENTE

A minha orientadora Profa. Dra. **Vildes Maria Scussel**, não só pela orientação, mas também por sua paciência, e confiança diante de tantas dificuldades.

Ao Co-orientador desse trabalho Dr. **Irineu Lorini**, obrigada pela amizade, incentivo e confiança em mim depositada.

## AGRADECIMENTOS

### Ao **Moinho Cotriguaçu**

Sabemos que tudo se conquista quando temos muita fé e persistência e que até mesmo as mais longas e difíceis trajetórias ficam mais breves e fáceis quando em parceria, obrigada pela oportunidade e por acreditar em mim.

A pessoa do presidente do Moinho Cotriguaçu em exercício durante a execução desse projeto, Sr. **Dilvo Groli** (2003) e Sr. **Irineu da Costa** (2004), por me conceder essa oportunidade.

Ao superintendente Sr. **Cândido Takashiba** por me conceder as dispensas solicitadas, para execução desse projeto.

Ao Sr. **Acir Martins da Silva** e **Zaldir Tonon**, gerentes do Moinho Cotriguaçu por acreditarem em nosso projeto e em minha pessoa, e por propiciar condições para que o mesmo se concretizasse.

A **Andréia Bazzi** pela ajuda na digitação das tabelas.

A todos os **colaboradores do Moinho Cotriguaçu** e **Cooperativas filiadas** principalmente **Cvale** pelo fornecimento do material para o experimento, e aos agricultores.

Ao Sr. **Alcemir Chiodelli** da Cvale pela ajuda e fornecimento de dados importantíssimos na confecção deste trabalho, e sua equipe técnica pelas informações prestadas sempre que necessitei.

A **Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório LAMIC** na pessoa do Prof. Dr. **Carlos Augusto Mallmann** e o Dr. **Paulo Dilkin** e sua **equipe técnica**, na execução de algumas análises e aos auxílios prestados.

A **Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Micotoxina**, aos colegas **Tiago, Mariana, Fernanda, e Milena** pela amizade e ajuda.

A **Ilse Melo** pela ajuda quando à Florianópolis cheguei em dividir o apartamento com a **Jaqueline Mello** e **Alessandra Fontana** companheiras de “AP” e a vocês meninas, obrigada pelos bons momentos que passamos juntas.

Aos **Professores, Funcionários** e **amigos** do curso de pós-graduação do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, pela amizade e ajuda prestada sempre que solicitada.

Ao **Sr. Sérgio de Souza**, Chefe de Serviço de Expediente da pós-graduação em Ciências dos Alimentos, pela ajuda e amizade.

Ao **Laboratório Avícola da Cvale**, na pessoa do **Sr. Neivaldo Burin** em ceder o laboratório de microbiologia para realização dos ensaios, a **Sra. Leoni Ravagnani** responsável técnica e as analistas **Eleni Ferrazzo, Elizana Lorenzetti** e **Lucimara** pela ajuda na execução das análises.

Ao **Prof. Dr. Flavio A. Lazzari** da Universidade Federal do Paraná pela amizade, sugestões e empréstimo de material bibliográfico referente à cultura do trigo.

Ao **Sr. Francisco de Assis Franco**, da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola pelo empréstimo dos livros, e pelas informações técnicas prestadas.

Embrapa Trigo na pessoa do **Dr. Irineu Lorini, Dra. Martha Zavariz de Miranda, Dra. Helenara Beckell** e **MSc. Alexandra Morás** pela amizade, incentivo, ajuda e apoio.

Aos Professores **Luciano Alonso** e **Henrique Resende** da Universidade Federal de Lavras pela amizade e incentivo.

A **Dra. Rosemary Viola Bosch** da FMVZ-USP pela troca de experiência e amizade, obrigada.



Enfim a **todas as pessoas** que de uma maneira ou outra colaboraram para a realização deste trabalho. O meu **MUITO OBRIGADA**.

A este País GRANDE e generoso, que só  
é menor que a grandeza e generosidade de  
sua gente.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xv
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1 Aspectos gerais do trigo .....	23
2.1.1 Origem e aspectos econômicos do trigo .....	23
2.1.2 Estrutura do grão de trigo .....	23
2.1.3 Classificação do trigo .....	26
2.1.3.1 Classificação botânica .....	26
2.1.3.2 Classificação comercial .....	26
2.1.4 Produção mundial de trigo .....	27
2.1.5 Produção brasileira de trigo .....	27
2.1.6 Produção por estados .....	27
2.1.7 Armazenagem de grãos .....	29
2.1.8 Período de armazenamento .....	30
2.1.9 Prevenção no armazenamento .....	31
2.1.9.1 Limpeza dos armazéns .....	31
<b>2.2 Fatores Ambientais que Favorecem o Desenvolvimento de Fungos e a Produção de Micotoxinas</b> .....	32
2.2.1 Atividade de água .....	32
2.2.2 Temperatura .....	33
2.2.3 Umidade relativa do ar .....	33
<b>2.3 Infestação de pragas em grãos de cereais armazenados</b> .....	34
<b>2.4 Microbiota fúngica e micotoxinas em trigo</b> .....	37
2.4.1 Fungos toxigênicos .....	39
2.4.2 Micotoxinas e micotoxícoses .....	40

2.4.3 Prevenção das micotoxinas .....	46
<b>2.5 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>47</b>

## **ARTIGO 1**

### **CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO E FARINHAS COMUM E ESPECIAL NO PROCESSO DE MOAGEM .....**

Resumo .....	53
Abstract .....	54
<b>3.1 Introdução .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2 Material e Método .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Resultados e Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>3.4 Conclusões .....</b>	<b>66</b>
<b>3.5 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>67</b>

## **ARTIGO 2**

### **DETERMINAÇÃO DE FUNGOS E DE MICOTOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO EM PÓS-COLHEITA .....**

Resumo .....	70
Abstract .....	71
<b>4.1 Introdução .....</b>	<b>72</b>
<b>4.2 Material e Método .....</b>	<b>75</b>
<b>4.3 Resultados e Discussão .....</b>	<b>79</b>
<b>4.4 Conclusões .....</b>	<b>92</b>
<b>4.5 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>93</b>

## **ARTIGO 3**

### **MONITORAMENTO DA PRESENÇA E IDENTIFICAÇÃO INTERNA DE INSETOS (ADULTOS, LARVAS E FRAGMENTOS) EM GRÃOS DE TRIGO RECÉM-COLHIDO E DURANTE A ARMAZENAGEM .....**

.....	96
-------	----

Resumo .....	97
Abstract .....	98
<b>5.1 Introdução .....</b>	<b>99</b>
<b>5.2 Material e Método .....</b>	<b>101</b>
<b>5.3 Resultados e Discussão .....</b>	<b>104</b>
<b>5.4 Conclusões .....</b>	<b>117</b>
<b>5.5 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>118</b>
<b>6 Considerações Finais .....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação de trigo segundo a Instrução Normativa N.7 .....	26
<b>Tabela 2:</b> Produção mundial de trigo em milhões de toneladas nos diferentes países no período de 2003 a 2004 .....	27
<b>Tabela 3:</b> Produção nacional de trigo em milhões de toneladas em diferentes estados brasileiros no período de 2003 a 2004 .....	28
<b>Tabela 3.1:</b> Relação das amostras de trigo e farinhas de trigo, coletadas no moinho durante o processamento.....	58
<b>Tabela 3.2:</b> Avaliação da contaminação por micotoxinas e fragmentos de insetos em farinhas de trigo comum e especial após o processamento no moinho .....	61
<b>Tabela 3.3:</b> Avaliação da contaminação por micotoxinas e fragmentos de insetos em trigo seco armazenado e trigo acondicionado destinados ao processamento de farinhas .....	63
<b>Tabela 4.1:</b> Contagem total (UFC/g) viável de fungos filamentosos e leveduras em trigo pós-colheita no período de novembro 2003 a maio 2004 .....	82
<b>Tabela 4.2:</b> Contaminação por micotoxinas, conteúdo de umidade e atividade de água em trigo armazenado no período de 0 (zero) a 180 dias .....	86
<b>Tabela 4.3:</b> Condições ambientais observadas do desenvolvimento da cultura ao período de safra, março de 2003 a setembro de 2003 .....	87
<b>Tabela 5.1:</b> Identificação por espécie da presença de insetos na massa de grãos de trigo recém-colhido e ao longo do armazenamento .....	108
<b>Tabela 5.2:</b> Identificação da presença de insetos, larvas e fragmentos no interior do grãos de trigo durante o armazenamento .....	109

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cultura do trigo em vários estágios de desenvolvimento, (A) Início de perfilhamento, (B) fase floração, (C) fase de maturação, (D) Colheita (E) Grãos de trigo (espigamento) .....	24
<b>Figura 2:</b> Estrutura do grão de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) .....	25
<b>Figura 3:</b> Regionalização de cultivo do trigo de acordo com a classe no estado do Paraná ..	28
<b>Figura 4:</b> Estrutura química das Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) .....	42
<b>Figura 5:</b> Estrutura química da Zearalenona .....	43
<b>Figura 6:</b> Estrutura química da Ocratoxina A .....	44
<b>Figura 7:</b> Estrutura química das Fumonisinias .....	45
<b>Figura 4.1:</b> Pontos amostrados no caminhão .....	76
<b>Figura 4.2:</b> Silo de armazenagem, com representação dos pontos de coleta .....	77
<b>Figura 4.3:</b> (A-B) Unidades Formadoras de colônias <i>Fusarium</i> spp .....	81
<b>Figura 4.4:</b> Unidades Formadoras de colônias (UFC/g) dos gêneros <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> spp, isolados em 35 amostras de grãos de trigo de 0 (zero) a 180 dias de armazenagem .....	83
<b>Figura 4.5:</b> Representação gráfica do silo de armazenagem, demonstrando os pontos de contaminação de fumonisina B <sub>1</sub> no período de 0 (zero) a 180 dias de armazenagem .....	88
<b>Figura 4.6:</b> Porcentagem de contaminação de fumonisina B <sub>1</sub> (%) em amostras de grãos de trigo no período de (0 a 180) dias de armazenagem .....	90
<b>Figura 5.1:</b> Presença de insetos vivos nos grãos de trigo pós-colheita e ao longo do armazenamento .....	105
<b>Figura 5.2:</b> Presença de insetos mortos nos grãos de trigo após tratamento com fosfina ao longo do armazenamento .....	105
<b>Figura 5.3:</b> Unidades Formadoras de colônias (UFC/g) em inoculação de insetos sem descontaminação .....	112

- Figura 5.4:** Unidades formadoras de colônia (UFC/g) em inoculação de insetos após descontaminação com solução de hipoclorito a 2% .....112
- Figura 5.5:** Somatória da infestação interna em grãos de trigo armazenado, no período de 0 (zero) a 180 dias .....113
- Figura 5.6:** Infestação interna em grãos de trigo armazenado, na fase larva e adulto, no período de 0 (zero) a 180 dias .....114

## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

Aw – Atividade de Água

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABD – Ágar Batata Dextrose

Afs - Aflatoxinas

AFB1- Aflatoxina B1

AFB2- Aflatoxina B2

AFG1- Aflatoxina G1

AFG2 – Aflatoxina G2

AFM1 – Aflatoxina M1

AFM2 – Aflatoxina M2

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

APPCC/HACCP – Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle

Aus - Ausente

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola

Cvale – Cooperativa Mista Vale do Piquiri Ltda

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DON – Deoxinivalenol

EDTA – Etilenodiamino Tetracetato de Tetrasódio



IARC – International Agency for Research on Cancer

LEME - Lequiencéfalomalaceia

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIP – Monitoramento Integrado de Pragas

MIPGRÃOS – Monitoramento Integrado de Pragas em Grãos Armazenados

ND – Não Detectado

OTA – Ocratoxina A

ppb – Partes por bilhão

pH – Potencial de Hidrogênio

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RNA – Ácido Ribonucléico

Ton - Tonelada

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UR – Umidade Relativa

USDA – United States Department of Agriculture

ZEA - Zearalenona

μ - Microns

μg/kg – micrograma por quilograma de produto

μg/ml – micrograma por mililitro de produto

μL – microlitro

## RESUMO

Foram avaliadas durante setembro de 2003 a maio de 2004, a microbiota fúngica e monitorado a influência de fatores abióticos, atividade de água, teor de água dos grãos, precipitação pluvial, umidade relativa do ar e temperatura ambiente durante o cultivo do trigo, assim como a contaminação por micotoxinas e a infestação por insetos em amostras de trigo (*Triticum aestivum*) em pós-colheita, proveniente da região Oeste do Paraná. A contaminação dos fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* spp, foi efetuada utilizando-se ágar glicose de batata. As análises de aflatoxina (AF), ocratoxina A (OTA), e zearalenona (ZEA), foram realizadas empregando-se os métodos de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para análise de fumonisinas e deoxinivalenol (DON) foi utilizada CLAE. O método usado para identificação da presença de insetos nos grãos foi por técnica de peneiragem. A análise de infestação interna em grãos de trigo, e a presença de matérias estranhas leves (fragmentos de insetos) em farinha foi realizada através de método da AOAC. O conteúdo de umidade do trigo variou de 11,3 a 11,9%, e nas farinhas comum e especial de 12,6 a 14,2%, abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira vigente, 13 e 15%, respectivamente. A contagem para os fungos filamentosos foi de 97,4 % para *Aspergillus* spp, 77,2 % para *Penicillium* spp e 51,4 % *Fusarium* spp, sendo predominante o gênero *Fusarium* spp desde o período de colheita e durante o armazenamento. Em todas as amostras analisadas não houve contaminação por aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, ocratoxina A, zearalenona e deoxivalenol. Porém a contaminação por fumonisina B<sub>1</sub>, foi detectada em 25,7% dos grãos de trigo, variando de 36,3 a 2.891 µg/g. Foi verificado a presença de 1 a 7 insetos vivos por amostra, e de 0 a 11 insetos mortos por amostra ao longo do armazenamento. Não foram identificados insetos vivos e mortos nas amostras do trigo logo após a colheita. Na análise de infestação interna dos grãos, todas as amostras apresentaram infestação no período de 180 dias de armazenamento, variando de 1 a 4 insetos inteiros, de 1 a 9 larvas e de 1 a 26 fragmentos de insetos, por amostra.

**Palavras chave:** trigo (*Triticum aestivum*); armazenagem; fungos; micotoxinas; insetos.

## ABSTRACT

From September 2003 to may 2004, were evaluated the fungal mycoflora and monitored the antibiotic influence of factors, of water activity, text of water of the grains, pluvial precipitation, relative moisture of the air and temperature of the field during the cultivation of the plant, contamination by mycotoxins and the infestation by insects in wheat samples (*Triticum aestivum*) in post-crop, coming from west area of the state of Paraná. Using agar potato glucose made the contamination of the filamentous fungi of the *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* spp. The aflatoxin analyses (AF), ochratoxin A (OTA), and zearalenone (ZEA), were accomplished by using the methods of chromatography of thin layer (CCD) and liquid chromatography of high efficiency (CLAE). For the fumonisins analysis and deoxynivalenol (DON) was used chromatography of high efficiency. The method for identification of the presence of insects in the grains was through sieving peneiragem technique. For the analysis of internal infestation in wheat grains and the presence of light strange matters (fragments of insects) in flour the method was the AOAC. The moisture content of the wheat wearied from 11,3 to 11,9%, and in the common and special flour of 12,6 to 14,2% flours, below the limits established by the effective Brazilian legislation, 13 and 15%, respectively. The conditioned for the filamentous fungus was of 97,4% *Aspergillus* spp 77,2% *Penicillium* spp and 51,4% *Fusarium* spp, was a predominant of the *Fusarium* spp from the period and during the storage. In all the analyzed samples there was not contamination by aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, Ochratoxin A, Zearalenone and Deoxyvalenol. About the contamination for fumonisins B<sub>1</sub>, Were detected in 25,7% of the wheat grains, varying of 36,3 to 2.891 µg/g. It was identified of the varied presence of 1 to 7 alive insects for samples, and of 0 to 11 dead insects for samples along the storage. They were not identified alive and dead insects in the samples of the wheat after the crop. In the analysis of internal infestation of the grains, all the samples presented infestation in the period of 180 days of their storage. The numbers varied from of 1 to 4 whole insects, of 1 to 9 maggots and of 1 to 26 fragments of insects, by samples.

**Words-key:** wheat (*Triticum aestivum*); storage; fungi; mycotoxins; insects.

# **1 INTRODUÇÃO**

O Brasil é o décimo quarto produtor mundial de Trigo com 5,8 milhões de toneladas por ano, porém sem suprir suas necessidades internas, sendo tradicionalmente um país importador deste cereal. Embora cultivado em vários estados do Brasil, grande parcela da produção nacional provém da região sul. A partir dos anos 80, o Paraná passou a ser o estado de maior produção correspondendo atualmente com 48,2% da produção. Devido ao período do ano em que é cultivado, o trigo é a única opção econômica de inverno que contribui para a viabilidade das propriedades agrícolas.

Uma das principais causas de deterioração de grãos e semente na armazenagem é a presença de fungos, sendo inferior apenas aos insetos. Já em países onde as pragas são controladas, os fungos são considerados o principal problema. No Brasil a estimativa de perdas quantitativas corresponde a médias anuais de 20% dos grãos armazenados, podendo chegar a perda total em alguns armazéns. Uma das dificuldades encontradas em nosso país é a carência de estruturas físicas para armazenagem e segregação dos produtos agrícolas. Muitas vezes esses produtos são expostas a umidade e temperaturas elevadas durante a colheita e o armazenamento, facilitando o desenvolvimento de fungos e, conseqüentemente a produção de micotoxinas, onde cada vez mais, os metabólitos de fungos, com toxicidade, ampliam seu lugar no cenário médico mundial. A ingestão desses alimentos contaminados pode provocar manifestações hepatotóxicas, nefrotóxicas, mutagênicas, estrogênicas, neurotóxicas, imunossupressoras e até mesmo carcinogênicas.

Em climas tropicais e subtropicais como o Brasil, que favorecem o crescimento dos fungos e ainda pelos efeitos advindos das estocagens de grandes quantidades de alimentos, principalmente grãos oleaginosos em depósitos inadequados (úmidos e quentes), são freqüentes os acidentes pela ingestão de alimentos mofados atingindo o homem, e principalmente os animais, quando, no falso juízo de um aproveitamento condicional do alimento alterado organolepticamente, é transformado em ração animal. Devido a estes fatores são registrados prejuízos de ordem econômica, sanitária e comercial, oriundos respectivamente, da deterioração (mofo), perda de produtos vegetais e queda na produção de alimentos de origem animal e das restrições comerciais para exportação de grãos.

Para controlar a contaminação dos alimentos por micotoxinas, a melhor medida é evitar a produção da mesma através de processos tecnológicos de alimentos adequados para o controle do crescimento de fungos (mofo) inibindo, a subseqüente produção de micotoxinas.

Considerando a grande produção e diversidade de produtos agrícolas comercializados no estado do Paraná, o trigo, um dos principais cereais de fundamental importância na alimentação, as dificuldades encontradas no setor de armazenagem de grãos, a exposição humana e animal a possíveis contaminantes, observou-se que há necessidade de desenvolver estudos para garantir a qualidade dos grãos desde a colheita até a armazenagem e processamento, demonstrando ao setor agrícola os problemas aos quais estão expostos.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade do trigo pós-colheita quanto a presença de fungos e micotoxinas, bem como monitorar a presença de insetos e a sua relação com a contaminação.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 1 Aspectos Gerais do Trigo

### 2.1.1 Origem e aspectos econômicos do trigo

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma planta originária do cruzamento entre duas gramíneas silvestres, o Einkorn e o Emmer que existiam nas proximidades dos rios Tigre e Eufrates. Os primeiros registros da cultura datam do ano 550 a.C., o que leva a concluir que já era cultivado a mais de 2000 anos (OSÓRIO, 1982).

Conhecida desde a mais remota antiguidade, essa gramínea (Figura 1) revela ampla adaptação a diversas condições de meio e é hoje comum à maioria dos países, embora somente em alguns tenha de fato grande expressão (EMBRAPA, 1984).

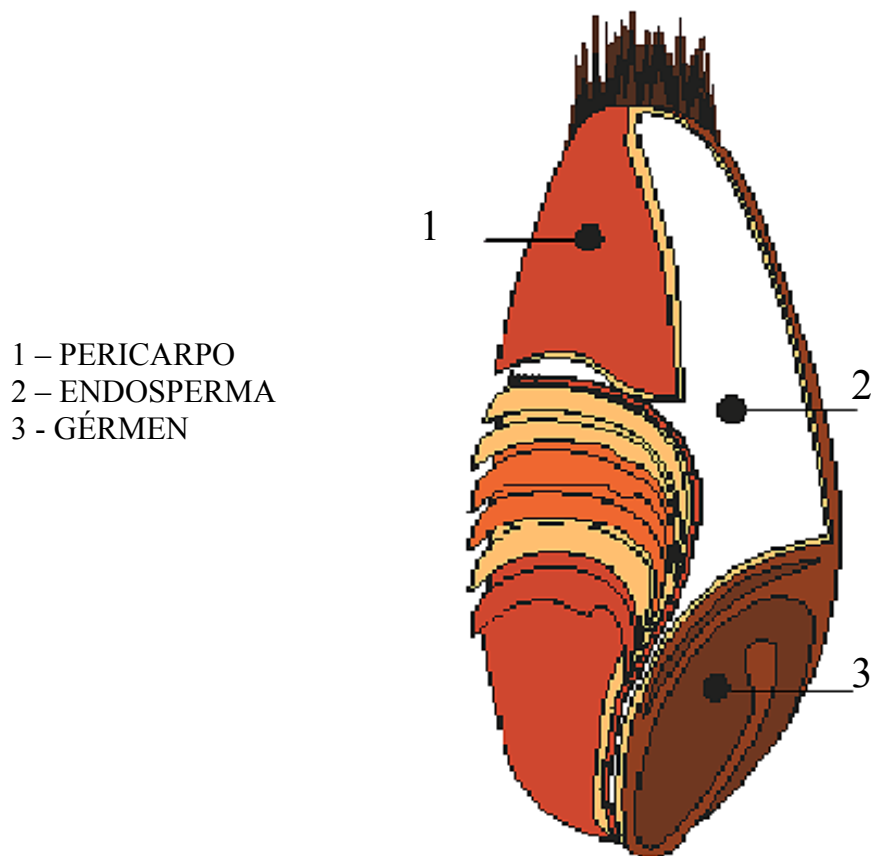
### 2.1.2 Estrutura do grão de trigo

O grão divide-se praticamente em duas partes: pericarpo e semente. A parte mais externa é o pericarpo, que recobre toda a semente e é composto por 6 camadas: epiderme, hipoderme, remanescentes da parede celular ou células finas, células intermediárias, células cruzadas e células tubulares. A semente é formada pelo endosperma e o gérmen, que são recobertos por 3 camadas: testa (onde estão os pigmentos que dão cor ao grão), camada hialina e aleurona. Do ponto de vista botânico, a aleurona é parte do endosperma, mas no processo de moagem ela faz parte do farelo (Figura 2) (IAPAR, 2001).





**Figura 1** - Cultura do trigo em vários estágios de desenvolvimento. (A) início de perfilhamento(B) fase de floração, (C) fase de maturação, (D) colheita, (E) grãos de trigo.



**Figura 2** – Estrutura do grão de trigo.

Os constituintes químicos não se distribuem uniformemente pelo grão. O pericarpo (cerca de 5% do peso do grão) é rico em pentosanas, celulose, cinzas e proteína. A aleurona (7%) é uma camada rica em cinza (fósforo, fitato), proteína, lipídios, vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina) e enzimas. O endosperma (82%) é composto basicamente de amido, mas sua parte mais externa (subaleurona) contém mais proteína que a porção interna. O gérmen (3%) tem alto conteúdo de proteína, lipídios, açúcares redutores e cinzas (EMBRAPA, 1984).

Os grãos de trigo têm tamanho e cor variáveis, e o formato oval, com as extremidades arredondadas podendo ser: longos (7 mm), como os ingleses, os australianos e da maior parte das variedades do gênero *Triticum*; curtos (4 a 6 mm) como os da variedade Marquis, base do tipo Monitoba; e medianos (6 a 7 mm), como os do trigo duro de inverno (IAPAR, 2001). Em uma das extremidades, encontra-se o gérmen e na outra, cabelos finos. Ao longo do lado ventral nota-se uma reentrância, conhecida como "crease". A presença deste sulco é um fator que dificulta e particulariza o processo de moagem do trigo, uma vez que um processo simples de abrasão para a retirada da casca não seria possível (EMBRAPA, 1984).

### 2.1.3 Classificação do trigo

Pode-se observar duas formas básicas de classificação do trigo: botânica e comercial. A primeira, mundialmente padronizada, define segundo suas características biológicas, no entanto a segunda varia de país para país em função dos hábitos, cultura e necessidades de consumo e são definidas a partir de características físico-químicas e aptidões à manufatura de produtos correlatos (EMBRAPA, 1984).

#### 2.1.3.1 Classificação botânica

Família: Poaceae

Tribo: *Triticeae*

Subtribo: *Triticinea*

Gênero: *Triticum*

Espécie: *Triticum aestivum*

#### 2.1.3.2 Classificação comercial

A comercialização dos grãos de trigo segue a legislação brasileira que prevê cinco classes de trigo selecionadas em função de características reológicas do glúten e de atividade da  $\alpha$ -amilase (Tabela 1), conforme Instrução Normativa nº 7, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 15 de agosto de 2001, denominada "Norma de Identidade e Qualidade do Trigo" (BRASIL, 2001).

**Tabela 1** - Classificação brasileira de trigo segundo a Instrução Normativa nº 7.

Classe de Trigo	Alveografia ( $10^4$ J)	Número de queda (s)
	Mínimo	Mínimo
Brando	50	200
Pão	180	200
Melhorador	300	250
Outros usos	Qualquer	<200
Durum	-	250

Fonte: Brasil (2001).

#### 2.1.4 Produção mundial de trigo

A produção mundial do trigo ultrapassa 608 milhões de toneladas anuais (Tabela 2). Os países com maior exportações são Argentina, Austrália, Canadá e E.U.A, e o principal importador é a Europa Oriental (BRUNS et al., 1999).

**Tabela 2** - Produção mundial de trigo em milhões de toneladas nos diferentes países no período de 2003 a 2004.

PAÍS	Ano	
	2003	2004
União Européia	106.57	129.69
China	86.49	2.174,2
Índia	65.10	72.00
Estados Unidos	63.59	57.78
Rússia	34.10	43.50
Canadá	23.50	24.50
Austrália	24.92	24.00
Paquistão	19.19	19.00
Oriente Médio	16.83	17.67
Ucrânia	3.60	16.00
África	16.34	16.48
Argentina	13.50	14.50
Kazaquistão	11.50	12.00
Brasil	5.85	5.00

Fonte: USDA (Maio e Agosto/2004).

#### 2.1.5 Produção brasileira de trigo

O Brasil é tradicionalmente um país importador de trigo com dependência externa de 4,4 milhões de toneladas, o consumo interno anual corresponde a 10,2 milhões de toneladas, com uma produção de 5,89 milhões de toneladas.

#### 2.1.6 Produção por estados

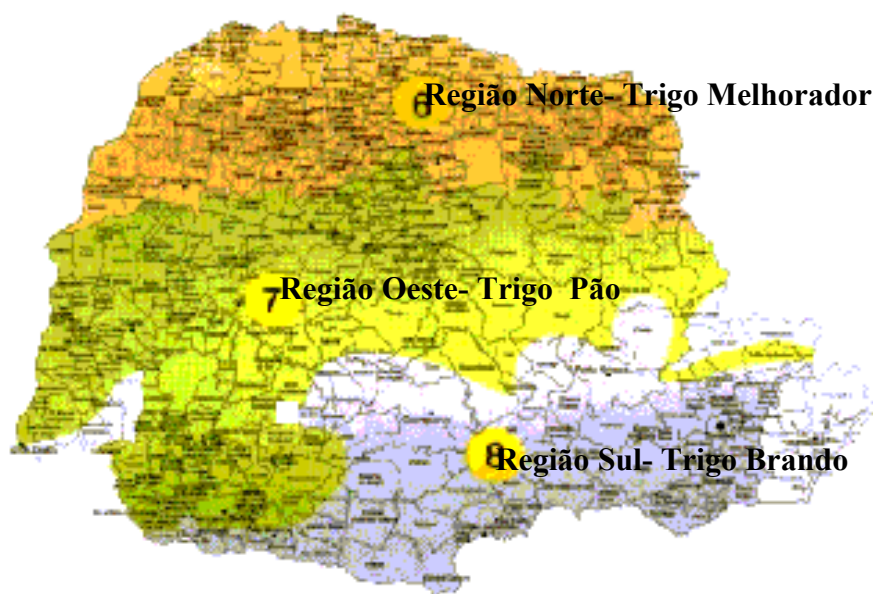
Desde a década de 80 o Paraná tem sido o estado de maior produção de trigo do Brasil atualmente correspondendo em torno de 48,2 % da produção nacional, em segundo lugar o Rio Grande do Sul com 850.000 mil toneladas, os dois estados são responsáveis por cerca de 90% da produção brasileira de trigo (ZYLBERSZTAJN et. al., 2004) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Produção nacional de trigo em milhões de toneladas em diferentes estados brasileiros no período de 2003 a 2004.

ESTADOS	ANO	
	2003	2004
Paraná	2.594,0	3.082,3
Rio Grande do Sul	2.346,0	2.174,2
Mato Grosso do Sul	184,1	221,0
Santa Catarina	159,5	167,5
São Paulo	104,7	110,0
Goiânia	66,4	82,8
Mato Grosso	30,8	51,5
Distrito Federal	5,5	5,5

Fonte: CONAB (2004)

Há milênios que o trigo se destaca mundialmente, graças à sua importância alimentar. A (Figura 3) mostra a regionalização da cultura nos campos paranaenses (IAPAR, 2002).



**Figura 3** – Regionalização do cultivo do trigo de acordo com a classe comercial no estado do Paraná.

Dentro desta regionalização a região oeste do Paraná, município de Assis Chateaubriand, tem sido, historicamente, o principal produtor de trigo do estado. Em 2002, o cultivo de trigo apresentou, no Brasil, o maior acréscimo de área plantada (10,8%) em relação à safra anterior, valor esse superior a expansão observada para a soja (9,8) nesse mesmo período (ZYLBERSZTAJN et al., 2004).

### 2.1.7 Armazenagem de grãos

Desde o início da década de 50, estudos ecológicos chamaram a atenção para a possibilidade de avaliação das condições de armazenamento de grãos de cereais, através do estudo de sua microbiota fúngica para conhecer e controlar os fatores envolvidos na produção de micotoxinas (POZZI & CORREIA, 1994).

O armazenamento e a manipulação inadequada dos produtos podem aumentar as perdas de qualidade, caracterizada pelo aumento da suscetibilidade à contaminação por fungos, insetos, ácaros, diminuição do poder germinativo, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais (como perda de carboidratos, proteínas, vitaminas, entre outros) (LACEY et al., 1991; POMERANZ, 1982).

As perdas de estoques na cadeia produtiva e de comercialização no Brasil são significativas, como exemplo, pode-se citar o trabalho desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), intitulado “Perdas na Agropecuária Brasileira” (BRASIL, 1993), o qual aponta que as perdas anuais dos principais grãos produzidos (arroz, milho, soja, trigo e feijão) alcançam US\$ 1.340.000.000,00 equivalentes a 9,029 milhões de toneladas anuais. Esse quantitativo poderia suprir a carência alimentar anual de 24 milhões de pessoas adultas. O mesmo informa que se perde, do valor citado, cerca de 1 bilhão de dólares, em decorrência das imperfeições no sistema de escoamento e armazenamento da safra (BESKOW & DECKERS, 2002). Segundo Christensen & Kaufmann (1974) um programa para evitar as perdas durante o armazenamento dos produtos agrícolas, resultaria em um aumento de 10 a 20% de alimentos para os povos.

Os principais danos causados por fungos em sementes ou grãos armazenados e o aparecimento de eventos desfavoráveis são:

- Decréscimo de germinação;
- Descoloração de parte ou de todo o grão;
- Aquecimento e “mofo”;
- Transformações bioquímicas;
- Produção de toxinas;

- Modificações celulares e outros.

Qualquer destas mudanças, incluindo produção de toxinas, pode ocorrer sem que o fungo responsável por elas se torne visível a olho nú.

O processo de deterioração que ocorre em grãos armazenados, pode ser acompanhado pelo aumento de ácidos graxos, constituindo-se o ranço. Este ranço resulta da oxidação ou hidrólise da matéria graxa, pela catalisação da enzima lipase dando origem aos ácidos graxos livres. Quando os grãos são armazenados com alto teor de umidade em temperaturas elevadas, há a conseqüente formação de ácidos graxos livres, sendo este processo acelerado pela ação dos fungos presentes. Estas transformações são de suma importância para os grãos oleaginosos, como o algodão, que podem ter o seu óleo impróprio para o consumo humano. Pelo controle de umidade e temperatura do grão ou da semente pode-se reduzir a incidência e a população de fungos no armazenamento (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1974).

#### 2.1.8 Período de armazenamento

A interação entre a disponibilidade de água e a temperatura determina o tempo em que os grãos podem ser armazenados com segurança. O período de armazenamento pode ser aumentado com a redução da atividade da água dos alimentos. Tal procedimento pode ser efetuado pela secagem adequada, pela diminuição da temperatura, ou ainda, em ambientes com ar refrigerado. Os grãos mantidos em temperatura de 10°C reduzirão a velocidade do desenvolvimento dos fungos, proporcionando maior segurança no armazenamento (LACEY et al., 1991).

Segundo Ominski (1994), o tempo de crescimento máximo e a produção de micotoxinas dependem da espécie fúngica e do substrato, observou-se que o *A. alutaceus* em semente de soja produziu mais ocratoxina A após 26 dias de incubação. A partir disto a toxina começou a diminuir, sugerindo que a mesma possa ter sido metabolizada devido à escassez de nutrientes no meio. Paralelamente, foi observado que a toxina continuou aumentando em todos os outros substratos (trigo, milho e amendoim).

### 2.1.9 Prevenção no armazenamento

De acordo com os estudos de Rezende (2002), a tomada de medidas preconizadas dos conceitos da Análise e Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC/HACCP) na armazenagem de grãos, deve estar incorporada no conceito da cadeia produtiva, implicando em se adotar medidas de controle e segurança para permitir a produção de produtos com qualidade, acima de tudo, para atender as expectativas das indústrias de alimentos e as necessidades dos consumidores, essas medidas introduzirão uma nova filosofia de trabalho nas unidades armazenadoras.

As unidades armazenadoras devem ser asseguradas que sejam bem secas e que não permitam a entrada de água por infiltração ou goteiras. Algumas medidas que devem ser tomadas são:

- Manter o armazém sempre limpo;
- Fazer o controle de insetos tanto na estrutura como no produto, com tratamentos preventivos e corretivos;
- Fazer controle de roedores e de pássaros;
- Não deixar produto em contato com chão e paredes;
- Monitorar a umidade relativa do ar e a temperatura;
- Manter ambiente onde o produto está estocado ventilado, para evitar superaquecimentos e condensações; e
- Inspeccionar com frequência o armazém, contra danos físicos de estruturas e infestações.

### 2.1.10 Limpeza dos armazéns

A limpeza dos armazéns é a operação que visa, principalmente, evitar a formação de focos de propagação dos insetos. Os armazéns e arredores devem ser rigorosamente limpos, eliminados todos os resíduos das instalações, nos corredores, nas passarelas, nos túneis, nos elevadores, nas moegas etc. Periodicamente deve ser varrido e eliminado todo material que pode oferecer condições para proliferação de insetos, fungos e roedores, é aconselhável que os resíduos de grãos e o pó coletado sejam queimados ou enterrado, para evitar essas proliferações (LORINI, 2003).



Além da limpeza dos armazéns, das instalações e do processo industrial como um todo, se faz necessária à implementação de medidas preconizadas como sistema APPCC (Análises de Perigo e Pontos Críticos de Controle), MIP (Manejo Integrado de Pragas de grãos armazenados), ou até mesmo, simples medida como 5 S (Cinco sentidos). De acordo com Rezende (2002) em um “Programa de Boas Práticas de Fabricação” as medidas recomendadas se inserem nos princípios de higiene e nas práticas sanitárias envolvidas em todo o processo.

## **2.2 Fatores Ambientais que Favorecem o Desenvolvimento de Fungos e a Produção de Micotoxinas**

Os fatores que provavelmente influenciam a produção de micotoxinas incluem: conteúdo de umidade dos grãos, temperatura, tempo de armazenamento, integridade das sementes, níveis de dióxido de carbono e oxigênio, quantidade de esporos, interações microbianas e vetores invertebrados. Entretanto, temperatura e umidade são os fatores primordiais para o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas (FRISVAD & SAMSON, 1991; HESSELTINE, 1976; WETZEL, 1987). Embora a degradação, o crescimento fúngico e a formação de micotoxinas resultem de complexas interações desses fatores, o entendimento de cada fator envolvido é essencial para a compreensão dos processos, prognósticos e prevenção da produção das micotoxinas (OMINSKI et al., 1994).

### **2.2.1 Atividade de água**

O conceito de atividade de água foi introduzido na microbiologia por Scott (1957), quando demonstrou a relação da atividade de água (Aa) nos alimentos e habilidade dos microrganismos desenvolverem-se nos mesmos. A atividade de água é a relação entre a pressão do vapor de água no substrato e a pressão do vapor de água pura nas mesmas condições.

Em muitas situações práticas a Aa é um fator intrínseco dominante na manutenção ou

degradação de alimentos. O conhecimento das relações dos fungos com a água possibilitará um prognóstico do período de conservação dos alimentos e o potencial de fungos deteriorantes (PITT & HOCKING, 1997).

A água disponível para o crescimento de microrganismos em grãos pode resultar de uma secagem inadequada antes do armazenamento, penetração de chuvas ou neve no espaço físico, ou ainda, pela migração da umidade devido aos gradientes de temperatura dentro dos depósitos de armazenamento (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1974; LACEY, 1989). Infestação por insetos também pode propiciar o aumento da temperatura durante atividade metabólica, levando a água para outras partes dos grãos (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1974).

### 2.2.2 Temperatura

A temperatura é outro fator que influencia o crescimento e a atividade de todas as formas de vida. Alguns fungos podem cessar o crescimento em temperatura de 0°C, enquanto outros apresentam aumento do crescimento em temperatura de 55 °C a 60°C (LACEY, 1989). O perfil da temperatura está sujeito a outras condições do meio.

A temperatura ótima de crescimento dos fungos situa-se entre 25°C e 30°C, embora algumas espécies de *Aspergillus* desenvolvam-se mais rapidamente em temperaturas acima de 30°C em regiões tropicais, em temperatura ambiente, crescem durante a armazenagem. Essas faixas são afetadas por outros fatores tais como: umidade, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes (SCUSSEL, 2002).

A temperatura e a umidade dos grãos constituem elementos determinantes na ocorrência de insetos e fungos durante o armazenamento, o teor de umidade do grão é outro ponto crítico para uma armazenagem de qualidade, grãos com altos teores de umidade tornam-se muito vulneráveis a serem colonizados por grandes populações de insetos e fungos (SANTOS, 2002).

### 2.2.3 Umidade relativa do ar

A disponibilidade de água para o crescimento de microrganismos em grãos está determinada pelo potencial de água subordinado aos tecidos dos mesmos, porém o controle dos níveis de água

no substrato é determinado pela quantidade de chuva, umidade relativa do ar, além de outros fatores, sendo que, a umidade relativa do ambiente é de fundamental importância na determinação do teor de água dos grãos e crescimento superficial de microrganismos (LACEY et al., 1991).

O armazenamento dos alimentos em baixas condições de umidade relativa é um fator relevante no controle do desenvolvimento microbiano, tal que, se o alimento apresenta atividade de água próxima a 0,60 e é submetido à alta umidade relativa esta permite absorção da água nos tecidos ao ponto em que possa haver o crescimento de microrganismos. Por outro lado, alimentos com atividade de água elevada apresentam perda da água quando armazenados em ambientes com baixa umidade relativa (JAY, 1996).

A maioria dos fungos que se desenvolve em grãos armazenados começa a proliferar em teores de umidade acima de 13,5%, sendo a atividade de água (Aa) mínima para o crescimento das principais espécies de fungos toxigênicos próxima a 0,77 (FRISVAD & SAMSON, 1991).

### **2.3 Infestação de Pragas em Grãos de Cereais Armazenados**

Uma grande variedade de contaminantes pode atacar e infestar os alimentos “*in natura*” durante a fase final de maturação no campo, colheita, armazenamento e processamento, afetando assim a qualidade, ocasionando perdas por rejeição e/ou condenação do produto final (POMERANZ, 1982; LACEY et al. 1991).

De acordo com Lorini (2003), as perdas no peso de grãos, ocasionadas por pragas em armazéns, presença de fragmentos de insetos nos subprodutos alimentares, deterioração da massa de grãos, contaminação fúngica, presença de micotoxinas, são efeitos negativos a saúde humana e animal, e as dificuldades para exportação de produtos e subprodutos brasileiro devido ao potencial de risco de contaminação, constituem um dos problemas que a má armazenagem de grãos traz para a sociedade brasileira.

Lorini (2003), destaca que é necessário e importante o conhecimento do hábito alimentar de cada praga para definir o manejo a ser implementado na massa do grão. Segundo esse hábito, as pragas podem ser classificadas em:

a) Pragmas primárias: são aquelas que atacam os grãos inteiros e sadios e, dependendo da parte do grão que atacam, podem ser denominadas pragmas primárias internas perfuram os grãos e neles penetram para completar seu desenvolvimento. Alimentam de todo interior do grão e possibilitam a instalação de outros agentes de deterioração, exemplos dessas pragmas são as espécies *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* e *S.zeamais*.

b) Pragmas secundárias: são aquelas que não conseguem atacar os grãos inteiros, pois requerem que os grãos estejam quebrados ou danificados, até mesmo por pragmas primárias, para deles se alimentarem. Multiplicam-se rapidamente e causam prejuízos elevados, exemplos são as espécies *Cryptolestes ferrugineus*, *Oryzaephilus surinamensis* e *Tribolium castaneum*.

A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois através de sua atividade metabólica há um aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos (ATUI & LÁZZARI, 1998).

Segundo Groff (2002), os grãos não devem ser colhidos em seu ponto de maturação fisiológica devido o alto teor de umidade, aproximadamente 30%, o que impedem a colheita, estas simples postergação já causa algumas perdas decorrentes desde a simples respiração dos grãos no curso de suas atividades metabólicas, até a ação de organismos externos como insetos e fungos.

O sistema de acompanhamento de pragmas que ocorrem na massa de grãos armazenados é de fundamental importância, pois irá detectar o início de qualquer infestação que poderá alterar a qualidade final do grão. O monitoramento está baseado em um eficiente sistema de amostragem de pragmas, por qualquer método empregado, e na medição de diversas variáveis que influem na conservação do grão armazenado. Dessa forma, com o método eficaz e com o acompanhamento contínuo, chega-se à determinação de todos os fatores que podem interferir na conservação de grãos (LORINI, 1999).

Segundo Lorini (2003) a resistência a inseticidas está aumentando mundialmente e constitui

um dos maiores problemas de controle de pragas na atualidade, já existem documentadas 447 espécies de insetos e de ácaros que desenvolveram resistência a um ou mais grupos químicos.

Santos et al. (1991) avaliaram as condições higiênicas de 50 amostras de matérias primas, para o preparo do mingau e de bebida láctea destinadas à merenda escolar, utilizando o método da AOAC. Identificaram a presença de matérias estranhas leves (insetos, seus fragmentos e larvas) e de partículas metálicas, encontrando fragmentos de insetos em 66% das amostras de misturas para bebida láctea e em 62% das amostras de mingau. Não foram encontrados insetos inteiros e larvas nas amostras analisadas. Para pesquisa de partículas desenvolveu-se um método onde a amostra é dissolvida na água e agitada com uma barra magnética que atrai partículas e possibilita a sua contagem, verificou-se que 30% das amostras de misturas para bebida láctea e 44% das amostras para mingau continham partículas metálicas.

Zamboni e Atui (1989), ao pesquisarem massas alimentícias ou macarrão, que tem como principal matéria-prima a farinha ou sêmola de trigo, verificaram que estes podem apresentar contaminação biológica causada pelos próprios ingredientes, ou adquirida na sua elaboração. Os principais contaminantes encontrados em massas alimentícias são fragmentos de insetos originários do trigo, contaminado por pragas do campo ou nos armazéns, empregado na sua fabricação, pela manipulação ou estocagem de farinha em condições higiênicas insatisfatórias, e pelos insetos que atacam o macarrão durante a sua elaboração.

Atui et al. (1998), analisaram a presença de matérias estranhas no milho em grão e após o seu processamento em grits e fubá, fornecidas pela indústria, de acordo com a produção diária, durante um período de quatro meses. As análises foram baseadas nos métodos descritos na AOAC, (BRASIL, 1994) e no Manual de Análises Microscópica de Alimentos (ZAMBONI et al., 1986). Das 81 amostras de milho em grão analisados pelo método de peneiração, 29,6% apresentaram insetos vivos, 28,4% insetos mortos e 72,8% partículas metálicas. Pelo método da investigação interna, 79,0% das amostras apresentaram larvas inteiras, 43,2% cabeças de larvas, 37,05 cabeças de insetos e 27,2% insetos inteiros. Das amostras de grits, analisadas pelo método de flutuação, 76,5% apresentaram fragmentos de insetos enquanto que as mesmas amostras, analisadas pelo método de peneiração, apresentaram predominância em 81,5% de partículas metálicas. Observou-se alta contaminação de fubá por larvas (75,3%). Devido ao número de fragmentos de insetos e à presença de larvas mortas, pupas e insetos mortos, ácaros e pêlos de animais não identificadas, 79% das amostras de fubá estavam em desacordo com a legislação em

vigor. Ocorreu um aumento nos níveis de matérias estranhas no grãos e fubá a partir do grão de milho infestado.

Em seu trabalho Silva et al. (2003), estudaram o crescimento populacional de *Rhizoperha dominica*, em trigo com diferentes temperaturas e teor de umidade de 11,1%, armazenado por 90 dias, nas temperaturas de 16, 20, 24, 28, 32, e 36°C e infestado com níveis de densidade populacional de 0,0; 1,3; 2,7; 4,0; 5,3; 6,7; 8,0; e 9,3, insetos/kg. Constatou que o maior crescimento populacional de insetos ocorreu na temperatura de 33,3°C e diminuiu drasticamente nas temperaturas inferiores a 32°C. As populações de *R. dominica* declinaram, mas não foram extintas em 90 dias de armazenagem a 16°C. O crescimento foi afetado pelo tamanho da população que iniciou a infestação, quanto maior foi o nível de infestação inicial, maior foi o crescimento populacional ao longo do tempo de armazenagem.

#### **2.4. Microbiota Fúngica e Micotoxinas em Trigo**

Ainda não se conhecem as causas dos altos níveis de crescimento fúngico, que ocorrem nos grãos antes da colheita. Certamente, tais fungos aeróbicos são mais prevalentes em condições quentes e úmidas e, danos ocasionados por insetos em produtos agrícolas parecem favorecer a contaminação por fungos. Infelizmente a inspeção visual dos grãos colhidos pode causar engano na estimativa de conteúdo de micotoxinas. Isto quer dizer que, só porque os grãos parecem estar contaminados por fungos, não significa que haja presença de toxinas prejudiciais. No armazenamento os principais fatores que afetam o crescimento fúngico são também temperatura e umidade. Quanto maior a temperatura, maior a chance para o crescimento fúngico. Porém, o crescimento desses organismos não ocorre se os grãos apresentarem menos de 14 a 15 % de umidade. Infelizmente em muitos casos de armazenamento de grãos, cria-se um microclima ideal para o crescimento de cepas de fungos, o que pode ocasionar a produção de micotoxinas, contaminando os produtos agrícolas.

A importância das micotoxinas no trigo e em alimentos em geral, deve-se ao fato de que estes metabólitos secundários podem causar efeitos toxicológicos graves quando consumidos (SCUSSEL, 2002).

Um grande problema das micotoxicoses está associado com grãos armazenados e outros

concentrados de rações, principalmente com alta umidade. Os fungos toxigênicos são ubíquos, podem se desenvolver e elaborar toxinas em uma variedade de substratos quando as condições de umidade, temperatura e aeração são favoráveis.

As principais micotoxinas detectadas em cereais incluem as aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina, fumonisina e os tricotecenos principalmente toxina T-2, deoxinivalenol e nivalenol. A incidência varia com as condições climáticas prevalentes no período da colheita, durante o transporte e secagem (SMITH & MOSS, 1985).

Segundo Ominski et al. (1994), os fungos representam a segunda maior causa de deterioração e perda de grãos armazenados e sementes, perdendo apenas para os insetos. Os fungos contaminantes de cereais e grãos foram divididos em dois grupos, de acordo com o momento da contaminação: fungos de campo, que invadem os grãos antes da colheita, enquanto as plantas estão em crescimento no campo, ou depois de estarem cortadas em espigas, antes de serem debulhadas. Para se desenvolverem, requerem altos teores de umidade nos grãos (20 a 21% e pertencem geralmente aos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* e *Fusarium* sp).

Os fungos de armazenagem, por sua vez, necessitam de teores de umidade mais baixos, entre 13 a 18%, e correspondem a várias espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (MEIRELES & REIT-CORRÊA, 1993).

As farinhas de trigo que são freqüentemente utilizadas em preparos industriais e domésticos de alimentos podem vir a ser um bom veículo para contaminantes de vários tipos, inclusive as micotoxinas que por ventura não sejam reduzidas durante a moagem (VIEIRA et al., 1999).

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do cultivo, colheita ou estocagem dos alimentos. Contudo, crescimento de fungos e produção de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo depois que os fungos responsáveis tenham morrido. Os gêneros dos fungos mais comumente associados com toxinas que ocorrem naturalmente são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MARTA et al., 1996).

#### 2.4.1 Fungos toxigênicos

De acordo com a literatura os fungos de depósito ou armazenamento, espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os que mais se proliferam nos grãos armazenados. São considerados a segunda maior causa de deterioração e perda de grãos armazenados e sementes, perdendo apenas para os insetos (OMINSKI et al., 1994). Esses gêneros junto com o *Fusarium* são os maiores produtores de micotoxinas, são capazes de se manterem em desenvolvimento com baixa umidade, produzindo toxinas que reduzem a qualidade nutritiva dos grãos e seu valor de mercado (PUZZI, 1986). A infestação em sementes e grãos pode ocorrer em diversos estágios da cadeia alimentar, colheita, maturação, secagem, armazenagem, etc. (SCUSSEL, 2002).

O conhecimento de que os fungos são microrganismos contaminantes de alimentos e de que seus produtos metabólitos, conhecidos como micotoxinas, são responsáveis pelas intoxicações alimentares no homem e nos animais, data da Idade Média (MEIRELES & REIT-CORRÊA, 1993).

Os alimentos em geral, principalmente os de origem vegetal, são amplamente susceptíveis à contaminação e à proliferação de microrganismos presentes nos vegetais e no solo, de onde são veiculados pelo ar (FRISVAD & SAMSON, 1991; OMINSKI et al., 1994). Os alimentos são raramente livres de contaminação microbiana; o número e o tipo de microrganismos presentes diferem com o estágio de desenvolvimento e de maturação (LACEY, 1975).

Os fungos intermediários invadem os grãos antes da colheita e continuam a crescer e causar dano durante o armazenamento. Nessa categoria enquadram-se algumas espécies de *Penicillium*, *Fusarium* e certos levedos (LAZZARI, 1993). No período pós-colheita, transporte e armazenamento de produtos agrícolas, o crescimento fúngico pode ser influenciado por muitos fatores, principalmente pela umidade, temperatura, aeração, danos provocados por insetos, e tempo de armazenamento, entre outros.

Além das espécies de fungos deteriorantes, dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais são considerados indicadores de qualidade de sementes e grãos armazenados, existem outros fungos (de campo e de armazenagem) considerados muito importantes por causarem dano à saúde, são os fungos toxigênicos (SCUSSEL, 2002).



Segundo Lazzari (1993), existe pouco ou nenhum controle sobre as condições que favorecem o desenvolvimento de fungos de campo, pois eles invadem a cultura durante os estágios finais de amadurecimento. Os fungos de campo mais comuns são *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*.

Pozzi & Correa (1994), analisaram a microbiota fúngica de 130 amostras de grãos de milho pós-colheita, por um período de 1 ano, isolando os fungos em agar Sabouraud-dextrose, acrescido de cloranfenicol, e agar batata, utilizando técnicas micológicas usuais. A ocorrência de micotoxinas foi pesquisada utilizando-se cromatografia em camada delgada. O *Fusarium verticilliode* foi o fungo mais freqüente, seguido dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e mais 10 gêneros de fungos filamentosos, isolados de grãos com conteúdo de umidade de 12,3 a 17,8 %, temperatura média de 18,4 a 24,1° C, e umidade relativa do ar entre 64 e 87,8 %. As análises micotoxicológicas não revelaram a presença de micotoxinas.

#### 2.4.2 Micotoxinas e micotoxicoses

Micotoxinas são compostos orgânicos de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários tóxicos por várias espécies de diferentes gêneros fúngicos, com estruturas químicas variadas capazes de reagir com moléculas de DNA, RNA, proteínas funcionais, cofatores enzimáticos e constituintes da membrana celular, além de interferir na atividade hormonal, e diferenciação celular, podem intoxicar seres humanos e animais, de forma direta ou indireta, que ocorrem em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas. Os fungos produtores de micotoxinas são capazes de contaminar esses produtos agrícolas durante a produção, processamento, armazenamento e estocagem (HSIEH, 1997, BADIALE-FURLONG et. al., 2003).

As micotoxinas passaram a ter importância como contaminante tóxico de alimentos e rações a partir da severa ocorrência da “*Turkey X disease*” na Inglaterra, em 1960 que foi responsável pela morte de mais 100.000 perus. Compostos fluorescentes, observados em um dos componentes da ração, foram relacionados com a causa da misteriosa doença. Essas substâncias fluorescentes foram mais tarde identificadas quimicamente e denominadas aflatoxinas uma palavra derivada do principal fungo que as sintetizam, *Aspergillus flavus*.

No Brasil a atual legislação para micotoxinas ainda é bastante omissa, tanto aos níveis estabelecidos quanto aos alimentos a serem monitorados. Atualmente, existe apenas limite de 20 ppb da somatória das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> para alimentos em geral para o consumo humano, alimentos para o consumo animal, matéria-prima e rações limite de 50 ppb (RDC – nº 274).

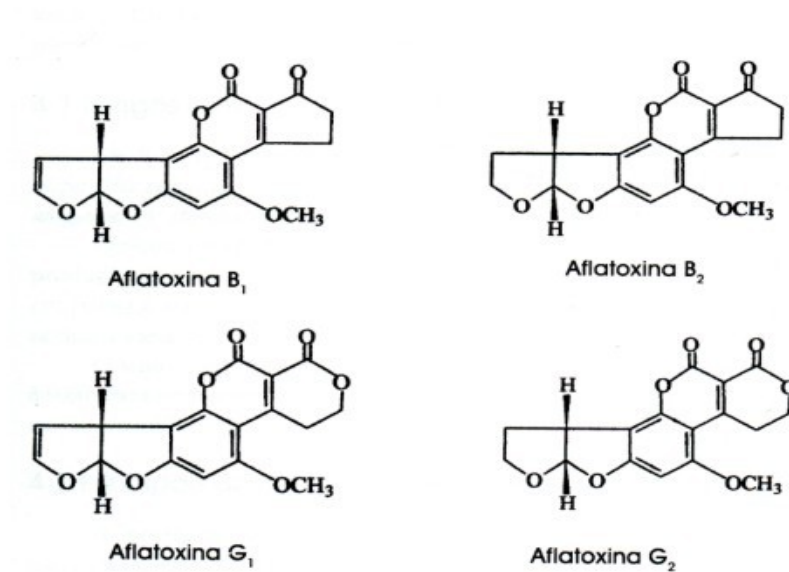
Os estudos sobre micotoxinas e micotoxicoses foram enfatizados com ração à base de torta de amendoim, importado do Brasil; este episódio ficou conhecido como a Doença X dos perus (MEIRELLES & REIT-CORRÊA, 1993, SCUSSEL & RODRIGUES-AMAYA, 1984, SCUSSEL, 1998).

Segundo Pohland (1993), acima de 300 micotoxinas já foram identificadas, produzidas por cerca de 350 espécies de fungos. Entre estas, aproximadamente 20 são consideradas de risco para a saúde humana como contaminantes de alimentos. Estas incluem as aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>), esterigmatocistina, ocratoxina A, citrinina, patulina, ácido penicílico, zearalenona, tricotecenos (toxina T-2), diacetoxiscirpenol, neosolaniol, diacetilnivalenol, toxina HT-2, fusarenona-X (SCUSSEL, 2002).

Os proeminentes sítios de atuação das micotoxinas através da administração oral incluem, microbiota gastrointestinal, células epiteliais do intestino, fígado, sistema circulatório e órgãos extrahepático. O processo de toxicidade das micotoxinas é significativamente influenciado pelo metabolismo da enzima presente no sítio de atuação, especialmente no fígado, interações com os constituintes do sangue e acumulação no órgão alvo (HSIEH, 1997).

#### **a) Aflatoxinas**

A aflatoxina constitui um grupo de toxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são identificadas como B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 4). Sendo que as iniciadas B e G devem-se ao fato destas apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta, (SILVA, 2000).



**Figura 4** - Estrutura química das aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> G<sub>2</sub>).

São conhecidas 17 substâncias do grupo das AFs, porém as mais comuns nos alimentos são as AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. Na maioria dos isolados, a AFB<sub>1</sub> é produzida em grandes quantidades, as AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> são comumente produzidas por *A. flavus* enquanto que o *A. parasiticus* produz AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (DIENER et al., 1987; ROGER, 1991).

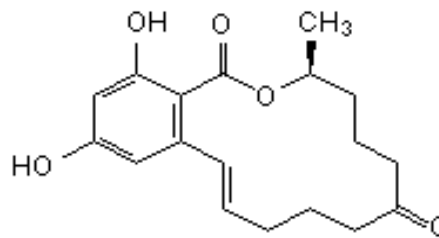
Outras aflatoxinas já foram isoladas de leite, carne e urina de animais, como é o caso das aflatoxinas (AFM<sub>1</sub>) e (AFM<sub>2</sub>), metabólicos das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, respectivamente. Estas micotoxinas são produzidas no fígado dos animais poucas horas após a ingestão de alimentos contaminados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979).

Os resultados obtidos por Gelli et al. (1990) indicam que a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* é alta nos produtos alimentícios, demonstram que os fungos podem produzir e liberar aflatoxinas, na dependência de condições favoráveis que permitam o seu ciclo biológico completo, incluindo evidentemente a fase de esporulação.

Gloria et al. (2004) investigando a contaminação com aflatoxinas entre quatro frações separadas de acordo com as regras brasileiras de classificação do milho, a fração que continha grãos ardidos, mofados, queimados e brotados normalmente possuía os níveis mais altos de aflatoxina.

## b) Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é um importante metabólito fúngico sintetizado por espécies de *Fusarium*, com potente ação estrogênica (BETINA, 1985; MARANAS et al., 1984) e anabolizante em animais (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974). Quimicamente, é um derivado do ácido resilcílico, envolvendo nove moléculas de acetato (Figura 5), originadas por biossíntese poliacética. O composto foi extraído originalmente de cultura de *Gibberella zea*, o estágio sexual de *Fusarium graminearum*. Esta cultura tem sido isolada de milho embolorado associado com síndrome estrogênica em suíno (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1965).



**Figura 5** - Estrutura química da zearalenona.

A ZEA é reconhecida por causar problemas reprodutivos, especialmente *anestrus* e vulvovaginite em suínos. Existem controvérsias a respeito da toxicidade para ruminantes. Alguns casos registrados em campos sugerem diminuição da fertilidade, vaginites e persistência *estrus* (KRAMIS et al., 1984; MIROCHA, 1987).

Estudos realizados por McMilliam et al. (1983), em 64 amostras de sorgo, recém-colhido em áreas agrícolas da Geórgia, constataram incidência de 31% de ZEA em níveis de 2 a 1468 mg/kg. A consistência de AF em 35% das amostras não rejeita a possibilidade de formação de micotoxinas em grãos ainda no campo.

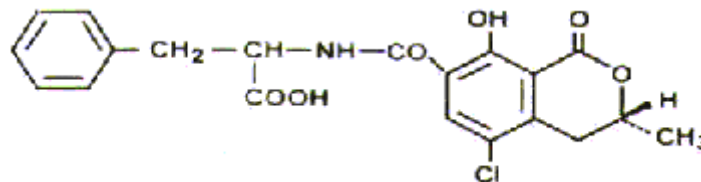
Gimeno (1983), analisando a ocorrência de ZEA em milho, sorgo e trigo, relatou a presença da toxina em todas as amostras analisadas. As espécies *F. moniliforme* e *F. roseum* estavam presentes em todas as amostras, exceto em grãos de sorgo. ZEA tem sido encontrada em milho, trigo, sorgo, aveia, cevada e ração animal, contudo o milho é o produto que mais apresenta contaminação por ZEA. Relatos envolvendo o milho tem surgido com frequência no Canadá,

Inglaterra, França, Estados Unidos, Rússia, Iugoslávia e alguns países Africanos (COKER et. al., 1983).

Análises realizadas por Dutton & Kinsey (1995) em 417 amostras de produtos agrícolas e ração animal, demonstraram presença de várias micotoxinas entre elas a zearalenona, as aflatoxinas e a fumonisina B<sub>1</sub>.

### c) Ocratoxina A

As ocratoxinas foram descobertas em 1960, na África do Sul durante pesquisas laboratoriais de novos metabólitos tóxicos produzidos por bolores. Em 1965, Van Der Merwe et al., isolaram ocratoxina A produzida por culturas de *A. ochraceus*. Investigações subseqüentes revelaram que vários fungos incluindo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* eram capazes de produzir ocratoxina, destacando-se *A. ochraceus*, *P. viridicatum* (STEYN, 1984), *P. purpurenscens* (LILLEHOJ & GORANSSON, 1980) (Figura 6).

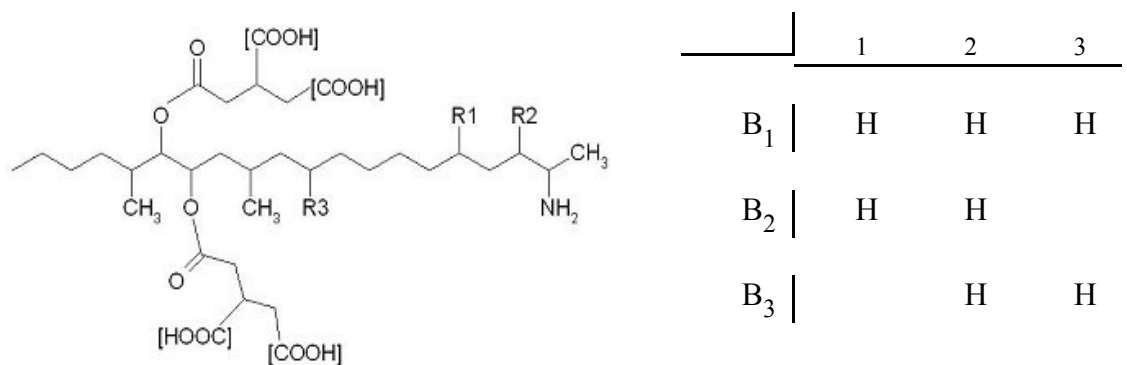


**Figura 6** - Estrutura química da ocratoxina A.

A produção desta toxina assim como as demais estão relacionadas com a espécie fúngica, substrato, temperatura e atividade de água. A primeira ocorrência natural foi registrada por (SHOTWELL et al., 1969) como contaminante de milho nos Estados unidos. Os produtos agrícolas constantemente contaminados são cereais, principalmente milho, trigo, cevada, aveia, sorgo, amendoim, centeio SHOTWELL et al. (1969), feijão e rações produzidas à base de produtos agrícolas (HARVEY et al., 1987).

#### d) Fumonisin

Fumonisin, micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (*F. verticillioides* e *F. proliferatum*), de acordo com a literatura, são mais encontradas em milho e produtos derivados. Sendo a ocorrência natural das formas FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> (Figura 7), consideradas toxicologicamente importantes um potencial de ameaça à saúde humana e animal e a FB<sub>1</sub> a mais importante deste grupo (GELDERBLOM et al., 1992; VISCONTI et al., 1994).



**Figura 7** - Estrutura química das fumonisin.

Desde a sua descoberta (BEZUDENHOUT et al., 1988) vem sendo associada às doenças em animais, tais como LEME em equinos edemas pulmonar, hidrotórax e distúrbios cardiovasculares em suínos incluindo efeitos nefrotóxicos, hepatóxicos e imunossupressores em várias espécies de animais Embora seu efeito em humanos ainda não esteja perfeitamente estabelecido, estatisticamente é associado ao câncer de esôfago (EC) em algumas regiões tais como Transkei/África do Sul (CHU, 1994) sendo relatado como possível carcinogênico para humanos, grupo 2B, pela International Agency for research on Câncer (IARC, 1993).

As fumonisin são elaboradas a partir de uma estrutura que é característica da esfinganina, um composto intermediário na biossíntese dos esfingolipídios (SWEETLEY, 1991). Essas similaridades levaram a hipóteses de que as fumonisin podem interagir com enzimas envolvidas no metabolismo dos esfingolipídios, ou interferir com algumas das funções dos mesmos, ou ambos.

### 2.4.3 Prevenção das micotoxinas

O controle das micotoxinas deveria ser focado dentro de um programa “Controle Integrado”. Este supõe aplicar medidas preventivas em todas as fases de produção do alimento, colheita, transporte e estocagem da matéria-prima até o processamento do produto final. Os controles e as medidas a aplicar devem tornar-se extensivas às etapas (Fundação Ibérica de Segurança Alimentar, 2003).

#### **Cultivo do alimento:**

- Seleção das variedades;
- adoção de práticas agrícolas corretas;
- controle de insetos e pragas;
- fertilização;
- rotação dos cultivos.

#### **Período de colheita:**

- Colher imediatamente o produto ao atingir a maturidade fisiológica;
- limpeza dos grãos;
- secagem até níveis seguros de umidade, tão logo quanto seja possível, de maneira a atingir no produto uma atividade de água segura.

#### **Armazenagem, transporte e distribuição:**

- Controle de insetos;
- controle de umidade;
- controle de temperatura;
- limpeza das instalações.

## 2.5 Referências Bibliográficas

- AOAC – OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Sujidades, in Hidrólise ácida Method, AOAC Official Method 982.31, – 982.32 15° edição, 1990. **Ministério da Saúde** –Portaria 74 de Agosto de 1995, seção 1.
- ATUI, M.B.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.18, n.4, p.363-367. 1998.
- ATUI, M.A.; LÁZZARI, F.A.; ZAMBONI, C.Q. Efeito do processo do milho em grão no nível de matérias estranhas encontradas no grits e fubá. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 57 (1): p. 57-63, 1998.
- BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G.C.; OLIVEIRA, M.dos S.; DE SOUZA, M.M.; KUHN, R.C.; Avaliação da qualidade de farinha de trigo e produtos de panificação comercializadas no Rio Grande Do Sul. IN: Simpósio de ciências de alimentos-Alimentos e Saúde. Florianópolis-SC/UFSC, **Anais...** v.1, p.1-4. 2003.
- BESKOW, P.; DECKERS, D. Legislação Brasileira do Armazenamento de Grãos. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (Eds.) **Armazenagem de Grãos**. Campinas: IBG, p. 27-53. 2002.
- BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins. **J. Chromagr.**, p. 334-41, 1985.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLUM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPTELLER, G.; VLEGGAR, R. structure elucidation of the fumonisins , mycotoxins from *Fusarium moliniforme*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun**, p. 743-45, 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Comissão Técnica para Redução das Perdas na Agropecuária. (Brasília, DF). **Perdas na agropecuária brasileira**: relatório preliminar. Brasília, 1993. v. 1.
- BRASIL – Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento Técnico de identidade e de qualidade do trigo. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Instrução Normativa n. 7, de 15 de agosto de 2001.
- BRUNS, C.; DIOVANI, M.S.C.; BRUNETTA, D.; RIEDE C.R.; ARALDI, A.; HUBNER, O. Cadeia produtiva do trigo, diagnóstico e demandas atuais no Paraná. **Instituto Agrônômico do Paraná- IAPAR**. Londrina. PR. p. 33, 1999.
- CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Deterioration of stored grains by fungi. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 3, p. 69-84, 1965.
- CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Microflora In: CHRISTENSEN, C. M. Storage of cereal grains and their products. St. Paul, Minnesota: **American Association of Cereal Chemists**, p.148-192, 1974.



CHU, F.S. Studies a ochratoxins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.2, p.499-524, 1974.

COKER, R.D.; JEWERS, K.; JONES, N.R.; NABNEY, J.; WATSON, D.H. **Decontaminating aflatoxin – Containing agricultural products**. British Patent 2108365, London, UK, 1983.

DIENER U.L.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; PAYNE, G.A.; LEE, L.S.; KLINCH, M.A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* **Ann. Ver. Phytopatopathol.**, v.25, p. 249-270, 1987.

DUTTON, M.F.; KINSEY, A. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa, 1994. **Mycopathologia**, v. 131, p. 31-36, 1995.

**EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Resumos informativos. Brasília. v. 1, 1984.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Filamentous fungi in foods and feeds, ecology, spoilage and mycotoxins productions, in: DILIP, K.; ARORA, K.G.; MUKERJI, E.; MARTH, H. (Ed) **Handbook of Applied mycology: foods an feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991.

GELDERBLUM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.O.F.; THIEL, P.G.; CAWOOD, M.E. Fumonisin isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathology**, Netherlands, v. 117, p11-16, 1992.

GELLI, S.D.; JAKABI, M.; PORTO, E. Isolamento de *Aspergillus* spp., aflatoxigênicos de produtos alimentícios. São Paulo, Capital. **Revista Instituto Adolfo Lutz.**, v.50, p.319-323, 1990.

GLORIA, E.M.; CIACCO, C.F.; LOPES FILHO, J.F.; ERICSSON, C. ZOCCHI S.S. Distribution of aflatoxin contamination in maize samples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Vol. 24, n. 1, 2004.

GIMENO, A. Mycotoxins-rapid thin layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum, and whet. **J. Assoc. Off. Chem.**, v. 66, p. 565-69, 1983.

GROFF, R. A secagem criteriosa de grãos vegetais. **Grãos Brasil**, Maringá, v.1, n.3, p.16-19, 2002.

HARVEY, R.B.; KUBENA, L.F.; LAWHORN, D.B.; FLETCHER, O.J.; PHILLIPS, T.D. Feed refuse in swine fed with ochratoxin-contaminated grain sorghum: evaluation of toxicity in chickens. **J. Am. Mud. Assoc.**, v.190, p.673-675, 1987.

HESSELTINE, C.W. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. In: RODERICKS, J.V. (Ed.) Mycotoxins and Other Fungal related Food Problems., **American Chemical Society**, p. 1-22. 1976.

HSIEH, D.P.H. **Mode of action of mycotoxins**. In: KROGH, P. Mycotoxins in food. New York: Academic Press, p. 263. 1997.

IAPAR - Instituto Agronômico do Paraná **Informações Técnicas Para a Cultura Do Trigo no Paraná**. Circular nº 116. Londrina-Pr. p.174, 2001.

IAPAR - Instituto Agronômico do Paraná. **Informações Técnicas para a cultura do trigo no Paraná**. Circular nº 122. Londrina, p.166. 2002.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 5 ed. Indian: Chapman & Hall, p.38-66. 1996.

KRAMIS, Y.; HAMMAD, H.A.; HEMEIDA, N.A **Mycotoxicosis with oestrogenic effect in cattle**. *Zuchthygiene*, v.19, p. 130-5, 1984.

LACEY, J. Airborne spores in pastures. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 64, p. 1-17, 1975.

LACEY, J. Preventions of mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors, In: NATORI, S.; HASHI-MOTO, K.; UENO, Y. (Eds) **Mycotoxins and Phycotoxins**, New York: Elsevier, p. 161-8. 1989.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MATFLEET, C. grain fungi. In: ARORA, D.K.; MUKERGI, K.G.; MARTH, E.H. (Eds.) **Handbook of Applied Microbiology: foods and feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991.

LAZZARI, F.A. A redução da qualidade pela atividade fúngica. **Anais...** Simpósio de Proteção de Grãos Armazenados, Passo Fundo, Rs. EMBRAPA-CNPT. p. 70-78. 1993.

LILLEHOJ, E.V.; GORANSSON, B. Occurrence of ochratoxin and citrinin-producing fungi on developing Danish barley grain. **Acta Pathol. Microbid., Scand**, Sect. B, v.88, p. 133-9, 1980.

LORINI, I. Pragas de grãos armazenados. Passo Fundo: **Embrapa** Trigo, 1999.

LORINI, I. Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. **EMBRAPA**. Passo Fundo, RS. 2003. 80p.

MARANAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A Toxigenic *Fusarium* species **Identity and Mycotoxicology**. **Pennsylvania**: Pennsylvania State University Press, 1984, 328p.

MARTA, H.T.; NEUSELY, S. Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção. **ITAL**. p. 55, São Paulo, 1996.

McMILLIAN, W.W.; WILSON, D.M.; MIROCHA, C.J.; WIDSTROM, N.M. Mycotoxin contamination in grain sorghum from fields in Georgia and Mississippi. **Cereal chem**, v. 60, p. 226-31, 1983.

MEIRELES, M.C.A.; RIET-CORRÊA, F. **Introdução ao estudo das micotoxinas**. In: REIT-CORRÊA, F.; MENDES, M.C.; SCHILD, A.L. Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos. Uruguai: Editorial Agropecuária Hemisfério Sur. S.R.L., 1993. P. 21-41.

MIROCHA, C.J.; CHRISTENSEN, C.M. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *fusarium*. In: PURCHASE, F. R. (Ed.) **Mycotoxins**, **Amsterdam: Elsevier**, 1974. p. 129-48.

- MIROCHA, C.J. disputes interpretation of findings in study on zearalenone. **Am. J. Vet. Res.**, v.48, p. 1541-47, 1987.
- OMINSKI, K.H.; MARQUARDT, K.R.; SINHA, R.N.; ABRAMSON, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H.L. **Mycotoxins in grains: compounds other than aflatoxin**. St Paul: Eagan Press, p. 287-312. 1994.
- OSÓRIO, E. A. Trigo no Brasil. **Fundação Cargill**. 620p. 1982.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**, London: Blackie Academic, 1997, 593 p.
- POHLAND, A.E. Mycotoxins in review. **Food Additives and Contaminants**. v. 10, n. 1, p. 17-28, 1993.
- POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. Storage of cereal grains and their products. 3<sup>rd</sup> ed., St. Paul, Minnesota, **Ann. Assoc. Cereal Chem.**, p. 145-247, 1982.
- POZZI, C.R.; CORRÊA, B. Milho pós-colheita e armazenamento microbiota fúngica e ocorrência de micotoxinas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 31, nº1, 1994.
- PUZZI, D. Armazenamento e Abastecimento de grãos. Campinas, **Instituto Campineiro de ensino Agrícola**, 603 p., 1986.
- REZENDE, A.C. Boas Práticas de fabricação de armazenamento: análise de perigos e pontos críticos de controle. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (Ed.) **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, p.399-441. 2002.
- ROGER, J.R.; Aflatoxins. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and Phytoalexins**, Boca Raton: CRC Press., p. 103-143. 1991.
- SANTOS, J. P.; Métodos preventivos de controle de pragas de grãos armazenados In: Lorini, I.; Miike, L. H.; Scussel, M. V. (ed) **Armazenagem de grãos**.Campinas IBG, p. 399-441, 2002.
- SANTOS, M.C.; RODRIGUES, R.M.M.S.; ZAMBONI, C.Q. Matérias estranhas leves e partículas metálicas em misturas para bebida Láctea e mingau destinadas a merenda escolar. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 51 (1/2): p. 07-10, 1991.
- SILVA, A.A.L.; FARONI, L. R.D'A. GUEDES, R.N.C., MARTINS, J.H., PIMENTEL, M.A.G. Modelos analíticos para o crescimento populacional de *Rhizoperta dominica* em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Armazenagem**. Viçosa, MG. V.28, n.2 p.03-10, 2003.
- SILVA, L.C.; **Fungos e micotoxinas em grãos armazenados**. Unioeste. 2000. [www.altavista.com.br](http://www.altavista.com.br)
- SCOTT, W.J. Water reason of food spoilage microorganisms. **Adv Food Res**. v.7, p. 83-127, 1957.

SCUSSEL, V.M.; RODRIGUES-AMAYA, D. Produção de aflatoxinas em amendoim durante a estocagem. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.5, p.141-142, 1984.

SCUSSEL, V.M. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. **Microbiologia em Alimentos**, Florianópolis, Ed. Insular, p. 57-143. 1998.

SCUSSEL, V.M. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. In, LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (Eds) **Armazenagem de Grãos**, Campinas, IBG, p. 739-756. 2002.

SHOTWELL, O.L.; HESSE, T.C.W.; GOULDEN, M.L. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. **Appl. Microbiol.**, v.17, p.765-771, 1969.

SMITH, J.E.; MOSS, M. O. **Mycotoxins: formation analyses and significance**, Chichester: Williley., p.148. 1985.

STEYN P.S. Ochratoxins and related dehydroisocoumarins IN BETINA, U. ed **Mycotoxins—Production, Isolation, Separation and Purification**; **Amsterdam: Elsevier**. p. 183-91. 1984.

SWEELEY, C.C. Sphingolipids. In: VANGE, D.E.; VANCE, J.E. (Ed) **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**, Amsterdam: **Elsevier science Publ.**, p. 327-61.1991.

VIEIRA, A. P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.17, n.2, Campinas. 1999.

VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B.; BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>) in solution. **Food Additives and Contaminants**, v.11, n.4, p.427-431, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mycotoxins environmental health criteria**, 11 Geneva: WHO, p. 21-84. 1979.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos do armazenamento. In SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de Sementes**, Campinas: **Fundação Cargill**. p.260-75. 1987.

ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; SPITERI, N.; RODRIGUES, R.M.M.S.; ATUI, M.B.; PEREIRA, U. **Manual de análise microscópica de alimentos**. São Paulo, p.40, 1986.

ZAMBONI, C.Q.; ATUI, M.B.; Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo. n. 49 (1): 11-17, 1989.

ZYLBERSZTAJN, D.; NEVES, M. F.; FERRAZ, R. M. M.; CASTRO, L. T.; MARINO, M. K.; MIZUMOTO, F. M.; CONEJERO, M. A.; FERREIRA, T. F.; ORATI, R. A. **Estratégias para o trigo no Brasil**. Ed. Atlas S.A. São Paulo. 2004.

## **ARTIGO 1**

**CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO ARMAZENADO E NO PROCESSAMENTO DE FARINHAS DE TRIGO COMUM E ESPECIAL**

**RESUMO**

O trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade do trigo armazenado e das farinhas comum e especial, quanto à contaminação por micotoxinas e fragmentos de insetos. As amostras foram coletadas quinzenalmente no período de abril a maio de 2003, durante o processo de moagem em moinho de trigo da região Oeste do Paraná, por um período de 45 dias correspondendo a 3 lotes amostrados, perfazendo um total de 18 amostras, sendo 9 amostras de trigo seco armazenado, 3 amostras de trigo condicionado, 3 amostras de farinha comum, e 3 amostras de farinha especial. As 18 amostras (100%) não apresentaram contaminação para as micotoxinas aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>; ocratoxina A e zearalenona. Para fumonisina B<sub>1</sub>, 70% das amostras apresentaram contaminação com níveis variando de 0,5 a 3,9 µg/kg para as amostras de trigo e de 0,6 a 2,3 µg/kg para as amostras de farinhas, respectivamente. Quanto a contaminação por insetos, 100% das 12 amostras de trigo apresentaram infestação de 1 a 5 insetos, e as 6 amostras de farinha especial e comum apresentaram de 6 a 45 fragmentos de insetos por amostra. O conteúdo de umidade dos grãos armazenados secos variou de 11,3 a 11,9%, enquanto que o trigo condicionado variou de 15,5 a 15,9%, para farinha especial a umidade foi de 13,2 a 14,0%, e para farinha comum de 12,6 a 14,2%. Este conteúdo de umidade do trigo seco e das farinhas atende a legislação brasileira vigente. A presença dos insetos e seus fragmentos encontrados neste trabalho no período de armazenamento sugerem a contaminação dos lotes de grãos e farinhas por outros microrganismos como fungos e micotoxinas, que são nocivos a saúde humana e que podem descartar o produto, segundo a legislação brasileira.

**Palavras-chave:** micotoxinas; fungos; trigo; farinha; pragas.

## ABSTRACT

The aim of this work was to assess the stored wheat grain quality by evaluating the quality of common and special Brazilian flours, produced at Cotriguaçu wheat mill industry. The main subject was to investigate the mycotoxins and insects fragments contamination. The samples were collected each fortnight from April to May 2003, during flour processing in the industry located at west region of Paraná. The samples were taken during 45 days period at three times totalizing 18 samples. From that 9 samples were from stored dry wheat, 3 samples from wet wheat, 3 samples from common flour and 3 samples from special flour. The results showed that none of them had mycotoxins contamination as aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), ochratoxin A and zearalenone. Just for fumonisin (B<sub>1</sub>) the samples showed contamination with levels varying between 0.5 to 3.9 µg/kg in wheat grain and 0.6 to 2.3 µg/kg in wheat flour. Insect infestation appeared in 100% of wheat samples with levels of 1 to 5 insect per sample. The insects fragments in wheat flour, common and special, showed levels from 6 to 45 per sample. The moisture content of dry wheat grain varied from 11.3 to 11.9%, at wet wheat varied from 15.5 to 15.9%, at special flour varied from 13.2 to 14.0%, and for common flour from 12.6 to 14.2%. This moisture content is according of the Brazilian legislation. The insect infestation and their fragments found suggest contamination in grain and flours for other microorganisms as fungi and possible mycotoxins that can be to human health.

**Key-words:** mycotoxins; fungi; wheat; flour; insects; fragments

### 3.1 Introdução

O trigo (*Triticum aestivum*) é um dos cereais que contém nutrientes importantes e essenciais à alimentação humana, economicamente a semente dessa gramínea é sinônimo de potência agrícola, peso padrão da balança comercial mundial e também importante fonte de alimentação animal, seja plantado para este fim, ou através do aproveitamento de seus subprodutos. As micotoxinas são metabólitos produzidos por fungos (*Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp) e quando ingeridos causam alterações biológicas.

As farinhas de trigo utilizadas freqüentemente em preparos industriais e domésticos podem servir de veículo para contaminantes de vários tipos, inclusive de micotoxinas (PEREIRA & CHANG, 1993; VIEIRA et al., 1999). A qualidade das farinhas pode ser avaliada considerando diversas características mensuráveis que podem ser indicadores de identidade dos tipos de farinha disponíveis (EL-DASH et al., 1982; CIACCO & CHANG, 1986). Estas propriedades refletem o efeito do beneficiamento e podem ser empregadas para avaliar a qualidade tecnológica ou nutricional do produto (DUTCOSKY, 1995).

A umidade e a temperatura são dois fatores críticos para o crescimento de fungos e produção de micotoxinas. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade do grão e condições de armazenamento também interferem na produção de metabólitos fúngicos, que podem vir a ser de mais de uma espécie simultaneamente (BULERMAN et al., 1984; SOARES, 1987). O processamento e o armazenamento de grãos podem alterar a microbiota fúngica, porém as micotoxinas permanecem no produto e podem estar correlacionadas com fatores dos quais foram expostos os produtos (BADIALE-FURLONG, 1992; LÁZZARI, 1993; MANFRON, 1993).

A micotoxina zearalenona é um metabólito tóxico produzido por fungos do gênero *Fusarium*, que ocorre principalmente em alimentos produzidos em climas subtropicais com alta umidade relativa do ar e baixa temperatura podendo desenvolver-se em grãos de trigo e de outros cereais (DILKIN et al., 2002).



Aldrick et al., (1996) e Osborne et al. (1996), descreveram que o polimento (remoção da camada de pericarpo), anterior a moagem apresentou melhores resultados para remoção de ocratoxina A em trigo.

Mattos et al. (2003) analisaram 80 amostras de produtos alimentícios condenados pela presença de matérias estranhas, segundo denúncias do consumidor, em atendimento a solicitações da vigilância sanitária. Os grupos de alimentos condenados com maior frequência foram produtos de panificação (32,5%), leite e derivados (10,0%), misturas ou pó para preparo de alimentos (6,25%) e água mineral (5,0%). Dentre as matérias estranhas encontradas, as mais comuns foram insetos inteiros, larvas de insetos, matéria amorfa, fragmentos de insetos e partículas carbonizadas.

As condições deficientes de armazenamento, processamento e manuseio permitem que os produtos apresentem insetos, fragmentos de insetos, ácaros, excrementos, fungos, pêlos, urina de roedor e outros contaminantes. Os insetos, ácaros e fungos contaminam e consomem o produto provocando alterações e/ou degradação no perfil físico, sanitário e nutricional do mesmo.

As matérias estranhas podem estar presentes nos alimentos, devido a ocorrência anormal ou condições e práticas inadequadas durante as fases de produção, armazenamento e distribuição. São consideradas matérias estranhas: insetos, ácaros, pêlos de roedores, penas de aves, excrementos de roedores e de aves, entre outros, material em decomposição (tecidos vegetais em deterioração por ação de parasitas ou outros) e materiais diversos (areia, terra, vidro, metal), excluída a contaminação bacteriana.

Zamboni & Atui (1989), ao avaliarem as condições de higiene de massas alimentícias utilizando dois métodos concluíram que o método por hidrólise ácida foi mais eficiente, sendo o método que condenou o maior número de amostras.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as condições higiênico sanitárias do trigo armazenado seco, antes da pré-limpeza e após (condicionado), bem como suas farinhas, comum e especial, em relação à presença de micotoxinas e fragmentos de insetos.

## 3.2 Material e métodos

### Coleta da Amostra

O trabalho foi desenvolvido com as matérias-primas, trigo e farinhas, provenientes do Moinho de Trigo Cotriguaçu, situado na cidade de Palotina, região Oeste do Estado do Paraná. As amostras de trigo seco (13% umidade) foram coletadas nos silos de armazenagem após serem selecionados de acordo com a reologia para a produção de farinhas, e direcionados para o processo de moagem. O trigo foi destinado a pré-limpeza para retirada das impurezas, e então condicionado (umidade ajustada para 15%). As amostras do trigo condicionado foram coletadas nas caixas de condicionamento. Já as farinhas comuns (> concentração de matéria mineral) e especial (< concentração de matéria mineral) foram coletadas dos silos de farinha específicos para cada tipo. A coleta foi realizada no período de abril a maio 2003 em intervalos de quinze dias, totalizando 45 dias (Tabela 3.1).

Na primeira quinzena de abril foram direcionados três silos de trigo seco nacional para o processo de moagem. O trigo seco foi coletado separadamente, antes de ser encaminhado para a pré-limpeza e após a pré-limpeza. Os mesmos foram mesclados e destinados ao condicionamento, formando um único lote, e armazenado nas caixas de condicionamento. No mesmo período, foi destinado um silo de trigo importado, armazenado separadamente das caixas de trigo condicionado, e mesclados durante o processo de moagem para a produção das farinhas comum e especial do lote 1. No total foram usadas seis amostras de trigo na primeira quinzena, sendo três amostras de trigo seco nacional, uma amostra de trigo condicionado nacional, uma amostra de trigo seco importado e uma amostra de trigo condicionado importado. Também foram usadas duas amostras de farinha, sendo uma especial e outra comum.

Na segunda quinzena de abril foram destinados dois silos de trigo seco nacional para o processo de moagem, seguindo o mesmo procedimento da primeira quinzena, e um silo de trigo importado seco armazenado separadamente, antes e após a pré-limpeza, sendo utilizado como mescla juntamente com o trigo nacional para produção das farinhas do lote 2. No total foram usadas cinco amostras de trigo, sendo duas amostras de trigo seco nacional, uma amostra de trigo condicionado nacional, uma amostra de trigo seco importado e uma amostra de trigo

acondicionado importado. Também foram usadas duas amostras de farinha, sendo uma especial e uma comum.

Na primeira quinzena de maio foram destinados 3 silos de trigo seco nacional para o processo de moagem, seguindo o mesmo procedimento da quinzena anterior, formando o lote 3 de produção de farinhas. Foram usadas um total de seis amostras, sendo três amostras de trigo seco nacional, uma amostra de trigo acondicionado nacional, uma amostra de trigo seco importado e uma amostra de trigo acondicionado importado. Também foram usadas duas amostras de farinha, uma especial e uma comum.

**Tabela 3.1** - Relação das amostras de trigo e farinhas de trigo, coletadas no moinho durante o processamento.

Amostra	Total de amostras
Trigo armazenado (seco)	11
Trigo condicionado	6
Farinha comum	3
Farinha especial	3
Total	23

### **Preparo da Amostra**

As amostras de trigo foram homogeneizadas e moídas em um moinho bicone, marca (Mimoso). Essas amostras, bem como as farinhas, depois de homogeneizadas foram reduzidas através da técnica de quarteamento manual e em seguida retiradas alíquotas de 50g para análise micotoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA, OTA); 50g para fumonisinas (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>); duas alíquotas de 50g cada para fragmentos de insetos em farinha de trigo e infestação interna em grãos de trigo e 50g para conteúdo de umidade.

### **Multitoxinas**

O método empregado foi CCD de (SOARES & RODRIGUES-AMAYA, 1989) o qual é dividido por etapas de extração, limpeza, triagem, confirmação e quantificação, para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>,

AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA, OTA por cromatografia de camada delgada (CCD). A quantificação foi realizada por incidência de luz ultravioleta ( $\lambda = 365$  e  $254$  nm) sobre as toxinas e comparação da intensidade de fluorescência com padrões de concentração conhecida.

### **Fumonisinias**

Foi empregado o método 995.15 da AOAC (2000a), para determinação de fumonisinias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência. A metodologia empregada utiliza metanol: água (CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O/3:1) como solvente de extração e cartuchos, para limpeza das amostras. A derivatização dos extratos foi procedida com o-ftaldialdeído e leitura em CLAE, equipado com detector de fluorescência.

### **Matérias Estranhas (Fragmentos de Insetos)**

**Grãos de Trigo:** foi utilizado o Método 982.31 da AOAC (2000a) determinação de infestação interna de grãos, por hidrólise ácida e flutuação, com auxílio de um microscópio estereoscópio sob aumento de 15x.

**Farinhas de Trigo:** foi empregado o Método 972.32 17° da AOAC (2000b) determinação de sujidades leves por hidrólise ácida, para identificação de fragmentos de insetos, com auxílio de um microscópio estereoscópio com aumento de 30x.

**Determinação do Conteúdo de Umidade:** A umidade percentual dos grãos e das farinhas de trigo foram determinadas em duplicata, por aquecimento direto das amostras a 130°C em estufa com rígido controle de temperatura, conforme metodologia oficial da AOAC (2000).

### **3.3 Resultados e Discussão**

#### **Conteúdo de Umidade da Farinha**

Sabemos que o conteúdo de umidade dos alimentos é um fator primordial para favorecer o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes.

Os resultados encontrados por Ciacco & Chang (1986), ao analisarem 54 lotes de farinhas comerciais, demonstram que a umidade média de todas as amostras foi de 13,29%, portanto de acordo com a legislação brasileira. Em nosso experimento a umidade média (Tabela 3.2) das amostras de farinha de trigo foi de 13,5%, portanto também de acordo com a legislação brasileira que estipula 15% de umidade para as farinhas comerciais, a observação desse limite normalmente assegura a conservação da qualidade das farinhas durante a estocagem comercial. Os valores também estão de acordo com a Portaria 354 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1996).

**Tabela 3.2** - Quantificação da contaminação por micotoxinas e fragmentos de insetos em farinhas de trigo comum e especial após o processamento no moinho

Farinha	Lote	Conteúdo de umidade (%)	Fragmentos de insetos (n. <sup>os</sup> )	Multitoxinas * (AF,OTA,ZEA) (µg/g)	Fumonisinias (FB <sub>1</sub> ,FB <sub>2</sub> ) (µg/g)
Comum	1	14,2	6	ND	1,2
Especial	1	14,0	45	ND	0,6
Comum	2	12,6	26	ND	1,5
Especial	2	13,2	16	ND	2,3
Comum	3	12,8	10	ND	0,7
Especial	3	13,1	13	ND	1,3

\* ND = não detectada pela metodologia empregada.

Limite de Quantificação/ Coeficiente de Recuperação: AF (1µg/kg/85,5%), OTA (2µg/kg/80%), ZEA (10µg/kg/85%), FB1 e FB2 (30 µg/kg/cada/95%).

### Matérias Estranhas

Os resultados quanto a contaminação das farinhas de trigo por matérias estranhas leves (fragmentos de insetos), para farinha especial do lote 1, apresentou o maior número de fragmentos de insetos, não sendo de grande significado em relação aos outros lotes, exceto ao lote 1 da farinha comum que apresentou seis fragmentos de insetos. Esses valores já eram esperados, uma vez que o trigo usado na produção dessas farinhas apresentou infestação interna na massa do grão de 0 a 5 insetos inteiros. Devido ao processo de moagem, esses insetos podem resultar em uma grande quantidade de fragmentos (Anexo 1), porém esses resultados estão de acordo com a legislação brasileira vigente até 2003, portaria 74, (BRASIL, 1994), que considerava 75 fragmentos de insetos na média de três sub-amostras (Anexo 2). A atual legislação, BRASIL (2003) (Anexo 3), não estabelece limites para esses fragmentos, e considera apenas insetos carreadores de contaminantes, como animais que veiculam o agente infeccioso desde o reservatório até o hospedeiro potencial, mas não responsáveis pelo desenvolvimento de qualquer etapa do ciclo de vida do contaminante biológico. Um alimento com alto índice de fragmentos de insetos pode indicar péssimas condições sanitárias e afeta de forma determinante a qualidade do produto final, impossibilitando o consumo.

## Ocorrência de Micotoxinas

A avaliação da qualidade, em termos de contaminação das farinhas por micotoxinas destaca-se como fator de grande importância em saúde pública pelo risco que estes contaminantes apresentam para o consumidor.

Em estudo realizado com a ocorrência de micotoxinas em farinha de trigo especial, comum e integral, Vieira et al. (1999), concluíram que as cinzas podem explicar a presença ou não de micotoxinas nas farinhas, pois essas farinhas possuem percentuais diferentes de cinzas, e com isso e de fácil deterioração, e que as micotoxinas detectadas foram ocratoxina A e zearalenona, em níveis de 12 a 53  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ , respectivamente.

Aldrick (1996) e Osborne et al. (1996), citam que o polimento (remoção da camada de pericarpo), anterior à moagem, apresentou melhores resultados para remoção de ocratoxina A em trigo. Porém os resultados encontrados no presente experimento mostraram que o trigo seco armazenado apresentou contaminação para fumonisina, o mesmo ocorreu no condicionado após a pré-limpeza, sendo igualmente distribuída na farinha durante o processo de moagem do trigo (Tabela 3.3).

Das seis amostras de farinha (especial e comum) analisadas, nenhuma apresentou contaminação para as micotoxinas AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA, OTA. No entanto, para fumonisina B<sub>1</sub> os níveis variaram de 0,6 a 2,3 $\mu\text{g}/\text{g}$ , para a farinha especial e de 07 a 1,5 $\mu\text{g}/\text{g}$  para a farinha comum (Tabela 3.2). O que leva a crer que esta contaminação pode ser oriunda dos grãos, uma vez que analisados os lotes de trigo, para a produção das farinhas todos apresentaram contaminação para fumonisinas ao final da mescla (Tabela 3.3). Na amostra (A) do lote 1, amostra (A/C) do lote 2 e a amostra (A, A/B/C-3 e C-3) do lote não apresentaram contaminação, mas pelo menos uma amostra de cada lote estava contaminada. Durante a mescla para produção de farinhas pode ter ocorrido a contaminação do lote, podendo assim diluir a concentração devido a um dos lotes durante as mesclas não estar contaminado, e/ou pode haver a possibilidade de algum grão ter permanecido nas caixas de condicionamento do trigo, devido a umidade dos grãos de trigo condicionado ser mais alta para facilitar a extração, o fungo tem maior possibilidade de desenvolver-se, pois tem condições propícias e conseqüentemente de produzir micotoxinas. Esse fato ocorre não pelo tempo de armazenamento nessas condições (média de 12

horas), mais sim pelo fato de restos de grãos ficarem alojados em frestas nas paredes das caixas de condicionamento, por isso há necessidade constante de fazer uma limpeza das caixas de condicionamento.

**Tabela 3.3** - Avaliação da contaminação por micotoxinas e fragmentos de insetos em trigo seco armazenado e trigo condicionado destinados ao processamento de farinhas.

Amostra	Lote	Origem	Situação	Conteúdo de umidade (%)	Infestação Interna de insetos (n.º)	Multitoxinas (AF,OTA,ZEA) (µg/g)	Fumonisinias (FB <sub>1</sub> ,FB <sub>2</sub> ) (µg/g)
A	1	Nacional	Seco	12,8	1	ND	1,6
B		Nacional	Seco	12,8	5	ND	ND
C		Nacional	Seco	12,9	3	ND	0,5
A/B/C-1		Nacional	Condicionado	15,9	2	ND	2,4
D		Importado	Seco	11,6	1	ND	1,9
D-1		Importado	Condicionado	15,5	1	ND	0,8
A	2	Nacional	Seco	11,8	3	ND	ND
B		Nacional	Seco	11,7	2	ND	3,8
A/B-2		Nacional	Condicionado	15,5	1	ND	1,7
C		Importado	Seco	11,9	-	ND	ND
C-2		Importado	Condicionado	15,5	-	ND	3,9
A	3	Nacional	Seco	11,3	1	ND	ND
B		Nacional	Seco	11,6	1	ND	2,6
C		Nacional	Seco	12,4	5	ND	1,5
A/B/C-3		Nacional	Condicionado	15,5	2	ND	ND
D		Importado	Seco	11,6	-	ND	ND
D-3		Importado	Condicionado	14,7	-	ND	ND

ND = não detectada pela metodologia empregada.

(-) ausência de insetos

Limite de Quantificação/ Coeficiente de Recuperação: AF (1µg/kg/85,5%), OTA (2µg/kg/80%), ZEA (10µg/kg/85%), FB1 e FB2 (30 µg/kg/cada/95%).



### **Conteúdo de Umidade do Trigo**

A umidade média (Tabela 3.3) das amostras de trigo seco (armazenado), foi de 12,04%, estando de acordo com a legislação brasileira. O limite para armazenagem de grãos de trigo seco é no máximo de 13%, para assegurar a conservação da qualidade dos grãos durante a estocagem, evitando a multiplicação de microrganismos como fungos (mofo) e conseqüentemente a produção de micotoxinas. Os valores estão também de acordo com a Instrução Normativa nº 7 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001) (Anexo 4).

### **Infestação Interna dos Grãos**

A infestação interna por insetos inteiros no interior da massa dos grãos foi considerável considerando o resultado em 50g de amostra analisada. No processo de moagem esses insetos podem ser fragmentados, resultando em elevado número de fragmentos de insetos nas farinhas, porém de acordo com legislação brasileira vigente, esses insetos não são mais considerados como vetores mecânicos. Portanto, é necessário que seja realizado um monitoramento constante dos grãos armazenados, e que uma boa amostragem seja realizada. Pois uma vez comprovada a infestação por pragas de grãos armazenados, os mesmos não são eliminados totalmente, mesmo após os tratamentos químicos, permanecendo no interior dos grãos e dificultando a remoção durante os processos de pré-limpeza, sendo assim incorporados a farinha na forma de fragmentos.

### **Contaminação por Micotoxinas**

Mallmann et al. (2003), relatam que é fundamental um maior controle das condições de cultivo, colheita, armazenamento e comercialização dos cereais para garantirmos um alimento livre de contaminantes à população. A maioria dos níveis de contaminação encontrada justifica a necessidade de um monitoramento adequado da ocorrência da micotoxina no cereal, sendo esta a única forma de garantirmos um alimento livre desta contaminação natural (DILKIN et al., 2002).

Em nosso experimento para verificação da qualidade do trigo armazenado, e após processamento da moagem do trigo resultando em farinha especial e comum, observamos que os lotes de trigo das amostras que apresentaram contaminação por fumonisinas B<sub>1</sub>, também

apresentaram contaminação para fumonisinas nas farinhas de trigo. Isto já foi citado por diversos autores, salientando que a contaminação por micotoxinas nos grãos não é eliminada durante o processo de moagem.

As amostras de trigo, assim como as de farinha (especial e comum) não apresentaram contaminação para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA e OTA.

Como podemos observar na Tabela 3.3, a amostra C-2 do lote 2 de trigo importado, apresentou a maior concentração para fumonisina, 3,9µg/g. Este lote não apresentou contaminação quando armazenado seco, o que nos leva a crer que há possibilidade de contaminação cruzada com restos de grãos de outros lotes que ficam aderidos a caixa de condicionamento (umidificação dos grãos à 15%), ou estes grãos contaminados não foram incorporados na amostragem inicial na coleta do silo, a coletada da amostra do lote foi no momento que os grãos eram direcionados do silo para o processamento, não podemos isentar a possibilidade que este lote não estava contaminado na fase inicial do processo. Deve-se considerar também que o método de amostragem não é perfeito, e pode ocorrer escape de contaminação no momento de coleta de amostras.

As amostras do lote 1 mostraram que 75 % do trigo seco apresentou contaminação para fumonisina, tanto no trigo nacional como no importado. O trigo condicionado estava contaminado com níveis que variaram de 0,8 a 2,4 µg/g. Já para o lote 2, o índice de amostra com presença de fumonisina para o trigo seco foi de 33,3%, somente uma amostra do trigo seco nacional e importado não apresentaram contaminação. A contaminação de fumonisina para a amostra A/B-2 de trigo acondicionado pode ser devido a contaminação cruzada anteriormente explicada.

O lote 3 apresentou o menor número de amostra contaminadas, sendo que apenas 50% estavam contaminadas em relação ao lote 1 e 2. A amostra (A) não apresentou contaminação para fumonisina, a amostra (B) apresentou nível de 2,6 µg/g e a amostra (C), 1,5 µ/kg.

### 3.4 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que houve presença de fumonisinas no trigo e nas farinhas armazenadas, porém esta contaminação apresentou valores inferiores aos limites estabelecidos pela legislação de outros países como FDA, uma vez que a legislação brasileira possui limites apenas para aflatoxinas ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) que é de  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) (Anexo 5).

Os valores de contaminação encontrados justificam a necessidade de um monitoramento adequado da ocorrência desta micotoxina no cereal, sendo fundamental maior controle das condições de cultivo, colheita, armazenamento e comercialização deste cereal, sendo esta a única forma de garantir um alimento livre deste contaminante natural, e assegurar a segurança alimentar.

Houve contaminação por insetos e os fragmentos destes no trigo e nas farinhas derivadas. As medidas para evitar esta infestação e contaminação do produto, são conhecidas e exigem que se aplique o programa de Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados (MIPGRÃOS), o qual previne a ocorrência de pragas em toda a cadeia de pós-colheita do trigo (LORINI, 2003). Em estudo realizado por Birck et al. (2003), após a implantação do programa MIPGRÃOS houve uma redução da infestação por insetos e fragmentos de insetos nas farinhas de trigo, sendo está uma ótima ferramenta para assegurar a segurança alimentar.

### 3.5 Referências Bibliográficas

ALDRICK, A. J. The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. **Food Additives and Contaminants**. V.13; Supplement; p.27-28, 1996.

AOAC – Official Methods Of Analysis. Fumonisin in Corn–Liquid Chromatographic Method, 995.15 **Natural toxins**, v. 2 p. 49-51, 2000a.

AOAC – Official Methods of Analysis. Official Method 972.32, Farinha de trigo – Determinação de sujidades leves por hidrólise ácida e flutuação, 2000a.

AOAC - Official Methods of Analysis. Official Method 982.31, Infestação interna em grãos de trigo. Sujidades leves por quebra e flutuação, 2000b.

BADIALE-FURLONG, E. **Tricotecenos em trigo**: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo. Campinas, 1992, 120p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Campinas (UNICAMP).

BIRCK, N. M. M.; LORINI, I.; DE PAULA, M. C. Z.; KOTZ, C. C. Matérias estranhas leves em farinhas de trigo. **Anais...** V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2003.

BRASIL - **Ministério da Saúde** –Portaria nº 74 – SVS/MS de 4 Agosto de 1994.

BRASIL – **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. D.O.U de 09/07/2003 – Republicada em 10/07/2003.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério da Agricultura. Portaria nº 354, de 18 de julho de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, que aprova Norma Técnica referente à farinha de trigo, identidade e caracterização mínima da qualidade.

BRASIL – **Ministério da Agricultura e Abastecimento**. Regulamento Técnico de identidade e de qualidade do trigo. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Instrução Normativa n. 7, de 15 de agosto de 2001.

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

CIACCO, C. F.; CHANG, Y. K. **Tecnologia de massas alimentícias**. São Paulo: Ícone, 1986, 127p.

DILKIN, M. MÜRMAN, L.; ALMEIDA, C. A.; KOWASKI, C. H.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. **Prevalência de zearalenona em trigo utilizado na alimentação humana no ano de 2002**. Pesquisa realizada no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), UFSM. 2002.

DUTCOSKY, S. D. **Desenvolvimento de tecnologia de fabricação de biscoitos e massas alimentícias isentos de glúten a partir da farinha de arroz**. Curitiba, 1995. 158p. Dissertação (Mestre em tecnologia Química) Universidade Federal do Paraná.

EL-DASH, A. A.; CAMARGO, C. O.; DIAZ, N. M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo, Coordenadoria da Indústria e Comércio, 1982, 351p. (Tecnologia Agroindustrial, 6).

LÁZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba, Ed. do Autor, 1993,140p.

LORINI, I. Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. Embrapa. Passo Fundo, RS. 2003. 80p.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, M.; MÜRMAN, L.; DILKIN, P.; ALMEIDA, C. A.A. Avaliação da contaminação por Deoxinivalenol em trigo utilizado na alimentação humana. **Anais... I Congresso Brasileiro de Farmácia**. 2003.

MANFRON, P. A. LAZZAROTTO, C.; MEDEIROS, S. L. P. Trigo: aspectos agrometeorológicos. **Revista Ciência Rural**, v.23, n.2, p.233-239, Santa Maria, 1993.

MATTOS, E. C.; MAFEZOLI, S.; DAROS, V. dos S. M. G.; SAVIGNADO, L. V. A importância da microscopia alimentar na pesquisa de matérias estranhas em alimentos. Instituto Adolfo Lutz. **Anais... V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Unicamp. Campinas. 2003.

OSBORNE, B.G.; IBE, F.; BROWN, G. L.; PETAGINE, F.; SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J. N.; HETMANSKI, M. T.; LEONARD, C. T. The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**. v.13, n.2, p.141-153, 1996.

PEREIRA, M. L.; CHANG, Y. K. Contaminantes do trigo e farinha de sanitização na indústria de moagem e panificação. **Higiene Alimentar**, v7, n.26, p.20-29, 1993.

SOARES, L. M. V. **Micotoxinas**; um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas, São Paulo. Campinas, 1987. (Tese Doutorado). Faculdade de Engenharia de alimentos. Universidade estadual de Campinas (UNICAMP).

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brasilian foods by use multitoxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal Chem.** v. 72, n. 1, p. 22-26. 1989.

VIEIRA, A. P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.17, n.2, Campinas. 1999.

ZAMBONI, C.Q.; ATUI, M.B.; Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia. Revista. Instituto. Adolfo Lutz. São Paulo. n. 49 (1): 11-17, 1989.

## **ARTIGO 2**

## DETERMINAÇÃO DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO RECÉM COLHIDO E ARMAZENADO

### RESUMO

A contaminação por fungos e micotoxinas foi avaliada em trigo (*Triticum aestivum*) em pós-colheita, armazenado de novembro de 2003 a Maio de 2004. As amostras de trigo foram coletadas de cinco pontos do silo em intervalos de 30 dias. Foram realizadas contagens de fungos (gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* spp.) e análises de micotoxinas. As toxinas analisadas foram aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZON), deoxinivalenol (DON) e fumonisinas (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>). Não foram detectadas AFLs, OTA, ZON e DON em nenhuma das amostras. Contudo, do total de 35 amostras analisadas, 11 (31,4 %) apresentaram contaminação por FB<sub>1</sub> à níveis de 36,3 a 2891 µg/g. Não houve contaminação para FB<sub>2</sub>. Quanto à contaminação por fungos nas amostras obtidas na recepção do trigo, 100% apresentaram contaminação para *Aspergillus* spp, 80% para *Fusarium* spp, 60% para *Penicillium* spp. Já ao longo do armazenamento, das 30 amostras analisadas, 46,7% apresentaram *Fusarium* spp, 96,7% *Aspergillus* spp e 8,0% *Penicillium* spp. Foi observada redução no crescimento fúngico após o tratamento dos grãos com fosfina. Devido à importância toxicológica das micotoxinas e dos fungos produtores, destaca-se a importância de um constante monitoramento no armazenamento (umidade, temperatura e limpeza das células de armazenagem), pois uma vez produzida a micotoxina nos grãos, esta não é eliminada no processo de moagem.

**Palavras-chave:** micotoxinas, armazenagem, fungos, trigo pós-colheita.

## ABSTRACT

The degree of contamination by fungi and mycotoxins in wheat grains (*Triticum aestivum*) post-harvest, stored from november 2003 to may 2004 was evaluated. Sample collection was carried out at 5 points of the silo and isolation and identification of fungi (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* spp) and the mycotoxins analysis were carried out. The toxins were aflatoxins (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) ochratoxin A (OTA), zearalenone (ZON), deoxynivalenol (DON) and fumonisins (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>). The samples were collected at intervals of 30 days. AFLs, OTA, ZON and DON were not detected in any samples analyzed. However, FB<sub>1</sub> was detected in 11 (31.4 %) samples at levels ranging from 36.3 to 2891 µg/g. There was no contamination for fumonisin (FB<sub>2</sub>). As fas as fungi infection is concerned at the wheat reception, 100% showed contamination for *Aspergillus* spp, 80% for *Fusarium* spp, 60% for *Penicillium* spp was detected. A reduction in the fungi growth after the treatment of the grains with fosfin was observed. Due the toxicological importance of the micotoxins and their producing fungi, it is necessary to emphasize the need of a constant control in the storage grains (moisture temperature and cleaning of the storage cells), therefore, when the micotoxin has being produced in the grains it can not be eliminated in the milling process.

**Word-key:** mycotoxins, storage, fungi, wheat powder-crop.



## 4.1 Introdução

Os grãos de cereais podem ser contaminados por uma variedade de fungos microscópicos durante o seu desenvolvimento. Esses patógenos podem afetar a planta resultando em redução da qualidade da semente e algumas espécies podem produzir toxinas naturais causando intoxicação ao ser humano e animais. A prevenção das micotoxinas até onde possível é importante, pois uma vez formada, tornam-se estáveis em temperatura ambiente e bastante resistente a desarranjos térmicos (SCUDAMORE, 2005).

As micotoxinas são motivo de preocupações na armazenagem de grãos, sendo um dos vários fatores de grande importância, pois são provenientes do desenvolvimento dos fungos em função de condições predisponentes, como: teor de água, temperatura, período de armazenamento, grau de contaminação, grãos quebrados e impurezas, presença de insetos, teor de oxigênio, cuidados na colheita, beneficiamento e transporte dos grãos e da semente (GARCIA et al., 2003; LAZZARI, 1997; SANTOS, 2002; SCUDAMORE, 2005).

As principais classes de micotoxinas que ocorrem nos cereais incluem as aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>); os tricotecenos, deoxinivalenol (DON) e (toxina T-2); as fumonisinas (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>); a zearalenona (ZEA); ocratoxina A (OTA) e os alcalóides do ergot, a maioria incluída nesse grupo é produzida por três gêneros fúngicos, denominados *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (COUNCIL FOR AGRICULTURE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003). Dentre as espécies de fungos os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* constituem-se as que mais proliferam em grãos armazenados (PUZZI, 1986).

Há fungos que se desenvolvem em temperaturas distintas produzindo toxinas em condições de temperatura especialmente baixas como do gênero *Fusarium* spp, esta é uma razão pela qual em determinadas regiões do Brasil, os grãos de culturas de inverno apresentam toxinas distintas daqueles produzidas em épocas quentes (KRABBE, 1995).

Da Mata et al. (1999) em seu estudo sobre o efeito da utilização de fosfina no controle de *Aspergillus flavus* em milho armazenado, constatou que a utilização de fosfina em fumigações sob diferentes temperaturas da massa de grãos de milho, concentrações iguais ou superiores a 3gm<sup>-3</sup> de fosfina foi capaz de controlar o crescimento e desenvolvimento de *A. flavus* “in vitro”,

mas não controlou o seu crescimento e desenvolvimento em grãos de milho quando submetido à mesma dose de fosfina ( $3\text{gm}^{-3}$ ), em período de exposição de 120 horas. Agarwal & Sinclair (1997) afirmam que a fosfina tem capacidade de retardar o desenvolvimento de fungos em sementes armazenadas com teor de umidade acima do recomendado para um armazenamento seguro.

Segundo Santos & Mantovani (1997), além dos fungos, outro problema é a infestação de insetos que provoca danos ao tegumento dos grãos, produz gás carbônico e água, contribuindo para o aumento do teor de umidade que, por sua vez aumenta a respiração dos grãos e conseqüentemente a temperatura, facilitando a multiplicação dos fungos, e os insetos devido a sua movimentação ajudam a disseminar os esporos de fungos por toda a massa de grãos.

Gloria et al. (2004) investigaram a contaminação de AFLs entre quatro frações de milho separadas de acordo com as regras brasileiras de classificação e constataram que a fração que continha grãos ardidos, mofados, queimados e brotados normalmente tinham os níveis mais altos de aflatoxina.

Utilizando farinhas de trigo comerciais (especial, comum, integral) da região sul do Rio Grande do Sul, Vieira et al. (1999) verificaram que as análises físico-químicas, como alto índice de cinzas pode explicar a presença de micotoxinas nas farinhas. Detectaram OTA e ZON em níveis de 12 e  $53\mu\text{g}/\text{kg}^1$  respectivamente. Ao avaliar a qualidade das farinhas de trigo, Badiale-Furlong, et al. (2003), também identificaram a presença de OTA e suspeita de contaminação por toxina T-2 e AFB<sub>1</sub>. Em trabalhos desenvolvidos no laboratório do Moinho Cotriguaçu, Birck et al. (2003), avaliaram a qualidade do trigo armazenado seco com 13% de umidade e condicionado (umedecido) com 15% de umidade e seus subprodutos farinha (comum e especial). Constataram que não houve presença para as AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, OTA e ZON, porém para FB<sub>1</sub> os níveis variaram entre 0,5 a 3,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para os trigos e entre 0,6 a 2,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para as farinhas.

O DON é um metabólito fúngico tóxico produzido por espécies do gênero *Fusarium*, pertencente ao grupo dos tricotecenos do tipo “B”. Esta micotoxina pode contaminar frutas, sementes e subprodutos, sendo a farinha de trigo um substrato muito vulnerável a contaminação por DON. Em estudos com análises de 78 amostras de farinha de trigo, 27 (34,61%) apresentaram contaminação por DON com nível médio e máximo de 283,94  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 794  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente (ARAÚJO et al., 2004). Por outro lado, a contaminação por DON em trigo (297

amostras) da Região Sul, foi de 74 (24,91%) com nível médio de 603,2 µg/kg e máximo de 8.504 µg/kg (MALLMANN et al., 2003).

A intoxicação por DON pode diminuir a hematopoiese pela lesão na medula óssea, induzir danos ao sistema nervoso e cardiovascular, além de provocar lesões gastrointestinais, vômitos e diarreias.

Estudos realizados na Índia por Ramakrishna et al. (1990), quanto à presença de micotoxinas (AFLs e tricotecenos) em 150 amostras de sorgo, milho, trigo, farinha de trigo integral refinada e amostra de ração animal misturada, encontraram níveis de aflatoxina AFB<sub>1</sub> (20-60 mg/kg) em 4 amostras de sorgo. McMilliam et al. (1983), avaliaram 64 amostras de sorgo, recém-colhido em áreas agrícolas da Geórgia e constataram a incidência de ZEA em níveis de 2 a 1.468 mg/kg, 35% das amostras não rejeitaram a possibilidade de formação de micotoxinas (AFLs) em grãos ainda no campo. Da Silva (1998) analisou 140 amostras de sorgo recém-colhido e armazenado, identificando presença de FBs em 74,2% das amostras com níveis entre 0,11 a 0,15µg/g.

Devido a crescente exigência dos mercados consumidores internos e externos, quanto aos padrões de qualidade dos produtos, este trabalho teve o objetivo de avaliar a contaminação do trigo proveniente de lavouras comerciais e trigo armazenado, quanto a microbiota fúngica e produção de micotoxinas para fornecer subsídios técnicos aos setores da cadeia produtiva de armazenagem e processamento (Indústrias Moageiras).

## **4.2 Material e Método**

**4.2.1 Amostras:** grãos de trigo (1.000 toneladas) provenientes da Cooperativa Mista Vale do Piquiri Ltda (Cvale), classificados como Trigo Melhorador, das variedades Coodetec 104 (74%), Iapar 78 (25%) e Iapar 85 (1%). Estes grãos foram produzidos no município de Assis Chateaubriand, PR, Região Sul do Brasil.

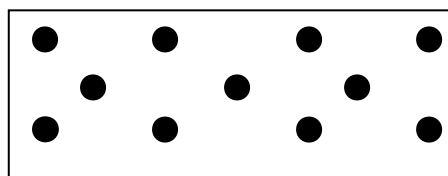
**4.2.2 Armazenagem:** O trigo após ser colhido foi entregue pelos produtores à cooperativa Cvale, onde foi submetido aos procedimentos padrões de limpeza (máximo 1% de impurezas) e secagem dos grãos (umidade 13%). Após este processo os grãos foram enviados ao Moinho de

Trigo Cotriguaçu para o armazenamento e produção de farinha. No recebimento dos grãos no moinho, foram iniciadas as coletas de amostras para a pesquisa, considerado tempo zero, logo após a colheita, na recepção do grão para armazenagem e a cada 30 dias durante os 180 dias de armazenagem. A armazenagem foi de novembro de 2003 a maio de 2004, com um total de 35 amostras para análise de fungos e micotoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZON, OTA, DON e FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>).

#### 4.2.3 Coleta das Amostras

##### (a) Recepção do Trigo: (Tempo – Zero)

A coleta das amostras logo após a colheita (tempo zero de armazenagem) foram realizadas diretamente do caminhão de acordo com a chegada do mesmo para descarga no moinho. Esta foi feita por técnicos do setor da armazenagem da empresa, conforme metodologia oficial de amostragem (Brasil, 2001) com auxílio de um calador. À medida que foram chegando os caminhões para descarga, foram retiradas amostras em 11 pontos distintos (Figura 4.1) da carga, correspondendo a aproximadamente 500 g por caminhão, e colocadas em um recipiente plástico, até atingir o correspondente a 200 toneladas amostradas. Essa amostra foi registrada como amostra A, representando as primeiras 200 toneladas, que foram colocadas no fundo do silo. Outras 4 amostras foram obtidas de forma semelhante, representando as amostras (B, C, D, E) atingindo assim as 1.000 toneladas de trigo (capacidade total do silo).



**Figura 4.1** - Pontos amostrados no caminhão.

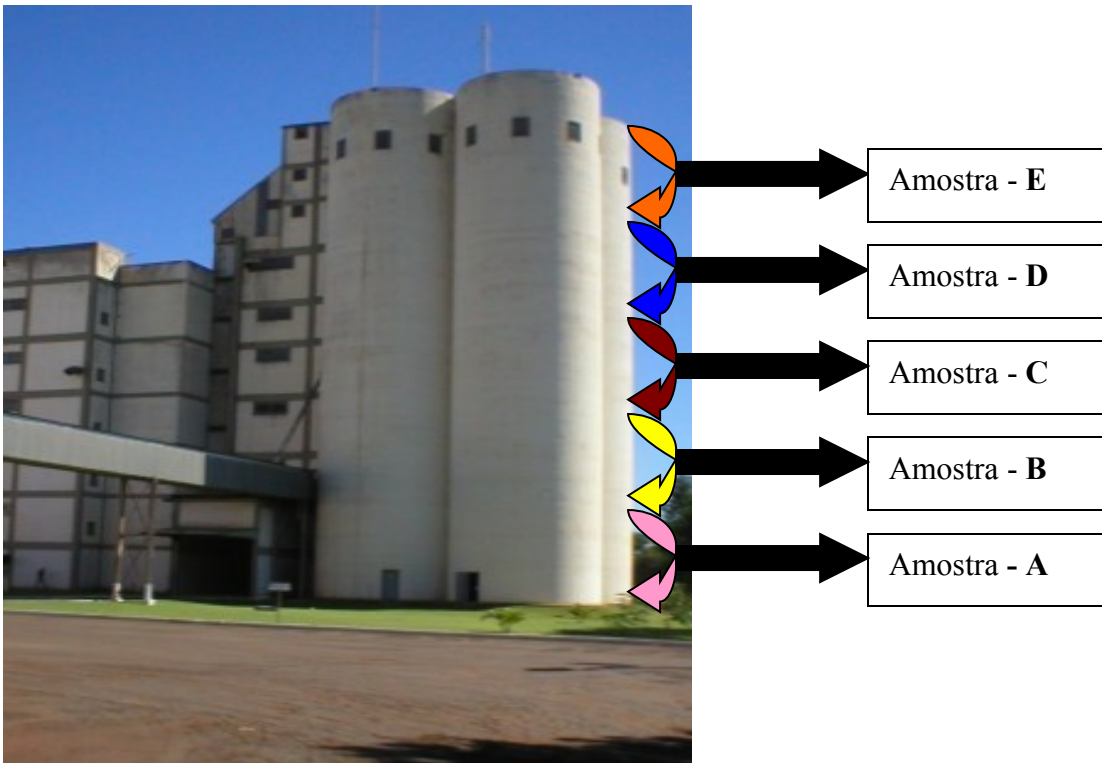
##### (b) Durante o Armazenamento do Trigo

O silo utilizado no experimento foi previamente limpo (aspiração do pó, remoção de restos de resíduos de grãos dos lotes anteriores e aplicação de inseticida por pulverização). As 1.000

toneladas de trigo foram armazenadas em silo vertical construído em alvenaria, identificado com o número 13 (18,0 m de altura e 14,8 m de diâmetro), sendo virtualmente dividido em cinco partes iguais (A, B, C, D, E) para fins de coleta de amostras para o desenvolvimento da pesquisa, conforme esquema mostrado na (Figura 4.2). Ponto A de 0 a 3,6m da base, ponto B de 3,6 a 7,2 m da base, ponto C de 7,2 a 10,8 m da base, ponto D de 10,8 a 14,4 m da base e ponto E de 14,4 a 18,0 m da base.

A coleta das amostras durante o período de 180 dias de armazenamento do trigo foi realizada por técnicos do Moinho Cotriguaçu, sob orientação de técnicos especializados em armazenagem de grãos do Centro de Pesquisa da Embrapa Trigo. O trigo armazenado e usado no experimento foi monitorado durante os 180 dias, e a cada 30 dias foi realizado a coleta das amostras, para análises, nos 5 pontos (A, B, C, D, E) durante a transilagem por queda livre.

O tempo necessário para transilar todo o silo, foi calculado através da técnica do copo plástico, inserido na parte superior central do silo, foram necessárias 10 horas para a transilagem completa dos grãos, correspondendo a duas horas por ponto de coleta. Para cada ponto de coleta, durante a transilagem, foi retirado 20 kg (amostra bruta) de trigo pela coleta de 1,0 kg para cada seis minutos de transilagem. Estas foram homogeneizadas e por técnica de quarteamento manual, reduzidas a uma amostra de 1,0 kg, e acondicionadas em papel Kraft para posteriormente serem analisadas.



**Figura 4.2** - Silo de armazenagem, com representação dos pontos de coleta.

**4.2.4 Preparo das Amostras:** Cada amostra (1 kg) foi triturada em liquidificador, homogeneizada e reduzida através da técnica de quarteamento manual até 500 g (sub-amostra) e desta foram retiradas alíquotas de 25 g (n=2) para micologia, de 5 g para conteúdo de umidade (n=2), de 5 g para atividade de água, de 50 g para: Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ZEA, OTA, DON, e de 50 g para fumonisina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

**4.2.5 Análise Micológica:** Foram realizadas as contagens totais de fungos filamentosos e leveduras, identificando as colônias dos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium* e *Fusarium* spp.

**(a) Contagem Total Viável de Fungos Filamentosos e Leveduras:** Cada amostra (25g) do produto foi moída e acrescentada 225 mL de água peptonada 0,1 % (diluição 10<sup>-1</sup>), agitadas em Stomaker e deixadas em repouso por 30 minutos. A partir desta diluição, foram realizadas diluições decimais de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-4</sup>. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição decimal foram semeadas em duplicata sobre a superfície de placas de Petri, contendo ABD – ágar batata dextrose, acidificado com ácido tartárico 10 % até pH 3,5. Após incubação por 5 dias a 25°C, foram feita a contagem total das colônias de fungos filamentosos e de leveduras. Os resultados foram

expressos em unidades formadoras de colônia por grama de produto (UFC/g) (AZEVEDO, 1988; SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

**(c) Identificação dos Fungos:** As colônias de fungos filamentosos foram isoladas do meio ágar batata foram identificadas através das características macroscópicas das colônias até o gênero, segundo critérios de taxonomia de Raper & Fennell (1965); Pitt (1979; 1988); Barnett & Hunter, (1986), e Klich & Pitt (1998).

**4.2.6 Determinação do Conteúdo de Umidade:** A umidade percentual dos grãos foi determinada em duplicata, por aquecimento direto das amostras a 130°C em estufa com rígido controle de temperatura, conforme metodologia oficial da AOAC (2000).

**4.2.7 Determinação da Atividade de Água:** A atividade de água (Aa) foi determinada instrumentalmente pelo aparelho AQUALAB CX-2 da Decagon Devices.

**4.2.8 Dados Climatológicos e uso de Pesticidas na Cultura do Trigo:** Para relacionar a presença de fungos e insetos presentes nos grãos de trigo no momento da colheita e no armazenamento, foram coletados dados climatológicos da região de produção do trigo usado nesta pesquisa e os pesticidas empregados pelos produtores durante o cultivo do cereal. Assim, durante todo o período da cultura do trigo no campo, foram coletados os dados de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluvial na estação meteorológica da Cooperativa Mista Vale do Piquiri Ltda (Cvale). A leitura da temperatura e umidade relativa do ar foram realizadas diariamente, em três períodos do dia, já a precipitação pluvial foram registrados os valores diários. Após foram calculadas a média diária e mensal para temperatura e umidade relativa do ar, e o total mensal para precipitação pluvial.

Foram relacionados os pesticidas (inseticidas, fungicidas e herbicidas) usados pelos produtores para o cultivo do trigo, por princípio ativo e grupo químico. Estes dados foram obtidos junto a Cooperativa Mista Vale do Piquiri Ltda (Cvale), que mantém registro de todos os produtos químicos e materiais genéticos usados pelos cooperados em cada região de sua abrangência.

**4.2.9 Análise de Micotoxinas:** As AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA, OTA e DON foram analisadas por CLAE –Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Mallmann et al., 2000). As AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, ZEA e OTA também foram submetidas pelo método de CCD de

Soares & Rodrigues Amaya (1989). Para FBs o método empregado foi CLAE segundo metodologia oficial da AOAC nº 995.15 (2000) e Dilkin et al. (2001). O limite de quantificação de DON: foi de 10 µg/g e o coeficiente de redução de 87%. O coeficiente de correlação da curva de calibração variou de 0,9927 até 0,9988. Para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> limite de quantificação de 0,7; 0,4; 1,3; e 0,4 µg/g e coeficiente de recuperação de 101,2; 93,2; 58,9; e 63,2 respectivamente, curva de calibração variou de 0,9940 até 0,9991. O limite de quantificação de ZEA foi de 12 µg/g e coeficiente de recuperação de 89%, coeficiente de relação da curva de calibração variou de 0,995 até 0,9996 (OTA).

### 4.3 Resultados e Discussão

#### Fungos

Tendo em vista o potencial de dano e a capacidade de produção de toxinas, foram pesquisados os gêneros dos fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* spp. No recebimento do trigo, das 5 amostras avaliadas, todas apresentaram contaminação fúngica para o gênero *Aspergillus* spp, 4 amostras (80%) para *Fusarium* spp e 3 amostras (60%) para *Penicillium* spp. Das 30 amostras restantes correspondentes ao período de armazenamento, 29 amostras (96,7%), apresentaram contaminação fúngica para *Aspergillus* spp, 14 amostras (46,7%) para *Fusarium* spp e 24 amostras (80,0%) para *Penicillium* spp, (Tabela 4.1). Scaff (2003), ao analisar subprodutos à base de milho citam que o fungo do gênero *Fusarium* spp, especificamente (*F. graminearum* e *verticillioide*) é mais comumente encontrado no milho e seus subprodutos, como citados por outros autores.

No presente estudo, durante o período de pós-colheita (tempo zero) e durante a armazenagem (30 dias) foi observado que o fungo do gênero *Fusarium* spp apresentou maior valor de UFC/g, vindo a diminuir gradativamente até o final do armazenamento (Figura 4.4), apresentando maior crescimento de UFC/g nos pontos (B, C). Foi observado que houve uma redução no crescimento fúngico para os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* spp, nos períodos de tratamento com fosfina no final dos 30 e 150 dias de armazenagem e evidenciados na coleta de 60 e 180 dias de armazenagem.



O *Fusarium* spp é um fungo de campo, tendo importante participação no grau de contaminação, isto se deve ao fato do cultivo como plantio direto, permanência de restos culturais sobre o solo, rotatividade de culturas e má preparação do solo, que constituem a principal fonte de inóculo.

Para o gênero *Aspergillus* spp, o mesmo apresentou um índice de UFC/g maior no período logo após a colheita (tempo zero) e 30 dias de armazenagem, vindo a diminuir gradativamente ao longo armazenamento, apresentando menor valor de UFC/g no período de 60 e 120 dias de armazenagem. A maior incidência de crescimento fúngico ocorreu entre os pontos (B e C), onde observamos também que as colônias de *Aspergillus* spp pertenciam em maior quantidade do grupo niger.

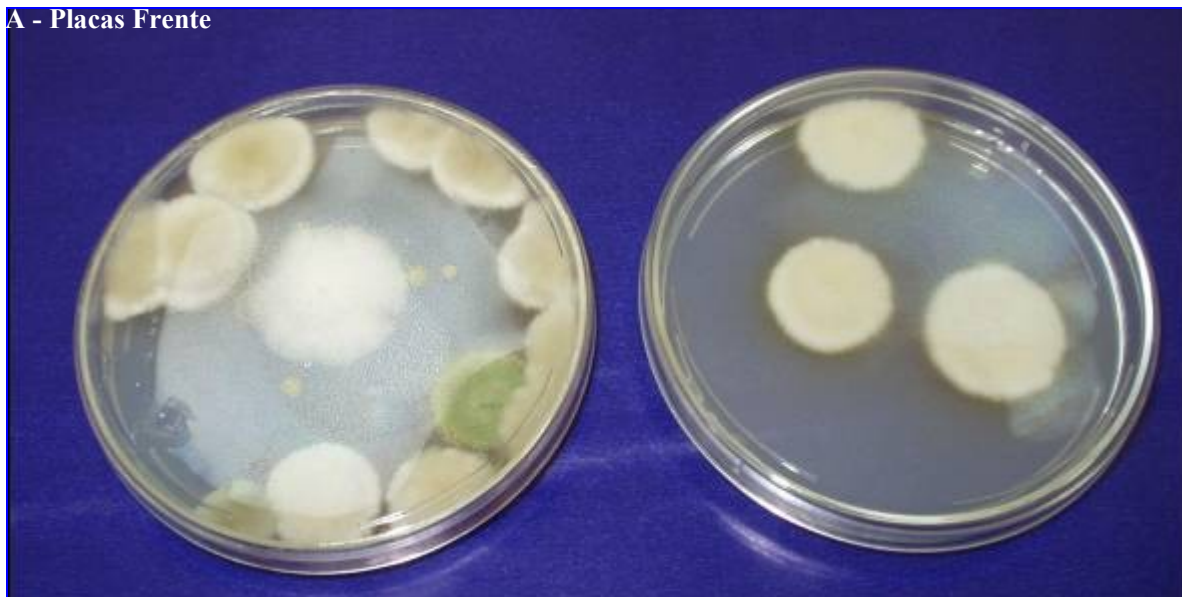
O fungo do gênero *Penicillium* spp apresentou maior número de UFC/g no período de 90 e 150 dias de armazenagem, e menor UFC/g nos períodos logo após a colheita (tempo zero) e 60 dias de armazenagem, este após o tratamento com fosfina, teve maior contaminação nos pontos (B, C, D) do silo, ao longo de todo armazenamento.

Pozzi & Corrêa (1994), verificaram que o gênero *Fusarium verticilliode* foi o fungo mais freqüente, seguido dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* spp e mais 10 gêneros de fungos filamentosos, isolados de grãos com conteúdo de umidade de 12,3 a 17,8 %, temperatura média de 18,4 a 24,1° C, precipitação pluvial de até 337 mm e umidade relativa do ar entre 64 e 87,8 %. As análises micotoxicológicas não revelaram a presença de micotoxinas.

Garcia et al. (2002), concluíram em sua pesquisa em milho que foram identificadas 26 espécies de fungos, presentes no início e no final do armazenamento nas células vedadas, sendo que 13 foram predominantes *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp *Fusarium molliniforme*, *Cephalosporium*. Eles estiveram presentes, tanto no início como no final do armazenamento nas células vedadas testemunhas, úmida e infestada em altas porcentagens de infecção, seguidos por outros fungos, porém com menor porcentagem de infecção. Da mesma forma que este foi evidenciado que os fungos *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* spp, predominaram durante todo o armazenamento, o fungo *Fusarium* spp por ser um fungo de campo predominou durante todo o armazenamento, com pequena quantidade de UFC/g. Na identificação macroscópica dos fungos

as colônias encontradas (Figura 4.3) nos levam a crer, ser o *Fusarium verticillioides* produtor da fumonisina, confirmando com os resultados de fumonisina encontrados.

A - Placas Frente



B - Placas Verso

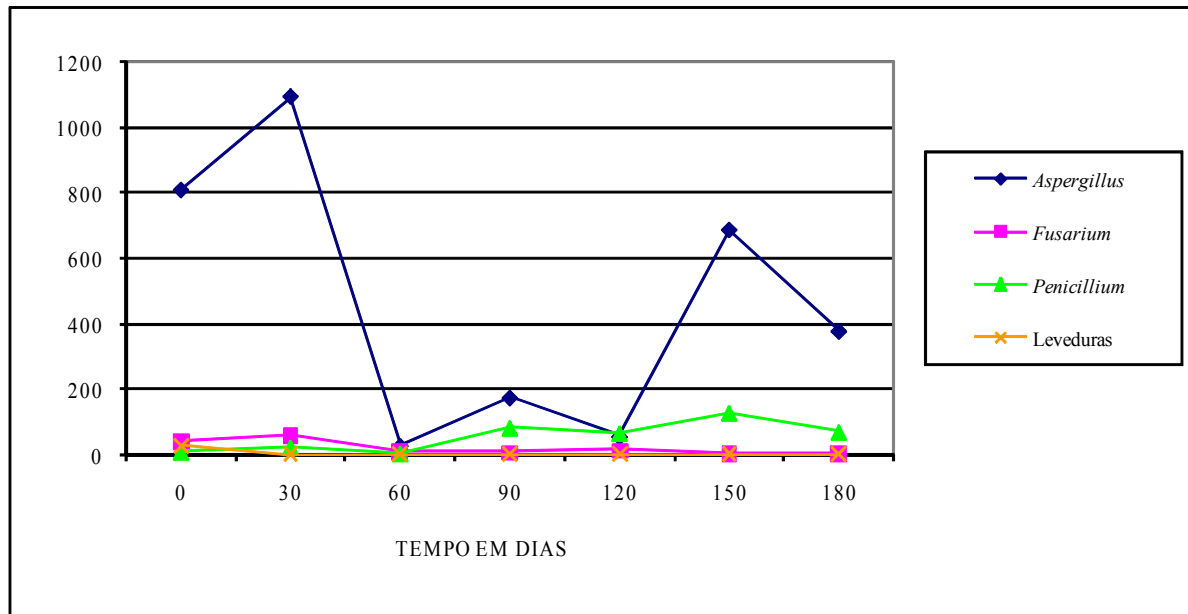


**Figura 4.3** - (A – B) Unidades Formadoras de Colônias *Fusarium* spp.

**Tabela 4.1** Contagem total (UFC/g) viável de fungos filamentosos e leveduras em trigo pós-colheita no período de novembro 2003 a maio 2004.

Fungos	Amostras																										
	<i>Aspergillus</i> spp							<i>Fusarium</i> spp							<i>Penicillium</i> spp							Leveduras					
Período de armazenagem	TOTAL	MÉDIA	A	B	C	D	E	TOTAL	MÉDIA	A	B	C	D	E	TOTAL	MÉDIAS	A	B	C	D	E	TOTAL	A	B	C	D	E
P0 (inicial)	807	161,4	53	200	350	120	84	39	7,8	3	12	20	-	40	8	1,6	-	-	6	1	1	28	-	12	1	1	14
P1 (30 dias)	1092	218,4	42	130	800	100	20	57	11,4	-	15	34	-	8	22	4,4	-	15	4	-	3	1	-	1	-	-	-
P2 (60 dias)	26	5,2	3	18	-	2	3	10	2	2	-	8	-	-	3	0,6	-	2	-	-	1	3	1	-	-	-	2
P3 (90 dias)	173	34,6	100	36	25	8	4	6	1,2	1	-	3	-	2	81	16,2	2	10	22	31	16	-	1	-	-	-	-
P4 (120 dias)	54	10,8	28	9	4	10	3	12	2,4	-	7	-	5	-	65	13	-	35	22	6	2	1	-	-	1	-	-
P5 (150 dias)	685	137	100	280	157	93	55	5	1	3	-	-	2	-	127	25,4	7	13	61	42	4	1	-	-	1	-	-
P6 (180 dias)	376	75,2	160	73	46	68	29	3	0,6	-	1	-	2	-	69	13,8	8	36	18	2	5	2	-	-	2	-	-

(-) Ausência de crescimento fúngico



**Figura 4.4** Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* spp isoladas em 35 amostras de grãos de trigo de zero (0) a 180 dias de armazenagem.

Segundo Krabbe (1995) alguns fungos como do gênero *Fusarium* spp, apresentam maior produção de toxinas com temperatura entre 10 e 15°C. Entretanto, a maioria dos fungos prefere temperaturas de 25 a 28°C.

Da Mata et al. (1999), citam que muitas das amostras contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus* spp estavam também contaminadas por insetos. A associação de *Aspergillus flavus* e insetos de grãos armazenados têm merecido a atenção de vários autores. Uma população de insetos dentro da massa de grãos se não for controlada a tempo pode criar condições de umidade e temperatura localizadas que estimulem o rápido desenvolvimento fúngico, podendo ocorrer deterioração da massa de grãos e produção de micotoxinas.

Durante a armazenagem, no início dos 60 e 180 dias foi feito um tratamento com fosfina para eliminação da infestação por insetos, e notou-se que houve uma redução no número de Unidade Formadora de Colônias UFC/g e no diâmetro das colônias, as mesmas cresciam pouco injuriadas. Isto também foi citado por Agarwal & Sinclair (1997) que relataram que a fosfina tem a capacidade de retardar o desenvolvimento de fungos. Os autores salientam que esse retardamento ocorre em sementes armazenadas com teor de umidade acima do recomendado para armazenamento seguro, mas em nosso experimento houve uma redução em baixo conteúdo

de umidade (Tabela 4.2), pois a umidade recomendada segundo a Instrução Normativa N°. 7 (Brasil, 2001) é máximo de 13%.

Da Mata et al. (1999), concluíram que *in vitro* a fosfina foi eficiente no controle do fungo para doses iguais ou superiores a 3 g.m<sup>-3</sup>. Também verificou-se que em grãos a dose de 3 g.m<sup>-3</sup> no período de exposição de 120 horas, não se mostrou efetiva no controle de fungos sob diferentes temperaturas e ainda que o fumigante não controlou o fungo contido na parte intrínseca dos grãos de milho.

### **Umidade**

Foram observadas correlações entre o conteúdo de umidade dos grãos e da farinha e atividade de água durante o tempo de armazenamento, a média da umidade foi de 11,1% inicial a 12,4%, no período de 180 dias de armazenagem, a atividade de água foi de 0,63% inicial a 0,68% no final do armazenamento, observamos que houve um aumento gradativo da umidade e a atividade de água (Aa) a partir dos 150 aos 180 dias de armazenagem.

Verificou-se que há correlação entre o aumento de fungos no período de 120 dias para 150 – 180 dias (Tabela 4.1), com a atividade de água e a infestação por insetos (Tabela 4.2). De acordo com Agarwal & Singlair (1997), Garcia et al. (2003), o aumento da atividade de Aa pode estar correlato com a presença ou não da infestação por insetos, pois observamos que houve uma infestação neste período.

Estudos realizados por Lazzari (1997); Santos & Mantovani (1997); Santos (2002) e Scudamore (2005) concluíram que a presença de insetos além de provocar danos aos grãos e disseminação da contaminação de fungos, aumenta o teor de água e a temperatura dos grãos devido sua movimentação.

Podemos concluir que na umidade em que os grãos foram armazenados, inferior a 13%, o aumento não foi significativo. Se o mesmo fosse armazenado em 13% com o aumento de 1,3% do tempo inicial a 180 dias (13% + 1,3 = 14,3%) para umidade, a atividade de água a diferença foi de 0,05% do tempo inicial aos 180 dias, a média para os 180 dias foi de 0,68% (0,68 + 0,05 = 0,73%), estas condições seriam ótimas para o desenvolvimento de microrganismos. Assim,

sugerimos que os grãos sejam armazenados com umidade e Aa abaixo do permitido para uma armazenagem segura, garantindo assim a integridade dos grãos.

### **Micotoxinas:**

Aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), ZEA, OTA, DON.

A avaliação da qualidade em relação a contaminação dos produtos por micotoxinas destaca-se como um fator de grande importância em saúde pública pelo risco que realmente apresenta. As 35 amostras de trigo logo após a colheita e durante o período de 180 dias de armazenagem não apresentaram positividade para Aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), ZEA, OTA, DON, (Tabela 4.2).

Foram identificados os 3 gêneros de fungos produtores de micotoxinas (*Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* spp), não identificada a espécie, mas há possibilidade de ter a presença das espécies produtoras dessas micotoxinas, e considerando que o meio onde se encontrava armazenado os grãos de trigo (Região Oeste do PR) a UR é baixa (50-60%) e a umidade (b.s.) dos grãos estava em torno de (10,5 a 12,7%) sendo um fator positivo a não proliferação desses fungos, apesar de alguns autores relatarem a possível ocorrência à produção de micotoxinas em índices de umidade abaixo de (13%).

Conforme a (Tabela 4.3) podemos observar que nos meses de agosto a setembro (safra) houve um aumento na incidência de chuvas, e substancialmente um aumento a umidade relativa do ar, o que nos leva a crer que possa ter ocorrido uma maior contaminação por fungo na planta na fase de colheita, apresentando, contaminação por fumonisina no período logo após a colheita.

**Tabela 4.2** Contaminação por micotoxinas, conteúdo de umidade e atividade de água em trigo armazenado no período de 0 (zero) a 180 dias.

Tempo em dias	Amostras (Pontos de amostragem)	Conteúdo de umidade (%)	Atividade de Água (Aw)	Micotoxinas (µg/kg)									
				AFB <sub>1</sub> <sup>a</sup>	AFB <sub>2</sub> <sup>b</sup>	AFG <sub>1</sub> <sup>c</sup>	AFG <sub>2</sub> <sup>d</sup>	OTA <sup>e</sup>	ZEA <sup>f</sup>	DON <sup>g</sup>	FB <sub>1</sub> <sup>h</sup>	FB <sub>2</sub> <sup>i</sup>	
0	A	11,0	0,631	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	11,2	0,634	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	11,8	0,636	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53,8	ND
	D	11,1	0,625	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	36,3	ND
	E	10,6	0,639	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	A	11,5	0,627	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	ND
	B	11,6	0,621	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	11,4	0,647	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	11,1	0,625	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	11,5	0,621	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	200	ND
60	A	11,7	0,592	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	11,7	0,603	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	11,9	0,603	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	38,1	ND
	D	11,8	0,613	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	12,0	0,601	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	51,1	ND
90	A	10,5	0,602	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	10,6	0,594	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	11,0	0,588	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	11,1	0,587	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	11,0	0,588	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
120	A	10,6	0,596	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	10,8	0,592	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	148	ND
	C	10,8	0,595	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	10,9	0,606	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	86,5	ND
	E	10,6	0,602	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2891	ND
150	A	11,7	0,608	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	11,8	0,681	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	11,5	0,679	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	11,5	0,688	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	11,6	0,689	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
180	A	12,4	0,673	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53,2	ND
	B	12,4	0,673	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	12,3	0,681	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	12,7	0,685	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	54,7	ND
	E	12,2	0,682	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Aflatoxina B<sub>1</sub>    <sup>c</sup> Aflatoxina G<sub>1</sub>    <sup>e</sup> Ocratoxina A    <sup>g</sup> Deoxivalenol    <sup>i</sup> Fumonisina B    \* ND = Não detectada pela metodologia empregada

<sup>b</sup> Aflatoxina B<sub>2</sub>    <sup>d</sup> Aflatoxina G<sub>2</sub>    <sup>f</sup> Zearalenona<sup>h</sup>    <sup>h</sup> Fumonisina B

**Tabela 4.3** Condições ambientais do cultivo ao período de safra, setembro de 2003.

MESES	TEMPERATURA (C°)*			PRECIPITAÇÃO PLUVIAL (mm)	UMIDADE RELATIVA (%)
	MÁXIMA	MÍNIMA	MÉDIA		
Março	33,6	21,9	27,75	157	39,96
Abril	32,9	20,8	26,85	178	59,96
Mai	28,8	17,3	23,05	29	63,30
Junho	33,8	18,3	26,05	126	57,30
Julho	30,2	17,5	23,85	124	62,80
Agosto	28,8	14,2	21,50	16	50,20
Setembro	32,3	18,7	25,50	117	55,00

\* Média mensal correspondente a medições diárias, períodos (manhã – tarde).

Badiale-Furlong et al. (2003), analisando farinha de trigo encontraram uma contagem de bolores e leveduras entre  $10^2$  e  $10^3$  UFC/g e a correlação com o conteúdo de ergosterol foi positiva, apresentando coeficiente de 0.89. Mesmo a contagem de bolores e leveduras sendo baixa houve contaminação por OTA em farinhas de trigo. Não foi encontrada presença de OTA A, no trigo e nas farinhas analisadas no artigo 3, não descartando a possibilidade da produção para essas e outras toxinas, pela complexidade no processamento das farinhas e fácil crescimento fúngico nas tubulações que são etapas críticas de processo que merecem a atenção, podendo este uma fonte de desenvolvimento fúngico e de produção de micotoxinas.

Vieira et al. (1999) ao estudar a ocorrência de micotoxinas em farinhas comerciais, identificaram a presença de OTA e ZEA, a níveis de 12 e 53  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$  respectivamente. Os autores concluíram que as farinhas podem vir a ser um bom veículo para contaminantes, inclusive as micotoxinas, que porventura não seja eliminada durante o processo de moagem. Ramakrishna et al. (1990), analisaram aflatoxinas e tricotecenos em sorgo, milho, trigo, farinha de trigo integral, identificando níveis de 20 a 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . McMilliam et al. (1983) identificaram a presença de ZEA em sorgo recém-colhido com níveis de 2 a 1.468  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em 35% das amostras.

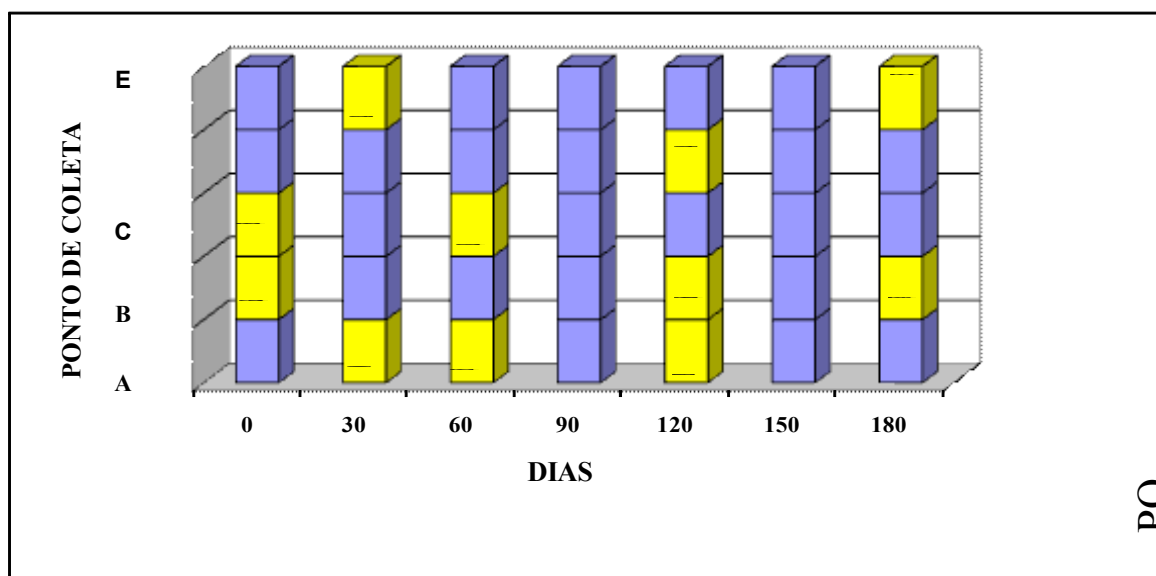
Nos resultados deste estudo não foi detectada a presença dessas micotoxinas. Podendo ser devido às condições de umidade e de Aa, não serem muito propícias para o desenvolvimento dos fungos e para a produção de micotoxinas. O dados encontrados por Vieira et al. (1999) em farinha de trigo, não necessariamente podem ser uma contaminação no trigo e sim no processo



de moagem ou no trigo condicionado (umidificado para 15 a 16%), condições e tempo de estocagem destes produtos na prateleira.

### Fumonisin

Das 35 amostras analisadas, 11 (31,4%) apresentaram contaminação para FB<sub>1</sub> e nenhuma apresentou contaminação por FB<sub>2</sub>. A contaminação por FB<sub>1</sub> ocorreu no período inicial de recebimento (zero dia) e após 30, 60, 120 e 180 dias de armazenagem (Figura 4.5). No período de 90 e 150 dias de armazenagem não apresentaram contaminação em nenhum dos pontos do silo. Para FB<sub>2</sub> não houve contaminação em nenhum período de armazenagem dos grãos (Tabela 4.2).



**Figura 4.5** - Representação gráfica do silo de armazenagem, demonstrando os pontos de contaminação de fumonisina B<sub>1</sub> no período de zero a 180 dias de armazenagem do trigo.

A Figura 4.5 apresenta os pontos do silo em que foi detectada FB<sub>1</sub> durante o período de armazenagem. **Zero dias (no recebimento):** houve contaminação nos pontos C e B com níveis de 53,8 e 36,3 µg/g respectivamente, 40% das 5 amostras (Figura 4.6). Neste período os grãos foram coletados no caminhão antes da descarga para armazenagem, compondo as amostras C e B nesta posição do silo.

**30 dias de armazenagem:** houve contaminação nos pontos A e E com níveis de 100 e 248  $\mu\text{g/g}$  respectivamente, num total de 40% das 5 amostras analisadas neste período.

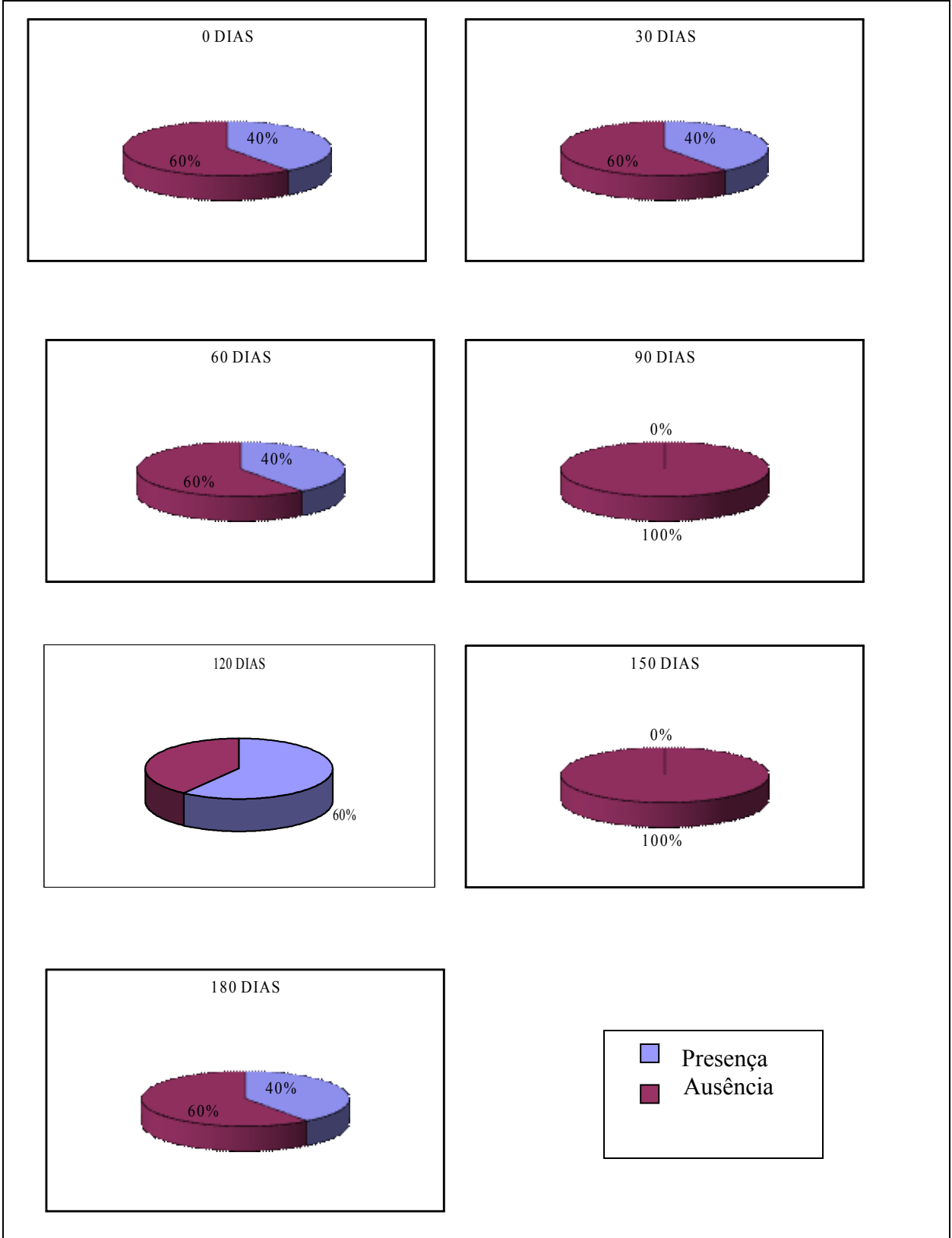
**60 dias de armazenagem:** A contaminação nos pontos C e E variam em níveis de 38,1 e 51,1  $\mu\text{g/g}$  respectivamente, 40% das 5 amostras analisadas.

**90 dias de armazenagem:** Não foram identificados níveis de fumonisina neste período.

**120 dias de armazenagem:** Neste período houve um maior número de amostras (pontos B, D e E) contaminados com níveis de 148  $\mu\text{g/g}$ , 86,5  $\mu\text{g/g}$  e 2.891  $\mu\text{g/g}$  respectivamente 60% das 5 amostras

**150 dias de armazenagem:** Não foram identificados níveis de fumonisina neste período.

**180 dias de armazenagem:** Das 5 amostras analisadas 40% apresentaram níveis de 53,2 e 54,7  $\mu\text{g/g}$  respectivamente nos pontos A e D.



**Figura 4.6** - Porcentagem de contaminação de fumonisina B<sub>1</sub> (%) em amostras de grãos de trigo no período de (0 – 180) dias de armazenagem

Em estudo realizado por Birck et al. (2003), no Moinho Cotriguaçu avaliando a qualidade do trigo e farinhas comum e especial após o processamento, (Artigo 3) foram encontrados níveis de fumonisina para o trigo variando de 0,5 a 3,9 µg/g e para as farinhas de 0,6 a 2,3 µg/g. Dados que demonstram que a fumonisina não é eliminada do trigo durante a limpeza dos grãos e o processamento de moagem. É igualmente distribuída na farinha e farelo de trigo durante o processo de moagem (Tabela 3.2 e 3.3). Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho.

Durante o monitoramento, no período de 150 dias de armazenagem, foi retirada uma amostra representativa dos 5 pontos (A, B, C, D e E), do silo 13 utilizando no experimento, esta amostra foi enviada ao laboratório Central Laboratories Friedriebsdorf, na Alemanha, para análise de micotoxinas e pesticidas (Anexo 6). Os resultados confirmaram com o que obtivemos para micotoxinas nesse mesmo período (150 dias).

Comparativamente, na armazenagem do Moinho Cotriguaçu, existiam outros silos e de um destes, o silo número 5 foi retirada uma amostra de trigo, proveniente do Rio Grande do Sul, armazenado nas mesmas condições do trigo silo 13 utilizado no experimento, e enviado para análise no mesmo laboratório. Esta análise realizada no laboratório Central Laboratories Friedriebsdorf, na Alemanha, e confirmou a positividade para DON (Anexo 7). Estes resultados se devem ao fato da Região do Rio Grande do Sul ser uma região mais fria e úmida, propiciando o desenvolvimento do fungo *Fusarium graminearum*, produtor do DON.

Em nossos resultados não encontramos a presença de DON que nos leva a crer que possa ser devido a Região muito quente e de baixa umidade relativa, tornado o solo mais seco e árido.

A rastreabilidade é fundamental para auxiliar nas medidas de controle e garantir a segurança do alimento livre de contaminantes naturais e químicos. Para melhor correlacionar o obtido no presente estudo e determinar medidas preventivas de controle, foram rastreados os produtos químicos (inseticidas, fungicidas e pesticidas) aplicados no cultivo do trigo (Anexo 8), e as

condições ambientais como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluvial (Tabela 4.3).

#### **4.4 Conclusões**

Considerando-se que foram detectados fungos toxigênicos e toxinas FB<sub>1</sub> e visto que um dos problemas microbiológicos das indústrias moageiras é o alto índice de bolores e leveduras, torna-se imprescindível à adoção de medidas de controle em toda a cadeia produtiva, desde o preparo no cultivo, colheita, armazenagem e durante o processamento de alimentos derivados de trigo.

Não foram detectadas micotoxinas (AFLs, OTA, ZEA e DON), em nenhuma das 35 amostras de trigo analisadas no período de armazenagem, o que significa uma boa qualidade sanitária do trigo produzido e armazenado.

A não detecção dessas micotoxinas no período que durou pode estar relacionado às condições ambientais, temperatura e manejo durante o período da armazenagem, condições estas que reduzem a proliferação de fungos presentes na massa de grãos.

#### 4.5 Referências Bibliográficas

AOAC – OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Fumonisin in Corn–Liquid Chromatographic Method, AOAC Official Method 995.15 **Natural toxics**, v. 2 p. 49-51, 2000.

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principales of seed pathology**. 2º ed., Boca Raton, Florida: CRC, 1997. 539p.

ARAÚJO, D. D. F.; DILKIN, M. FICK, F. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Concentrações de deoxivalenol em farinha de trigo. Universidade Federal de Santa Maria, RS. Lamic. 2004.

AZEVEDO, I.G. Estudo da microbiota fúngica e influência da temperatura e umidade na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link, 1809 em amostras de milho provenientes de silos. São Paulo, **Dissertação de Mestrado** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1988.

BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C.; OLIVEIRA, M. dos S.; DE SOUZA, M. M.; KUHN, R. C.; Avaliação da qualidade de farinha de trigo e produtos de panificação comercializadas no Rio Grande Do Sul. IN: Simpósio de Ciências de Alimentos-Alimentos e Saúde. Florianópolis-SC/UFSC, **Anais...** v.1, p.1-4. 2003.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. 218p.

BIRCK, N. M. M.; LORINI, I.; SCUSSEL, V. M. Sanitary Conditions and Mycotoxins in Wheat Grains (*Triticum Aestivum*) and Flour (Common and Special) Through Milling Processing. **Anais...** IV Congreso Latinoamericano De Mycotoxicologia. La Habana, Cuba. 2003.

BRASIL – Ministério da agricultura e Abastecimento. Regulamento Técnico de identidade e de qualidade do trigo. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Instrução Normativa n. 7, de 15 de agosto de 2001.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECNOLOGY. Mycotoxins: **economic and health ristes**. Ames, IA: Report; 1989. n.116, p.91. 2003.

DA MATA, A. C.; FARONI, L. R. D’A.; BERBERT, P. A.; DHINGRA, O. D. Utilização de fosfina no controle de *Aspergillus flavus* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Armazenagem**. Viçosa, v.24, n.1, p.03-08, 1999.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; DE ALMEIDA C. A. A.; CORRÊA, B. Robotic automated clean-up for detection of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based feed by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography A**, 925: 151 – 157, 2001.

GARCIA, M. J. M.; BIAGGIONI, M. A. M.; FERREIRA, W. A.; KOHARA, E. Y.; ALMEIDA, A. M. Sucessão de espécies de fungos em milho armazenado em sistema aerado. *Revista Brasileira de Armazenagem*, Viçosa, MG, v.27, n.2, p.14-22, 2002.

GARCIA, M. J. de M.; BIAGGIONI, M. A. M.; FERREIRA, W. A.; KOHARA, E. Y.; de ALMEIDA, A. M. Sucessão de espécies de fungos em milho armazenado em sistema aerado. **Revista Brasileira de Armazenagem**. Viçosa, Mg, v.27, n.2, p.14-22, 2003.

GLORIA, E. M.; CIACCO, C. F.; LOPES FILHO, J. F.; ERICSSON, C.; ZOCCHI, S. S. Distribution of Aflatoxin Contamination in Maize Samples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.24, n.1. Campinas Jan/Mar. 2004.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their tetemorphs. North ryde, N.S.W.: **Csiro Divison of Food Processing**, 1998.

KRABBE, E. L. Efeito do desenvolvimento fúngico em grãos de milho durante o armazenamento e do uso de ácido propiônico sobre as características nutricionais e o desempenho de frangos de corte. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Agronomia-UFRGS, Porto Alegre, RS, 176p. 1995.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2º ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997. 148p.

MALLMANN, C..A. Automation of the analytical procedure for the simultaneous determination of aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2. In: **X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. Guarujá – São Paulo – Brasil 2000.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, M.; MÜRMAN, L.; DILKIN, P. ALMEIDA, C. A. A. Avaliação da contaminação por deoxivalenol em trigo utilizado na alimentação humana. **Anais...** I Congresso Brasileiro de Farmácia 2003.

McMILLIAN, W.W.; WILSON, D.M.; MIROCHA, C.J.; WIDSTROM, N.M. Mycotoxin contamination in grain sorghum from fields in Georgia and Mississipi. **Cereal Chem**, v. 60, p. 226-31, 1983.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphics states *Eupenicillium* and *Taloromyces***. London: Academic Press, 1979, 634p.

PITT, J. I. Food mycology- an emerging discipline. **Journal Applied Bacteriology**. SYMPOSIUM supplement. V. 67, n. 18, p. 75-95, 1988.

POZZI, C. R.; CORRÊA, B. Milho pós-colheita e armazenado microbiota fúngica e ocorrência de micotoxinas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. São Paulo, v.31, n.1, 1994.

PUZZI, D. **Armazenamento e Abastecimento de Grãos**. Campinas, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 603p. 1986.

RAMAKRISHNA, Y.; RAMESH, V. B.; VASANTHI, S. Natural occurrence of Mycotoxins in staple foods in India. **Journal Agriculture Food Chemical.**, v.38, p.1857-59, 1990.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus* Baltimore.** Williams & Wilkins Company, 1965, 686 p.

SANTOS, J. P.; MANTOVANI, E. C. Perdas de grãos do milho pré-colheita, colheita, transporte e armazenamento. Sete Lagoas: **EMBRAPA/CNPMS**, 1997, 6p. (Circular Técnica, 24).

SANTOS, J. P.; Métodos preventivos de controle de pragas de grãos armazenados In: Lorini, I.; Miike, L. H.; Scussel, M. V. (ed) **Armazenagem de grãos.**Campinas IBG, p. 399-441, 2002.

SCAFF, R. **Fumonisin em derivados de milho comercializados em Santa Catarina e sua relação com a saúde humana e alterações histopatológicas em fígado de catfish tratados.** Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

SCUDAMORE, K.A. Identifying Mycotoxins is Paramount in the fight against their spread. **Word Grain.** The international business magazine for grain, flour and feed. February. V.23, n.2, p. 36-39, 2005.

SCUSSEL, V.M. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. In, LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (Eds) **Armazenagem de Grãos**, Campinas, IBG. p. 739-756 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Métodos de análise microbiológica de alimentos. **Campinas: Instituto de tecnologia de Alimentos**, 1995, p. 21-29.

SOARES, L. M .V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brasilian foods by use multitoxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal Chem.** v. 72, n. 1, p. 22-26 1989.

VIEIRA, A. P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** V.19, n.2. Campinas May/Aug 1999.



## **ARTIGO 3**

## RELAÇÃO DA INFESTAÇÃO DE INSETOS COM FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO RECÉM-COLHIDO E ARMAZENADO

### RESUMO

A infestação e a contaminação por insetos em trigo (*Triticum aestivum*) em pós-colheita foi avaliada durante seis meses (novembro 2003 a maio 2004). O trigo foi armazenado em um silo com capacidade de 1.000 toneladas, dividido virtualmente em 5 partes iguais e monitorado periodicamente, retirando amostras dos grãos em intervalos de 30 dias. Foram analisadas, a presença externa e infestação interna por insetos nos grãos. Das 35 amostras avaliadas, a quantidade de insetos foi de 1 a 7 (85,7%) insetos vivos e zero a 11 (71,4%) de mortos por amostra. No recebimento do trigo não foi identificado nenhum inseto vivo ou morto. A totalidade das amostras (35) apresentaram infestação interna, com índices variando de 1 a 4 insetos inteiros, 1 a 9 larvas e 1 a 26 fragmentos de insetos, por amostra ao longo do período de 6 meses de armazenagem. Considerando que o ciclo de vida destas espécies é de 35 dias, em média, e que podem ovipositar de 250 a 300 ovos durante sua vida, esta pequena infestação encontrada, se não controlada eficazmente, pode ocasionar elevadas perdas quantitativas e qualitativas, além dos riscos a saúde humana e animal, que pode ser devido a contaminação de alimentos derivados destes grãos, uma vez que são carreadores de esporos de fungos contaminantes da parte interna dos grãos. Estes resultados indicam a necessidade de um monitoramento intenso destas pragas, aplicando-se medidas de controle como o Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados (MIPGRÃOS), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

**Palavras-chave:** trigo; armazenagem; inseto; infestação interna.

## ABSTRACT

The infestation and contamination by insects in wheat grains (*Triticum aestivum*) post-harvest, was carried out during six months of storage (November 2003 to May 2004). The wheat was stored in a 1000 tons capacity silo, virtually divided in 5 identical parts with a periodic control samples of grains were removed at intervals of 30 days. The insects identification in the wheat grains mass was made by sifting technique (sifter of oblong sieve of 1.75 x 20.0 mm) and the grains interval identification was made through AOAC methodology. In 35 appraised samples was verified that the amount of live insects were from 1 to 7 (85.7 %) and died zero to 11 (71.4 %) per sample. Before unloading the grains no alive or dead insect, was identified. The total samples (35) presented internal infestation with a variance from 1 to 4 of whole insects, 1 to 9 of larvae and 1 to 26 of fragments per sample, during 6 months of storage. Considering the cycle of these species life is an average of 35 days, which can lay from 250 to 300 eggs during their lives. When a small infestation is found and if it is not well controlled it can cause quantitative and qualitative losses, besides the risks to human and animal health, which can be infected with the food that are derived from these grains, whereas they are the conveyers of the fungus spores, that infect the mass of the grains, such as the endosperm. Such results indicated the need of an intense inspection of these pests. For this we have to apply the control measures such as; Integrated Handling of Pests in Stored Grains (IHPSG) Analyses of Critical Points of Control and Danger (HACCP) and Good Practices of Production (GPP).

**Key-word:** wheat; storage; insect; internal infestation.

## 5.1 Introdução

As perdas na cadeia produtiva, e durante a comercialização dos grãos no Brasil são significativas, em uma produção anual de 130 milhões de toneladas de trigo no Brasil, 20% são desperdiçados no processo de colheita e transporte, e 10% no armazenamento por ataque de pragas (BRASIL, 1993; BESKOW & DECKERS, 2002; LORINI, 2003).

O armazenamento e a manipulação inadequada dos produtos podem aumentar as perdas de qualidade, caracterizada pelo aumento da suscetibilidade à contaminação por fungos, insetos e ácaros, com diminuição do poder germinativo, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais (como perda de carboidratos, proteínas, vitaminas, entre outros) (POMERANZ, 1982; LACEY et al., 1991).

Freqüentemente observa-se apodrecimento de grandes quantidades de grãos nos armazéns e problemas na comercialização de grãos e de farinha, devido à presença de insetos ou de restos de insetos, fatores oriundos da má conservação de grãos (LORINI, 2001).

O problema de higiene pode existir desde a matéria-prima, industrialização, como também no produto final e torna necessário um controle sistemático do alimento, que pode sofrer contaminação por pragas durante o transporte, armazenamento e processamento (MATTOS et al., 2003).

Os insetos são alguns dos fatores que estão diretamente relacionados com a perda quantitativa e qualitativa dos cereais (BIRCK et al., 2003a; 2003b). Os insetos que estão envolvidos no processo de armazenamento e processamento, pertencem principalmente as espécies *Sitophilus oryzae*, *S. zeamais*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum*, *Rhyzopertaa dominica* e *Cryptolestes ferrugineus* (LORINI, 2003).

As perdas no peso de grãos, ocasionadas por pragas em armazéns, presença de fragmentos de insetos nos subprodutos alimentares, deterioração da massa de grãos, contaminação fúngica, presença de micotoxinas, são efeitos negativos à saúde humana e animal, e as dificuldades para exportação de produtos e subprodutos, devido ao potencial de risco de contaminação, constituem

um dos problemas que a má armazenagem de grãos traz para a sociedade brasileira (LORINI, 2002; 2003).

A presença de insetos mortos e larvas mortas e de outras matérias estranhas em grãos indica problemas na limpeza do cereal. Insetos inteiros, cabeça de insetos, larvas inteiras e cabeças de larvas recuperadas pelo método de infestação interna, indicam que o cereal continha larvas e insetos primários dentro dos grãos, e que a presença de ovos, pupas, larvas, insetos e exúvia nas amostras indica que havia insetos em atividade biológica, completando seu ciclo evolutivo neste produto (ATUI et al., 1998).

O crescimento populacional de *Rhyzoperha dominica* em trigo, com diferentes temperaturas e teor de umidade de 11,1% b.u., constatou que o maior crescimento populacional de insetos ocorreu na temperatura de 33,3°C e diminuiu drasticamente nas temperaturas inferiores a 32°C (SILVA et al., 2003). As populações de *R. dominica* declinaram, mas não foram extintas em 90 dias de armazenagem a 16°C. A infestação por insetos também pode propiciar o aumento da temperatura durante atividade metabólica, levando a água para outras partes dos grãos (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1974).

As massas alimentícias, popularmente conhecidas como macarrão, que tem como principal matéria prima a farinha ou sêmola de trigo podem apresentar contaminação biológica causada pelos próprios ingredientes, ou adquirida na sua elaboração (ZAMBONI & ATUI, 1989). Segundo estes mesmos autores os principais contaminantes encontrados neste tipo de alimento são fragmentos de insetos originários do trigo contaminado por pragas do campo ou nos armazéns, empregado na sua fabricação, pela manipulação ou estocagem de farinha em condições higiênicas insatisfatórias, e pelos insetos que atacam o macarrão durante a sua elaboração.

Santos et al. 1991 ao analisarem as condições da merenda escolar quanto à presença de matérias estranhas leves (insetos, fragmentos e larvas), além de partículas metálicas, encontraram 66% de fragmentos de insetos nas amostras de mistura láctea para mingau.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o grau de infestação de insetos nos grãos de trigo armazenados, seus fragmentos na farinha produzida, e sua relação com o veículo de transporte de contaminantes aos alimentos.

## 5.2 Material e Método

**5.2.1 Amostra:** O trabalho foi realizado com 1000 toneladas de grãos de trigo provenientes da Cooperativa Mista Vale do Piquiri Ltda (Cvale), classificados como Trigo Melhorador, das variedades Coodetec 104 (74%), Iapar 78 (25%) e Iapar 85 (1%). Estes grãos foram produzidos no município de Assis Chateaubriand, PR.

O trigo após ser colhido foi entregue pelos produtores na cooperativa Cvale, onde foi submetido o procedimento padrão de limpeza (máximo 1% de impurezas) e secagem dos grãos (umidade 13%). Após este processo os grãos foram enviados ao Moinho de Trigo Cotriguaçu para o armazenamento e produção de farinha. No recebimento dos grãos no moinho, foram iniciadas as coletas de amostras para a pesquisa, considerado tempo zero, logo após a colheita, e a cada 30 dias durante os 180 dias de armazenamento. A pesquisa foi desenvolvida de novembro de 2003 a maio de 2004, com um total de 35 amostras.

### 5.2.2 Armazenamento do Trigo

O silo utilizado no experimento foi previamente limpo (aspiração do pó, remoção de restos de resíduos de grãos dos lotes anteriores e aplicação de inseticida por pulverização). As 1.000 toneladas de trigo foram armazenadas em silo vertical construído em alvenaria, identificado com número 13, com as respectivas medidas 18,0 m de altura e 14,8 m de diâmetro, sendo virtualmente dividido em cinco partes iguais (A, B, C, D e E) para fins de coleta de amostras para o desenvolvimento da pesquisa, conforme esquema mostrado na Figura 4.2.

### 5.2.3 A coleta das amostras

**(a) Logo após a colheita (tempo zero de armazenagem)** foi realizada diretamente do caminhão de acordo com a chegada do mesmo para descarga no moinho. Esta foi feita por técnicos do setor da armazenagem da empresa, conforme metodologia oficial de amostragem (Brasil, 2001) com auxílio de um calador. À medida que foram chegando os caminhões para

descarga, foram retiradas amostras em 11 pontos distintos (Figura 4.1) da carga, correspondendo a aproximadamente 500 g por caminhão, e colocadas em um recipiente plástico. Até atingir o correspondente a 200 toneladas amostradas. Essa amostra foi registrada como amostra A, representando as primeiras 200 toneladas, que foram colocadas no fundo do silo, outras 4 amostras foram obtidas de forma semelhante, representando as amostras A, B, C, D e E, atingindo assim as 1.000 toneladas de trigo (capacidade total do silo).

**(b) Durante o período de 180 dias de armazenamento** do trigo foi realizada coleta por técnicos do Moinho Cotriguaçu, sob orientação de técnicos especializados em armazenagem de grãos do centro de pesquisa da Embrapa Trigo. O trigo armazenado e usado no experimento foi monitorado durante os 180 dias, e a cada 30 dias foi procedida a coleta das amostras para análise em 5 pontos distintos do silo, denominados pontos (A, B, C, D e E).

Para a coleta de amostras o silo de 18 metros de altura foi dividido virtualmente em cinco partes iguais, sendo: ponto A de 0 a 3,6m da base, ponto B de 3,6 a 7,2 m da base, ponto C de 7,2 a 10,8 m da base, ponto D de 10,8 a 14,4 m da base e ponto E de 14,4 a 18,0 m da base. Para que a coleta das amostras fosse realizada exatamente nestes pontos de amostragem, foi calculado o tempo necessário para transilar todo o silo, através da técnica do copo plástico. Esta consistiu em iniciar a transilagem dos grãos, colocando na parte superior central do silo um copo plástico de 50 ml de capacidade, a medida que os grãos eram retirados o copo descia para a parte inferior, até chegar no fundo do silo quando a transilagem terminou. Com o tempo de transilagem medido e a altura do silo, retiraram-se as amostras de grãos nas datas previstas, conforme os pontos (A, B, C, D e E), descritos acima.

Foram necessárias 10 horas para a transilagem completa dos grãos, correspondendo a duas horas por ponto de coleta. Para cada ponto de coleta, durante a transilagem, foram retirados 20 kg de trigo pela coleta de 1,0 kg para cada seis minutos de transilagem. Estas foram homogeneizadas e por técnica de quarteamento manual, foram retirados 5,0 kg, estes foram homogeneizados pela segunda vez, e retirada uma amostra de 1,0 kg para as análises. As amostras foram coletadas na base do silo por queda livre, embaladas em sacos de papel Kraft e armazenadas.

**5.2.4 Preparo das Amostras:** para a identificação da presença de insetos após a coleta, as amostras foram homogeneizadas e realizadas a verificação da presença de insetos em cada ponto por técnica de peneiragem (n= 3). *Para a determinação de infestação interna*, cada amostra foi moída em moinho bicone, homogeneizada e reduzida através da técnica de quarteamento manual até 500 g (sub-amostra) e desta foram retiradas alíquotas de 50 g para análise (n=2).

**5.2.5 Determinação da Presença de Insetos nos Grãos de Trigo:** a presença de insetos-praga de trigo armazenado foi verificada em todas as amostras coletadas para esta pesquisa. Esta foi feita no momento da coleta das primeiras amostras, ainda na chegada dos caminhões para descarga dos grãos no moinho, detectando a infestação proveniente do campo, e a cada 30 dias, durante todo o período de armazenamento. A verificação foi realizada através da técnica de peneiragem dos grãos da amostra, utilizando peneiras metálicas, de crivo oblongo de 1,75 x 20,0 mm (espessura da chapa de 0,72 mm), quantificando e identificando as espécies pragas. A fim de verificar se os insetos são ou não carreadores de contaminantes como, por exemplo, fungos para a massa de grãos armazenados, utilizamos a técnicas de inoculação em meio de cultura agar dextrose de batata, os insetos encontrados nos pontos amostrados do silo (A, B, C, D e E), foram divididos em dois grupos, o primeiro foi inoculado direto ao meio de cultura, o segundo grupo passou por descontaminação, lavagem externa com solução de hipoclorito a 2% em seguida foi inoculado, ambos os grupos foram incubados por um período de 3 a 5 dias em temperatura de 25°C e foi verificada a contaminação fúngica.

**5.2.6 Análise de Infestação Interna em Grãos:** Esta visou determinar a presença de insetos, larvas e/ou insetos no interior dos grãos de trigo, equivalentes (cabeça de larvas e de insetos), pelo método n°. 982.31, da AOAC (2000) referenciada na portaria n° 74 (BRASIL, 1994), que determina infestação interna de grãos, por hidrólise ácida e flutuação. O método de infestação interna permite a verificação de larvas e/ou insetos primários que se encontram dentro do grão, mas foi feita a contagem de fragmentos. O método está dividido nas etapas de separação, isolamento e identificação da infestação por insetos, através de varredura ao microscópio estereoscópio com o aumento (15x).

**5.2.7 Determinação do Conteúdo de Umidade:** a umidade percentual dos grãos foi determinada em duplicata, por aquecimento direto das amostras a 130°C em estufa com rígido controle de temperatura, conforme metodologia oficial da AOAC (2000).



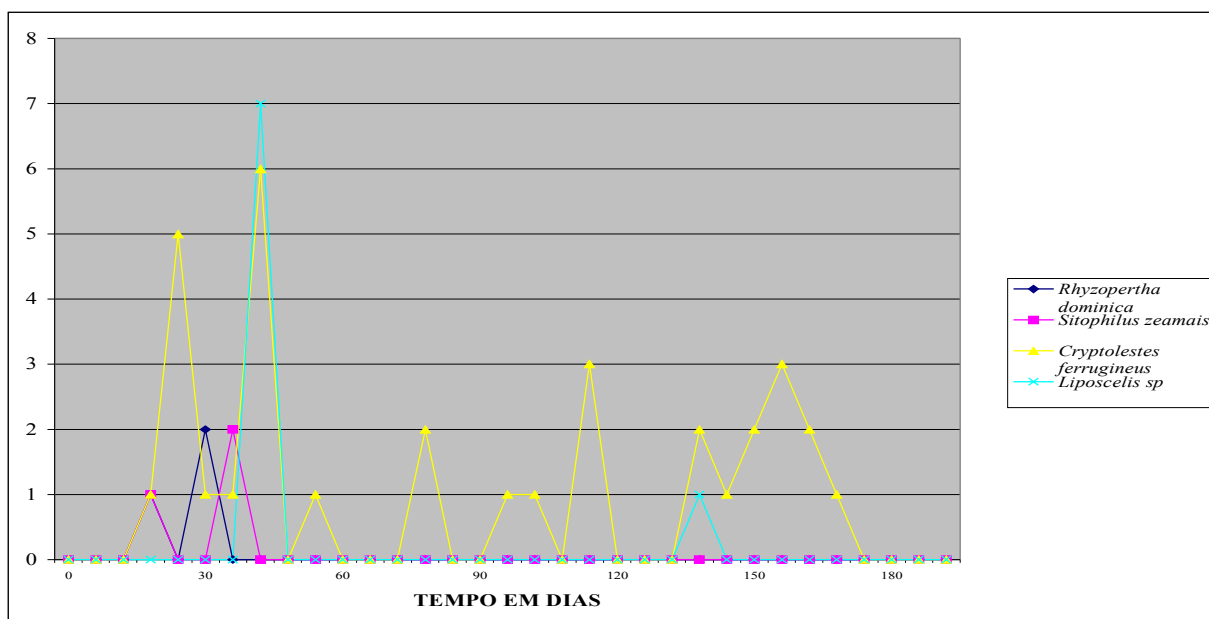
### 5.3 Resultado e Discussão

Os insetos ao atacarem produtos armazenados causam danos de natureza quantitativas e qualitativas, caracterizadas pela diminuição do valor nutritivo em função da redução de carboidratos, proteínas, vitaminas, entre outros. Os insetos encontrados nos grãos de trigo armazenados foram das espécies *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus zeamais*, *Cryptolestes ferrugineus* e *Liposcelis* sp. O conhecimento do hábito alimentar de cada praga constitui elemento importante para definir o manejo a ser implementado na massa de grãos. Segundo este hábito, as pragas podem ser classificadas em primárias ou secundárias.

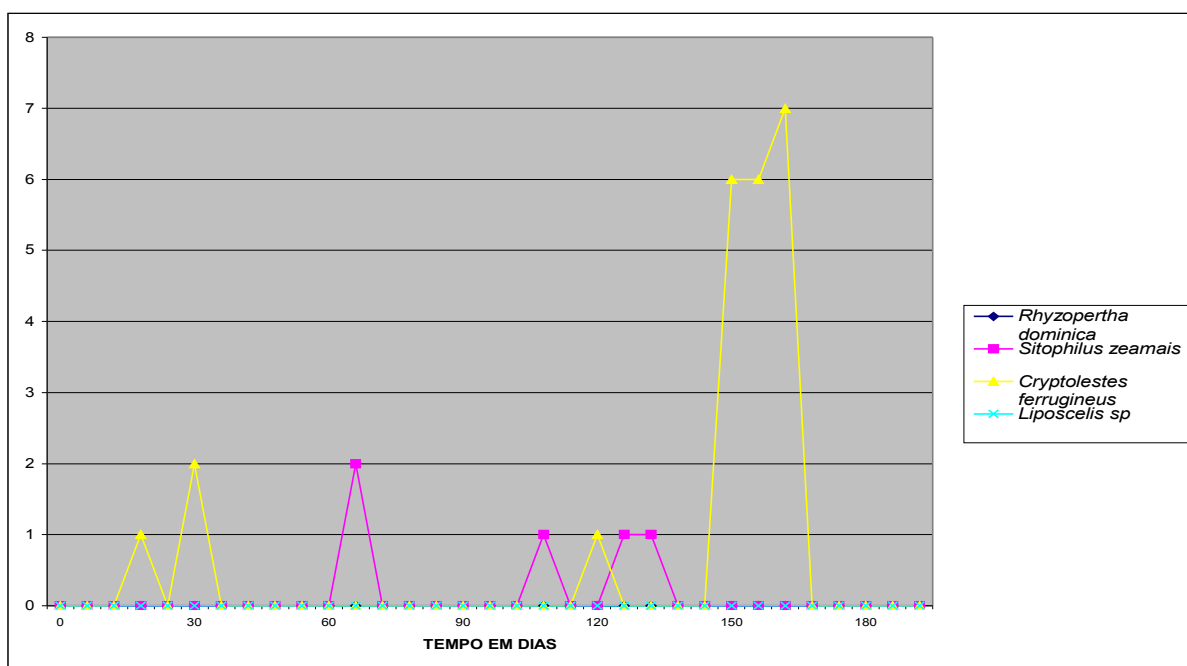
#### Presença de insetos nos grãos

O monitoramento foi realizado durante período de seis meses, tempo em média que as indústrias moageiras mantêm os grãos armazenados em intervalos de uma safra a outra. Foi monitorada a presença de insetos nos grãos de trigo recém-colhido e durante o armazenamento. No período recém-colhido não foi detectada presença de insetos nos grãos de trigo, porém ocorreu uma infestação no final do período de 30 e 150 dias de armazenagem (Tabela 5.1), nos períodos subsequentes aos tratamentos com fosfina houve uma diminuição do número de insetos (Figura 5.1 e 5.2).

Concluiu-se que possa ter ocorrido uma falha na aplicação da fosfina, realizados no início dos períodos de 60 e 180 dias de armazenagem, ou ocorrido resistência destas pragas ao produto, tendo reincidências de infestação em curto período de tempo.



**Figura 5.1** Presença de insetos vivos nos grãos de trigo recém-colhido e ao longo do armazenamento.



**Figura 5.2** - Presença de insetos mortos nos grãos de trigo após tratamento com fosfina ao longo do armazenamento.

Durante a coleta observou-se que 60% das 35 amostras de trigo correspondentes aos pontos A, B, C, D e E apresentaram insetos durante o experimento (Tabela 5.1).

Foram também determinadas as infestações internas dos grãos de trigo, quantificando o número de larvas e insetos inteiros (cabeça de larvas e/ou de insetos) de acordo com o método da AOAC, e o número de fragmentos de insetos não previsto no método, sendo considerado somente o número de fragmentos para o subproduto farinha (Tabela 5.2).

### Períodos de armazenagem

**Recém-colhido (tempo zero):** não foi detectado nenhum inseto externo nos grãos pela técnica de peneiragem nos pontos A, B, C, D e E. Já para análise de infestação interna, foi identificado 6 fragmentos de insetos no ponto A, nenhum inseto inteiro e/ou equivalentes (cabeça de larvas e de insetos).

**30 dias:** foram encontrados na amostra A 1 inseto vivo da espécie *Rhyzoperta dominica*; na amostra D 2 insetos vivos das espécies *Rhyzopertha dominica* e *Sitophilus zeamais*; nos pontos A, C, D 1 inseto vivo, B 5 insetos vivos, e E 6 insetos vivos; nos pontos A 1 inseto morto e no ponto D 2 insetos mortos da espécie *Cryptolestes ferrugineus*. No ponto E foram encontrados 7 insetos vivos da espécie *Liposcelis* spp. Na análise de infestação interna, no ponto A foi encontradas 9 larvas, 11 fragmentos de insetos e 1 inseto inteiro; no ponto B 2 larvas, 17 fragmentos de insetos e 4 insetos inteiros; no ponto C 5 larvas, 9 fragmentos de insetos e 2 insetos inteiros; no ponto D 6 larvas, 26 fragmentos de insetos e 4 insetos inteiros; no ponto E 13 fragmentos de insetos. A menor infestação neste período foi devido ao expurgo com fosfina realizado para a eliminação das pragas.

**60 dias:** Nos pontos A, B, C, D e E

, não foi encontrado *Rhyzoperta dominica* e *Liposcelis* sp; no ponto D foi encontrado 2 insetos mortos da espécie *Sitophilus zeamais*; no ponto B 1 inseto vivo da espécie *Cryptolestes ferrugineus*. Na análise de infestação interna, no ponto A foram encontradas 3 larvas e 6 fragmentos de insetos; no ponto B 2 larvas e 1 fragmento de inseto; no ponto C 4 fragmentos de insetos; no ponto D 1 larva e 2 fragmentos de insetos e no ponto E 3 fragmentos de insetos.

**90 dias:** não foram detectadas presença de insetos vivos e mortos das espécies *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus zeamais* e *Liposcelis* sp; no ponto A 2 insetos vivos e nos pontos D, E 1

inseto vivo da espécie *Cryptolestes ferrugineus*. Na análise de infestação interna, nos pontos A, B, D não foram encontradas presença de insetos inteiros (cabeça de larvas e/ou insetos) e fragmentos de insetos; já nos pontos C foram encontrados 1 fragmento de inseto e 1 inseto inteiro; no ponto E e 1 fragmento de inseto e 2 insetos inteiros.

**120 dias:** não foram encontrados em nenhum ponto insetos vivos e mortos das espécies *Rhyzoperta dominica* e *Liposcelis sp*; nos pontos A, D, E 1 inseto morto da espécie *Sitophilus zeamais*; no ponto B 3 insetos vivos e no ponto C 1 inseto morto ambos da espécie *Cryptolestes ferrugineus*. Na análise de infestação interna, nos pontos A, E foram encontradas 1 fragmento de inseto; nos pontos C, D 2 fragmentos de insetos; no ponto B 5 fragmentos de insetos, somente no ponto C 1 larva; nos pontos B, E 1 inseto inteiro e no ponto A 2 insetos inteiros.

**Tabela 5.1** Identificação e quantificação de insetos por espécie na massa de grãos de trigo recém-colhido e ao longo do armazenamento.

		<b>Espécies de pragas em grãos armazenados</b>									
		<i>Rhyzopertha dominica</i>		<i>Sitophilus zeamais</i>		<i>Cryptolestes ferrugineus</i>		<i>Liposcelis sp</i>			
<b>Tempo em dias</b>	<b>Amostras</b>	<b>vivo</b>	<b>Morto</b>	<b>vivo</b>	<b>morto</b>	<b>vivo</b>	<b>Morto</b>	<b>vivo</b>	<b>morto</b>	<b>vivo</b>	<b>morto</b>
Tempo inicial	A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	A	1	ND	1	ND	1	1	ND	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	ND	1	2	ND	ND	ND	ND
	D	2	ND	2	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND	ND	6	ND	7	ND	ND	ND
60	A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
90	A	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
120	A	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND	ND	3	ND	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
150	A	ND	ND	ND	ND	2	ND	1	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	ND	2	6	ND	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND	ND	3	6	ND	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND	ND	2	7	ND	ND	ND	ND
180	A	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* ND = Não detectada pela metodologia empregada.

**Tabela 5.2** Identificação e quantificação de insetos, larvas e fragmentos no interior do grão de trigo durante o armazenamento.

Tempo em dias	Amostras																	
	B			C			D			E			MD					
	La	I.I.	F.I.	La	I.I.	F.I.	La	I.I.	F.I.	La	I.I.	F.I.	La	I.I.	F.I.	I.I.	F.I.	
Tempo inicial	Aus.	Aus.	6	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	0,00	0,00	1,2
30	9	1	11	2	4	17	5	2	9	6	4	26	Aus.	Aus.	13	4,4	2,2	15,2
60	3	3	6	2	1	1	Aus.	Aus.	4	1	Aus.	2	Aus.	Aus.	3	0,86	0,57	2,28
90	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	1	1	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	2	1	0,00	0,43	0,26
120	Aus.	2	1	Aus.	1	5	1	Aus.	2	Aus.	Aus.	2	Aus.	1	1	0,00	0,57	1,57
150	1	Aus.	2	3	Aus.	3	3	Aus.	3	3	1	5	2	1	2	1,71	0,26	2,14
180	1	Aus.	2	1	Aus.	4	Aus.	Aus.	2	1	Aus.	Aus.	1	Aus.	Aus.	0,80	0,00	1,60

\* Aus. = ausencia

La – Larvas

I. I. – Insetos Inteiros

F. I. – Fragmentos de Insetos

md: média correspondente as 5 repetições.

**150 dias:** não foram detectadas as presenças de insetos vivos e mortos das espécies *Rhyzopertha dominica* e *Sitophilus zeamais*; para a espécie *Cryptolestes ferrugineus* foram encontrados nos pontos (A, C, E) 2 insetos vivos; no ponto (B) 1 inseto vivo; no ponto (D) 3 insetos vivos; no ponto (C, D) 6 insetos mortos; e no ponto (E) 7 insetos mortos, para espécie *Liposcelis* sp foi encontrado no ponto (A) 1 inseto vivo. Na análise de infestação interna, no ponto (A) foi encontrada presença de 1 larva; nos pontos (B, E) 2 larvas; nos pontos (B, C, D) 3 larvas de insetos, para os pontos (A, E) 2 fragmentos de insetos; nos pontos (B, C) 3 fragmento de inseto; e no ponto (D) 5 fragmentos de insetos. Ao final dos 150 dias foi realizado o segundo expurgo com fosfina, após este houve uma diminuição na presença de insetos durante a verificação por peneiragem das amostras e nas análises internas dos grãos.

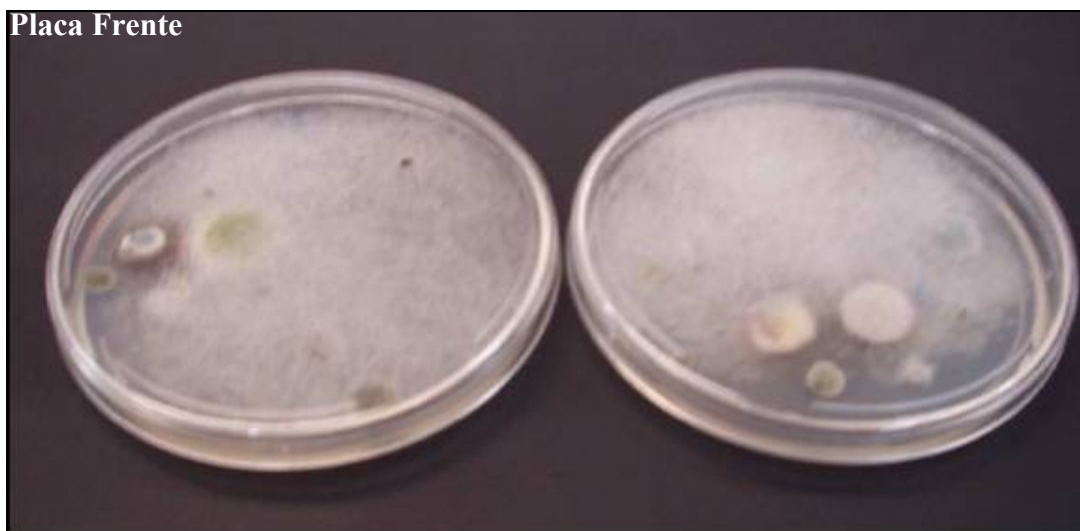
**180 dias:** foi detectado apenas (1) inseto vivo da espécie *Cryptolestes ferrugineus* no ponto (A). Na análise de infestação interna, nos pontos (A, C) foram encontradas 2 fragmentos de insetos; no ponto (B) 4 fragmentos de insetos; nos pontos (D, E) ausência de fragmentos de insetos. Porém não foi identificado presença de insetos inteiros em nenhum dos pontos amostrados. A incidência média para as 5 amostras de 0 a 180 dias correspondente aos pontos (A, B, C, D, E), foi de 0 a 1,71 larvas de 0 a 0,57 insetos inteiros, e de 0,26 a 15,2 fragmentos de insetos (Tabela 5.2). A atual legislação brasileira (Brasil, 2003) não considera insetos que desenvolvam seu ciclo de vida no próprio alimento como insetos vetores carreadores de contaminantes. Os resultados encontrados mostram que os grãos estão de acordo com a legislação, porém deve-se considerar que os danos ocasionados pelos insetos e as contaminações fúngicas e de micotoxinas, podem diminuir a qualidade nutricional e econômica dos grãos.

Segundo Lorini (2003), as pragas podem ser classificadas em primárias e secundárias, as primárias são aquelas que atacam grãos internos e sadios, dependendo da parte do grão que atacam, podem ser denominadas pragas primárias internas ou externas. As espécies *Rhyzopertha dominica* e *Sitophilus zeamais*, são pragas primárias internas perfuram os grãos e neles penetram para completar seu desenvolvimento, alimentando-se de todo o interior do grão e possibilitam a instalação de outros agentes de deterioração dos grãos. As espécies *Cryptolestes ferrugineus* e *Liposcelis* sp são classificadas como pragas secundárias, pois não

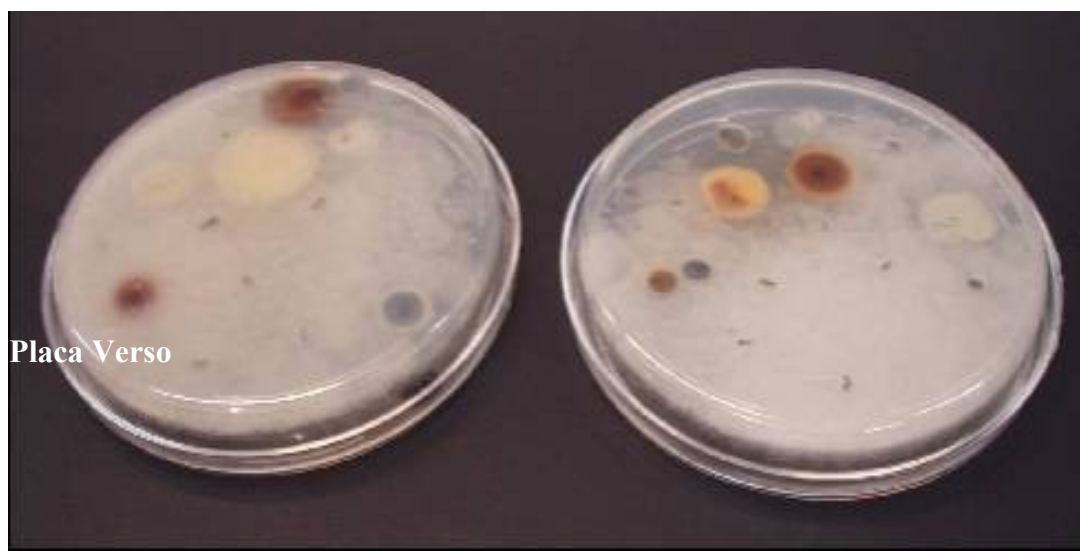
conseguem atacar grãos inteiros, necessitando que os grãos estejam danificados ou quebrados para se alimentarem. A espécie *Liposcelis* sp. é principalmente atraída por farinhas e poeira.

Os resultados encontrados no presente experimento são confirmados ao descrito por Lorini (2003) pois se analisarmos a (Tabela 5.1) observamos que das 35 amostras analisadas, 5,7% dos insetos vivos encontrados eram das espécies *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus zeamais* e *Liposcelis* sp, e 45,7% eram da espécie *Cryptolestes ferrugineu*; dos 35 pontos amostrados, 22 pontos (68,8%) apresentaram incidência de insetos para as espécies mencionadas, o número de insetos vivos encontrado em cada ponto variaram, com média de 3,1 insetos por amostra. A atual legislação Brasil (2003) não considera esses insetos como vetores mecânicos carreadores de contaminantes podendo trazer algum dano a saúde humana (Anexo 3). Porém, neste trabalho ficou evidenciado (Figuras 5.3 e 5.4), que os insetos podem carrear contaminantes como fungos para o interior dos grãos, assim como podem carrear outros contaminantes presentes na parte externa dos grãos e/ou nas estruturas de armazenamento dos cereais, o que nos leva a concluir que são excelentes vetores mecânicos de contaminantes.

Placa Frente

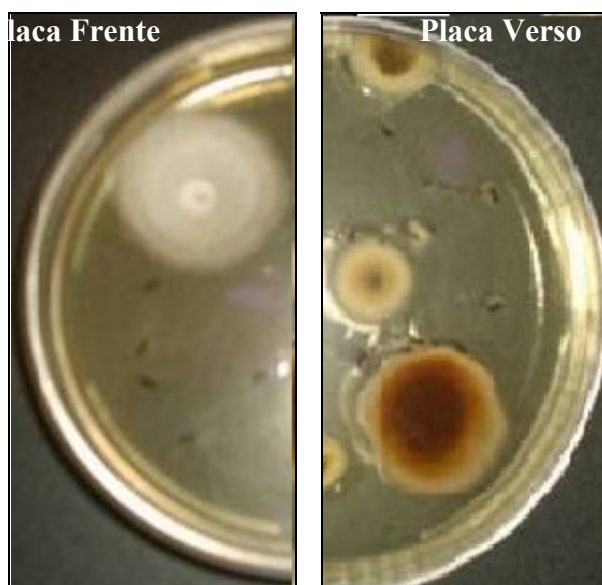


Placa Verso



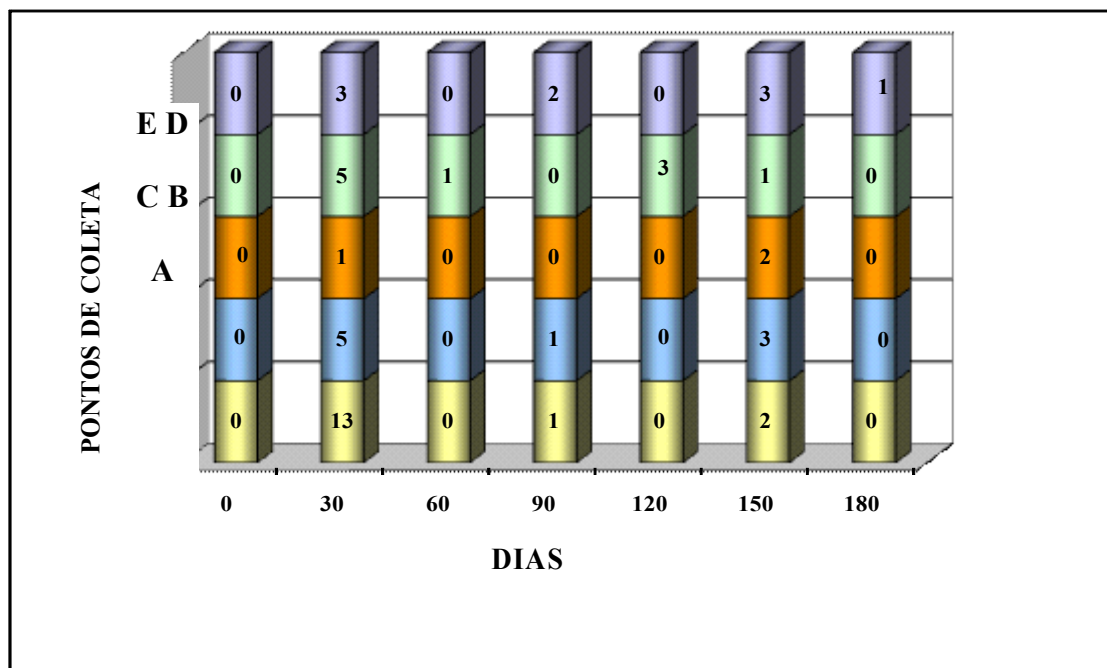


**Figura 5.3** Unidades formadoras de colônias (UFC/g) em inoculação de insetos sem descontaminação.

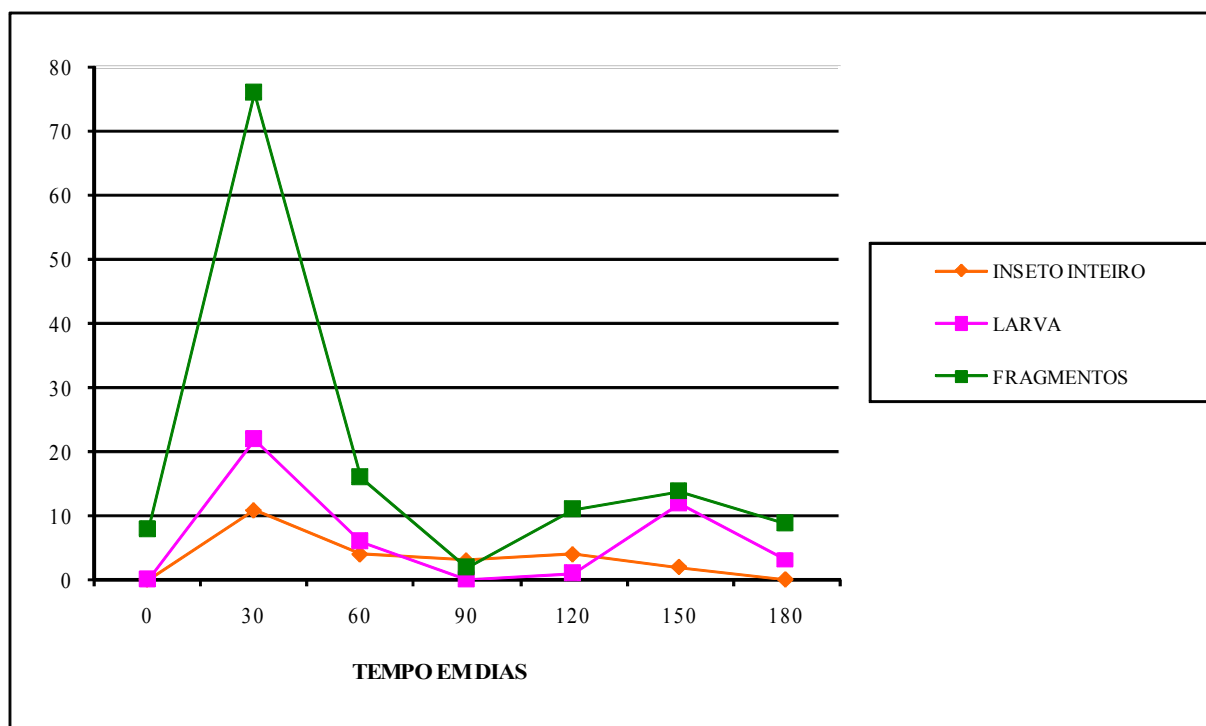


**Figura 5.4** - Unidades formadoras de colônia (UFC/g) em inoculação de insetos após descontaminação com solução de hipoclorito a 2%.

Foram também determinadas as infestações internas dos grãos de trigo, quantificando o número de larvas e insetos inteiros (cabeça de larvas e/ou de insetos) e o número de fragmentos de insetos não previsto no método, sendo considerado somente o número de fragmentos para o subproduto farinha (Tabela 5.2, Figuras 5.5 e 5.6).



**Figura 5.5** – Representação gráfica do silo de armazenagem, demonstrando os pontos de contaminação por insetos das espécies *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus zeamais* e *Cryptolestes ferrugineus*, durante o período de armazenagem



**Figura 5.6** - Infestação interna em grãos de trigo armazenado, na fase larva e adulto, no período de 0 (zero) a 180 dias.

Os resultados encontrados estão de acordo com Lorini (2002), que considera a limpeza e a higienização das instalações de unidades armazenadoras como medidas preventivas da infestação de grãos, e as mais simples de serem executadas e de menor custo, porém raramente realizadas pelos responsáveis pela armazenagem.

Santos et al. (1991) não encontrou insetos ou larvas nas amostras analisadas para bebida Láctea e mingau, mas apenas partículas e fragmentos de insetos, o que considera-se suficiente para que haja uma contaminação dos alimentos, comprovado neste experimento que os insetos são capazes de contaminar os grãos com fungos.

Os resultados encontrados estão de acordo com Zamboni & Atui (1989) que destacam que as massas alimentícias ou macarrão, que têm como principal matéria-prima à farinha ou sêmola de trigo, podem apresentar contaminação biológica causada pelos próprios ingredientes ou adquirida na sua elaboração, refletindo de forma negativa ao trigo e no processamento das farinhas.

No trabalho de Atui et al. (1998) os autores citam que o ecossistema formado por uma massa de grãos armazenados oferece condições favoráveis ao desenvolvimento de insetos, ácaros e fungos. Os danos causados pelos mesmos incluem perdas quantitativas, representadas

pelo consumo de matéria seca, e qualitativas caracterizadas pela diminuição do valor nutritivo em função da redução de carboidratos, proteínas, vitaminas e teor de óleo. Além disso, existe a contaminação devido à presença de insetos e seus resíduos em grãos de trigo e sub produtos, os quais precisam ser monitorados e reduzidas as condições favoráveis, visando minimizar o desenvolvimento dos insetos e fungos.

Mattos et al., (2003) ao avaliar diversos grupos de alimentos, concluem que dentre as matérias estranhas encontradas as mais comuns foram insetos inteiros, larvas de insetos, matéria amorfa, fragmentos de insetos e partícula carbonizada.

Atui et al. (1998) realizaram um trabalho durante um período de quatro meses, em amostras de milho em grãos e após o processamento, usando o método da (AOAC, 1994), e Manual de Análises Microscópica de Alimentos (ZAMBONI & ATUI, 1989). Das 81 amostras de milho em grãos analisados pelo método de peneiração, 29,6% apresentaram insetos vivos, 28,4% insetos mortos e 72,8% partículas metálicas. Pelo método da investigação interna, 79,0% das amostras apresentaram larvas inteiras, 43,2% cabeças de larvas, 37,05% cabeças de insetos e 27,2% insetos inteiros. Das amostras de grits, pelo método de flutuação, 76,5% apresentaram fragmentos de insetos, enquanto que as mesmas amostras, analisadas pelo método de peneiração, apresentaram predominância em 81,5% de partículas metálicas. Observaram elevada contaminação no fubá por larvas (75,3%). Devido ao número de fragmentos de insetos e à presença de larvas mortas, pupas e insetos mortos, ácaros e pêlos de animais não identificadas, 79% das amostras de fubá estavam em desacordo com a legislação em vigor. Ocorreu aumento nos níveis de matérias estranhas no grits e fubá a partir do grão de milho infestado. Segundo Atui et al., (1998), o método de peneiração é o adequado para detecção de infestação viva, partículas metálicas e dejetos de insetos, o que foi confirmado pelo presente estudo.

Elevadas porcentagens de amostras contendo fragmentos de insetos indicam que os grãos utilizados estão infestados internamente (ATUI et al., 1998).

O método de hidrólise ácida é menos demorado, menos dispendioso e permite contagem maior de fragmentos de insetos e pelos de roedores (ZAMBONI & ATUI, 1989).

Em estudo realizado por Mattos et al. (2003), ao analisar 80 amostras produtos alimentícios condenados pela presença de matérias estranhas, segundo denúncias do

consumidor, em atendimento a solicitações das vigilâncias sanitárias, os grupos de alimentos condenados com maior frequência foram produtos de panificação (32,5%), leite e derivados (10,0%), misturas ou pó para preparo de alimentos (6,25%), e água mineral (5,0%). Dentre as matérias estranhas encontradas, as mais comuns foram insetos inteiros, larvas de insetos, matéria amorfa, fragmentos de insetos e partículas carbonizada.

Birck et al. (2003a) ao estudarem a qualidade das farinhas comum e especial durante o processamento de moagem, após implantação de programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), concluiu que houve redução no número de fragmentos no decorrer do monitoramento e que essa medida assim como outras relacionadas exigem um controle rígido durante o processo para sua eficácia. Durante a implantação do programa MIPGRÃOS no Moinho Cotriguaçu, foram monitorados a presença de fragmentos de insetos nas farinhas produzidas. Os resultados mostraram que a média de fragmentos de insetos na farinha comum no ano de 1999 foi de 32 fragmentos de insetos; em 2000 19 fragmentos; em 2001, 17 fragmentos; e em 2002 foram 22 fragmentos de insetos. Para a farinha especial a média no ano 1999 foi 42 fragmentos de insetos; em 2000, 13 fragmentos de insetos; em 2001, 17 fragmentos de insetos e em 2002, 13 fragmentos de insetos.

Ao avaliar o nível de contaminação das farinhas comum e especial durante processo de moagem, não foi identificada a presença de ovos de insetos, o que indica que não ocorreu o desenvolvimento do ciclo de vida no processo. Concluiu-se que os resultados da implantação do programa MIPGRÃOS foi positivo, indicando ótimas condições de sanidade no processo de industrialização das farinhas no moinho.

Em trabalhos desenvolvidos no laboratório do Moinho Cotriguaçu, Birck et al. (2003b) (Artigo 3), avaliou-se a qualidade de três lotes de trigo armazenado seco a 13% de umidade (b.s.) e beneficiado (umedecido) com 15% de umidade (b.s.) e seus subprodutos farinha (comum e especial), quanto a presença de matérias estranhas. A contaminação do trigo seco a 13% variou de 2 a 3 insetos inteiros e o beneficiado de 1 a 2 insetos inteiros. As farinhas produzidas desses trigos apresentaram de 10 a 45 fragmentos para a farinha especial e de 6 a 26 para a farinha comum.

## **5.4 Conclusões**

Este trabalho comprovou que os insetos que infestam a massa de trigo armazenado podem ser considerados como vetores mecânicos, porque são contaminados com fungos, os quais são reconhecidamente nocivos a saúde humana e animal por possibilitarem o desenvolvimento de micotoxinas nos grãos e subprodutos. Por esta razão sugere-se que a legislação vigente até 2003, portaria 74 (Brasil, 1994) fosse adequada a atual legislação, RDC 175 (Brasil, 2003), assegurando melhor a qualidade dos alimentos.

Além dos danos diretos causados pelos insetos a sua presença na massa de grãos, cria-se condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos que podem vir a serem contaminantes biológicos.

Os insetos carregam esporos de fungos, assim como outros contaminantes, que ao atacar os grãos podem aumentar o teor de umidade do produto a um nível suficiente para o desenvolvimento de fungos, que estão em processo de latência. É importante salientar que não devemos apenas considerar o problema dos insetos isoladamente e sim em estrita relação com os microrganismos.

## **5.5 Referências Bibliográficas**

AOAC – OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Sujidades, in Hidrólise ácida Method, AOAC Official Method 982.31– 982.32 15ª edição, 1990. **Ministério da Saúde** –Portaria 74 de Agosto de 1994, seção 1.

AOAC – OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Fumonisinias in Corn–Liquid Chromatographic Method, AOAC Official Method 995.15 **Natural Toxins**, v. 2 p. 49-51, 2000.

AOAC – OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2000. Official Method 972.32, Farinha de trigo – Determinação de sujidades leves por hidrólise ácida e flutuação, **Portaria n. 74 SVS/MS de 4 de agosto de 1994**.

ATUI, M. B., LÁZZARI F. A., ZAMBONI, C. Q. Efeito do processamento do milho em grão no nível de matérias estranhas encontradas no grits e fubá. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 57 (1): p. 57-63, 1998.

BESKOW, P.; DECKERS, D. Legislação Brasileira do Armazenamento de Grãos. In: LORINI, I.; MIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (Eds.) **Armazenagem de Grãos**. Campinas: IBG, p. 27-53. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Comissão Técnica para Redução das Perdas na Agropecuária. (Brasil, DF). **Perdas na Agropecuária Brasileira**: relatório preliminar Brasília, v.1, 1993.

BRASIL – **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. D.O.U de 09/07/2003 – Republicada em 10/07/2003.

BIRCK, N. M. M.; LORINI, I.; DE PAULA, M. C. Z.; KOTZ, C. C. Matérias estranhas leves em farinhas de trigo. **Anais...** V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2003a.

BIRCK, N. M. M.; LORINI, I.; SCUSSEL, V. M. Sanitary Conditions And Mycotoxins In Wheat Grains (*Triticum Aestivum*) And Flour (Common And Special) Through Milling Processing. **Anais...** IV Congresso Latinoamericano De Mycotoxicologia. La Habana, Cuba. 2003b.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H.H. Microflora In: CHRISTENSEN, C. M. Storage of cereal grains and their products. St. Paul, Minnesota: **American Association of Cereal Chemists**, p.148-192, 1974.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MATFLEET, C. grain fungi. In: ARORA, D.K.; MUKERGI, K.G.; MARTH, E.H. (Eds.) **Handbook of Applied Micology: foods and feeds**. New York: Marcel Decker, 1991.

LORINI, I. Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. Passo Fundo, **Embrapa Trigo**, 80 p. 2001.

LORINI, I. Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; Scussel, V. M. **Armazenagem de grãos**. p.381-397. 2002.

LORINI, I. Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. **EMBRAPA**. Passo Fundo, RS. 2003. 80p.

MATTOS, E. C.; MAFEZOLI, S.; DAROS, V. dos S. M. G.; SAVIGNADO, L. V. A importância da microscopia alimentar na pesquisa de matérias estranhas em alimentos. Instituto Adolfo Lutz. **Anais...** V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Unicamp. Campinas. 2003.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. Storage of cereal grains and their products. 3<sup>rd</sup> ed., St. Paul, Minnesota, **Ann. Assoc. Cereal Chem.**, p. 145-247, 1982.

SANTOS, M.C.; RODRIGUES, R.M.M.S.; ZAMBONI, C.Q. Matérias estranhas leves e partículas metálicas em misturas para bebida Láctea e mingau destinadas a merenda escolar. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 51 (1/2): p. 07-10, 1991.

SILVA, A. A. L.; FARONI, L. R. D'A. GUEDES, R. N. C., MARTINS, J. H., PIMENTEL, M.A. G. Modelos analíticos para o crescimento populacional de *Rhyzoperta dominica* em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Armazenagem**. Viçosa, MG. V.28, n.2 p.03-10, 2003.

ZAMBONI, C.Q.; ATUI, M.B.; Comparação entre métodos para pesquisa de sujidades e verificação das condições de higiene das massas alimentícias por microscopia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo. n. 49 (1): 11-17, 1989.



## 6 Considerações Finais

Nossos estudos demonstraram uma contaminação por fumonisinas em 70% das amostras de trigo armazenado e farinhas, já para o trigo logo após a colheita e armazenado a contaminação ocorreu em 25,7% das amostras, constatando assim que as micotoxinas não são eliminadas durante o beneficiamento e processamento dos grãos para produção das farinhas.

Estes resultados vêm de encontro com a necessidade de monitoramento constante dos cereais antes da elaboração dos seus subprodutos e derivados. Tendo em vista que o *Fusarium verticillioide* é um agente produtor de fumonisina, e predominantemente encontrado no milho, ou seja, permanecendo muitas vezes nos restos culturais que antecedem a lavoura de trigo, propiciando condições favoráveis a um novo ciclo de contaminação.

Tais achados vêm ressaltar a importância das micotoxinas em grãos de trigo e derivados. Devemos salientar ainda que estudos quanto à contaminação por tricotecenos em trigo da região Oeste do Paraná necessitam ser realizados.

Sugerimos também a avaliação de sementes antes do plantio, e investigações quanto à contaminação do solo após a colheita que antecede ao plantio do trigo. E também uma investigação das pragas de grãos armazenados correlacionando-os a outros contaminantes. E, por fim, uma análise criteriosa da Instrução Normativa nº175, de 2003, referente a avaliação de matérias macro e microscópicas de contaminantes.

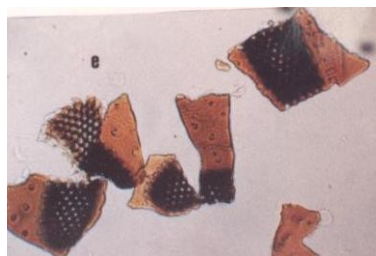
**ANEXOS**

<b>ANEXO 1:</b> Fragmentos de insetos.....	122
Anexo 1a. Fragmentos de <i>Sitophilus spp.</i> , (adulto).....	122
Anexo 1b. Fragmentos de <i>Rhizopertha dominica.</i> , (adulto).....	123
<b>ANEXO 2:</b> Portaria N° 74 SVS/MS de 4 de agosto de 1994.....	124
<b>ANEXO 3:</b> Resolução – RDC N°175, de 08 de julho de 2003.....	126
<b>ANEXO 4:</b> Instrução Normativa N° 7 de 15 de agosto de 2001.....	129
<b>ANEXO 5:</b> Resolução - RDC N°274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002.....	137
<b>ANEXO 6:</b> Certificado de análise silo 13.....	138
<b>ANEXO 7:</b> Certificado de análise silo 5 .....	141
<b>ANEXO 8:</b> Defensivos agrícolas aplicados no período da cultura .....	144
<b>ANEXO 9:</b> Publicação artigo 3 (resumo) .....	146

## ANEXO 1

Anexo 1a. Fragmentos de *Sitophilus* spp., (adulto)

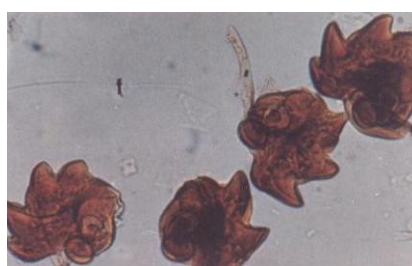
Cabeça



Fragmentos de olhos



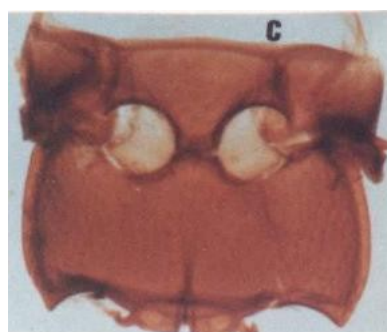
Antena



Mandíbulas



Protórox



Mesosterno

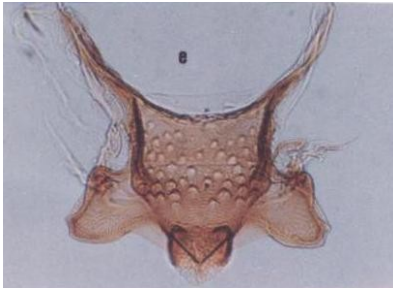


Élito



Área do élitro

Anexo 1b. Fragmentos de *Doizopocatha (admito) ca..*  
(adulto)



Escuto c/ o escutelo



Perna inteira



Fragmentos da coxa



Fragmentos do tarso



Fragmentos do trocanter



Fragmentos da tíbia

## ANEXO 2

### PORTARIA Nº74/MS/SNVS, DE 4 DE AGOSTO DE 1994

O Secretário de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, no uso de suas atribuições, reconhecendo a impossibilidade de serem as exigências da Portaria DINAL/MS nº 01, de 04 de abril de 1986 e considerando que:

- os estudos científicos nacionais e referências internacionais respaldam uma alteração no limite provisório de fragmentos de insetos estabelecido na referida Portaria;

- as dificuldades no controle do processo de produção, transporte e armazenamento que possibilitam o aparecimento desses fragmentos; Resolve:

1- estabelecer o limite máximo de tolerância de 75 (setenta e cinco) fragmentos de insetos, ao nível microscópico, em 50(cinquenta) gramas de farinha de trigo, na média de 3(três) amostras, não sendo tolerada qualquer indicação de infestação viva;

2- estabelecer o limite máximo de tolerância de 225 (duzentos e vinte e cinco) fragmentos de insetos, ao nível microscópico, em 225(duzentos e vinte e cinco) gramas do produto, para os derivados, tais como: massas alimentícias, biscoitos, produtos de panificação e de confeitaria, na média de 3(três) amostras;

3- determinar que na aplicação desta norma seja adotada a metodologia da Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis(A.O.A.C.)-15º edição-1990, na forma do anexo;

4- determinar que os estabelecimentos produtores de alimentos incluídos nesta Portaria apresentam ao órgão estadual de Vigilância Sanitária da unidade federada onde a empresa esteja sediada as propostas de Boas Práticas de produção e/ou Prestação de Serviços, nos termos na Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993, até o prazo máximo de 30 dias, a contar da data de entrada em vigor desta Portaria;

5- estabelecer o prazo máximo de 45 (quarenta e cinco) dias a contar da data de publicação de presente Portaria, para possíveis questionamentos, devidamente fundamentados, visando o aperfeiçoamento da mesma;

6- determinar que as propostas, sugestões e questionamentos, com vistas ao aperfeiçoamento dos textos ora apresentados, sejam recebidas ser formalmente enviada para:

Secretária de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde -Esplanada dos Ministérios - Bloco "G"- 9º andar - CEP-70058-900-Brasília - DF - FAX:(061) 225-6056;

7- outros produtos não incluídos nesta Portaria deverão atender ao limite provisório estabelecido na Portaria nº01 -DINAL/MS, de 04 de abril de 1986, até que novos estudos sejam concluídos;

8- esta Portaria entrará em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

JOÃO GERALDO MARTINELLI

ANEXO

FARINHA DE TRIGO -DETERMINAÇÃO DE SUJIDADES LEVES POR HIDRÓLISE ÁCIDA E FLUTUAÇÃO

Referência: Association OFFICIAL Analytical Chemists - Official Methods of Analysis (A.O.A.C.), item 972.32, 15º edição, 1990

1-APARELHAGEM

a) balança semi-analítica com capacidade para 2000g e resolução de no mínimo 0,1;

b) autoclave com pressão regulada para 121°C;

c) cronômetro com alarme;

d) agitador magnético;

e) chapa de aquecimento;

f) equipamento para filtração a vácuo;

g) microscópico estereoscópico com aumento de 30x;

2- EXECUÇÕES DO ENSAIO

2.1- Materiais e Reagentes.

a) béquero de 2000 ml e 1000 ml;

b) bastão de vidro;

c) proveta de 100 ml e 1000 ml;

d) vidro de relógio;

e) barra magnética;

f) frasco percolador 2000 ml;

g) funil de Buchner;

j) papel de filtro qualitativo;

j) placa de perfil;

k) pisseta (\*);

l) ácido clorídico p.a;

m) álcool etílico comercial;

n) solução de ácido clorídico a 3% (v/v) (3:97) (\*);

o) solução de lauril sulfato de sódio a 5%.

2.2- Procedimento.

2.2.1 - Preparo das Soluções.

2.2.1.1 - Solução de ácido clorídico 3% (v/v).

Ácido clorídico p.a.....30 ml

Água destilada .....970 ml

2.2.2 - Preparação da amostra.

2.2.2.1 - Misturar bem a amostra.

2.2.2.2 - Pesar 50g de amostra em béquero de 2000 ml ou 2500 ml.

2.2.3 - Hidrólise ácida.

2.2.3.1 - Adicional 600 ml de solução de HCl a 3% ao béquero contendo a amostra, misturar e cobrir com vidro de relógio e folha de papel manilha ou equivalente.

2.2.3.2 - Aquecer o b quer com a amostra em autoclave durante 5 min a 121 C.

2.2.3.3 - Transferir imediatamente o cont duo para b quer de 1000 ml, utilizando soluço de HCl a 3%   temperatura ambiente.

2.2.4 - Extra o.

2.2.4.1 - Adicionar 50 ml de óleo mineral ao b quer contendo a amostra.

2.2.4.2 - Agitar durante 5 minutos com barra magnética, sem provocar aera o ou forma o de espuma.

2.2.4.3 - Transferir o cont duo do b quer para o percolador, enxaguando as paredes com água, reservar o b quer.

2.2.4.4 - Deixar o cont duo do percolador em repouso por 30 minutos, agitar cuidadosamente com bastão de vidro por várias vezes nos primeiros 10 minutos.

2.2.4.5 - Drenar até mais ou menos 3 cm da interface.

2.2.4.6 - Enxaguar as paredes do percolador com água destilada quente (55-70 C), completando o volume até cerca de 1700 ml, e deixar em repouso por 2 e 3 minutos.

2.2.4.7 - Repetir o ciclo de lavagem, até que a camada inferior se torne límpida.

2.2.4.8 - Coletar a camada oleosa reservada, enxaguando as paredes do porcelador alternadamente com água quente e álcool etílico.

2.2.4.9 - Se permanecer resíduo em excesso na camada oleosa coletada, adicionar HCl concentrado, suficiente para tornar a soluço cerca de 3% (volume/volume) e levar a ebuli o por cerca de 3 a 4 minutos.

2.2.4.10 - Filtrar a soluço quente sob vácuo, enxaguando o b quer com água, álcool e se necessário com soluço de lauril sulfato de sódio a 5%.

2.2.4.11 - Transferir o papel de filtro para placa de petri e examinar ao microscópio estereoscópio sob aumento de 30x, contendo os fragmentos de insetos detectados.

### 3 - RESULTADOS

Expressar o resultado em número de fragmentos de insetos por 50g de amostra.

MASSAS ALIMENTÍCIAS (MACARRÃO) - DETERMINA O DE SUJIDADES LEVES

Referência: Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis (A.O.A.C), item 969.41. 15  edi o., 1990.

#### 1- APARELHAGEM

a) balança semi-analítica com capacidade para 2000g e resolu o de no mínimo 0,1;

b) autoclave com pressão regulada para atingir 121 C;

c) agitador magnético;

d) chapa de aquecimento;

e) sistema de aquecimento de água destilada;

f) equipamento para filtra o a vácuo;

g) microscópio estereoscópio com aumento de 30X.

#### 2 - EXECU O DO ENSAIO

##### 2.1 - Materiais e Reagentes (\*).

a) b quer de 2000 ml e 1000 ml;

b) bastão de vidro;

c) proveta de 100 ml e 1000 ml;

d) vidro de relógio;

e) barra magnética

f) peneira ASTM/ABNT n 140;

g) recipiente de vidro;

h) frasco armadilha de Wildman de 2000 ml;

i) funil de Hirsch ou Buchner;

j) kitassato;

k) papel de filtro qualitativo;

l) placa de Petri;

m) pisseta (\*);

n)  cido clorídico p.a.;

o) soluço anti-espumante: composto anti-espumante A - DoW Corning dissolvido em acetato de etila, ou anti-espumante equivalente;

p)  lcool etílico;

q) clorofórmio p.a.;

r) soluço de álcool etílico a 60% (v/v) (\*);

s)  leo mineral;

##### 2.2 - Procedimento.

###### 2.2.1 - Preparo das solu es.

###### 2.2.1.1 - Solu o anti-espumante.

Composto anti-espumante-A (Dow Corning) 1g

Acetato de etila 20g

Misturar o composto anti-espumante em acetato de etila e usar o sbrnadante (\*). Guardar em frasco bem fechado.

###### 2.2.2 - Preparo da amostra.

2.2.2.1 - Para espagete, quebrar em pedaços de comprimento tal que não fiquem aderidos ao fundo do b quer.

2.2.2.2 - Pesar 225g de amostra (\*) em b quer de 2000 ml.

###### 2.2.3 - Hidrólise  cida.

2.2.3.1 - Adicionar 1000 ml de soluço de HCl 3% (v/v) (30:970) (\*) e 0,3 ml da soluço anti-espumante ou 0,3 ml de  ter etílico.

ABIA- Associa o Brasileira das Indústrias da Alimenta o.

## ANEXO 3

### RESOLUÇÃO - RDC Nº 175, DE 8 DE JULHO DE 2003

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso de sua atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, art. 111 inciso I, alínea "b", § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 2 de julho de 2003, considerando o disposto no Art. 7º, Capítulo II, da Lei n.º 9.782, de 26 de janeiro de 1999 que trata da competência da ANVISA em estabelecer normas, propor, acompanhar e executar as políticas, as diretrizes e as ações de vigilância sanitária e, estabelecer normas e padrões sobre limites de contaminantes, resíduos tóxicos, desinfetantes, metais pesados e outros que envolvam risco à saúde; considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população; considerando que as matérias-primas destinadas à produção de alimentos devem atender às condições higiênico-sanitárias de forma a garantir que o produto final não ofereça riscos à saúde humana; considerando que qualquer estabelecimento que produza, industrialize, fracione, armazene ou transporte alimentos deve atender às condições higiênico-sanitárias e às Boas Práticas de Fabricação; considerando que a adoção de Boas Práticas de Fabricação é responsabilidade do setor produtivo, cabendo garantir, entre outras a qualidade sanitária das matérias-primas e ou insumos utilizados; considerando que a obtenção de alimento seguro deve abranger toda cadeia produtiva, ou seja, da produção até o consumo; considerando que a análise de matérias macroscópicas e microscópicas presentes nos alimentos deve ser baseada em aspectos relacionados ao risco à saúde; considerando a necessidade de estabelecer disposições gerais para avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados; adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o "Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados".

Art. 2º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades da Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Ficam revogadas as disposições em contrário, em especial, o item Higiene do Anexo I e II da Resolução CNNPA 38 de 21/12/77, o item 5.1 da Resolução Normativa CNNPA nº 13 de 15/07/77, o item 5.1 da Resolução Normativa CNNPA nº 14 de 15/07/77, item 5.1. da Resolução Normativa CNNPA nº 15 de 15/07/77; item 5.1.da Resolução Normativa CTA nº 09 de 11/12/78, os itens referentes a "Características Microscópicas" citadas para as várias categorias da Resolução CNNPA nº 12 de 24/07/1978, o item 5a da Resolução Normativa CTA 05 de 08/10/79, Portaria DINAL/MS n.º 01 de 04/04/1986; Portaria SVS/MS n.º 74 de 04/08/1994, item 6.4 da Portaria SVS/MS nº 519 de 26/06/1998 e item 7.3 da Portaria SVS/MS 377 de 26/04/99.

Art. 4º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

CLÁUDIO MAIEROVITCH PESSANHA HENRIQUES

Diretor-Presidente

## ANEXO

### REGULAMENTO TÉCNICO DE AVALIAÇÃO DE MATÉRIAS MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS PREJUDICIAIS À SAÚDE HUMANA EM ALIMENTOS EMBALADOS

#### 1. ALCANCE

##### 1.1. OBJETIVO.

Estabelecer as disposições gerais para avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados, inclusive bebidas e águas envasadas, relacionadas aos riscos à saúde humana.

##### 1.2. ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O presente Regulamento se aplica aos alimentos embalados, inclusive bebidas e águas envasadas, destinados ao consumo humano.

Excluem-se deste Regulamento Técnico:

- a) as matérias-primas e insumos para fins industriais;
- b) os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia de fabricação.

#### 2. DESCRIÇÃO

##### 2.1. DEFINIÇÃO

Para efeito deste Regulamento considera-se:

2.1.1 Matérias macroscópicas: são aquelas que podem ser detectadas por observação direta (olho nu) sem auxílio de instrumentos ópticos.

2.1.2. Matérias microscópicas: são aquelas que podem ser detectadas com auxílio de instrumentos ópticos.

2.1.3. Vetores mecânicos: são animais que veiculam o agente infeccioso desde o reservatório até o hospedeiro potencial, agindo como transportadores de tais agentes, carreando contaminantes para os alimentos, causando agravos à saúde humana mas não são responsáveis pelo desenvolvimento de qualquer etapa do ciclo de vida do contaminante biológico.

2.1.4. Matéria prejudicial à saúde humana: é aquela matéria detectada macroscopicamente e ou microscopicamente, relacionada ao risco à saúde humana e abrange:

2.1.4.1. insetos, em qualquer fase de desenvolvimento, vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos;

2.1.4.2. outros animais vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos;

2.1.4.3. parasitos;

2.1.4.4. excrementos de insetos e ou de outros animais;



2.1.4.5. objetos rígidos, pontiagudos e ou cortantes, que podem causar lesões no consumidor.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3.1. BRASIL. Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 21 de outubro de 1969, Seção I, Parte I.

3.2. BRASIL. Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977, configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de agosto de 1977, Seção 1.

3.3. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 1428, de 26 de novembro de 1993, regulamenta a Inspeção Sanitária de Alimentos, as Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília 2 de dezembro de 1993.  
Seção 1.

3.4. BRASIL. Portaria SVS/MS n 326, de 30 de julho de 1997, regulamenta as Condições Higiênicas-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial, Brasília, 1 de agosto de 1997.  
Seção I.

3.5. CODEX ALIMENTARIUS. CX/FH 01/14 - Discussion Paper on proposed draft guidelines for evaluating objectionable matter in food. JOINT FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Hygiene, 34<sup>a</sup> Session, Bangkok, Thailand, 8-13 October 2001.

3.6. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. The Food Defect Action Levels - level of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans. US Food and Drug Administration Center For Food Safety and Applied Nutrition. May 1995; revised May 1998.

3.7. ROUQUAYROL, M.Z. Epidemiologia e Saúde, 2<sup>a</sup> Edição, pág 158.

3.8. FORATTINI. O.P. Ecologia, Epidemiologia e Sociedade, pág.306

### 4. DISPOSIÇÕES GERAIS

4.1. A avaliação de matéria macroscópica e microscópica nos alimentos embalados, bebidas ou águas envasadas devem estar relacionada à presença de matéria prejudicial à saúde humana, constantes no item 2.1.4.

4.2. A presença de matéria prejudicial à saúde humana detectada macroscopicamente torna o produto/ lote avaliado impróprio para o consumo humano e dispensa a determinação microscópica.

4.3. Na detecção ou identificação de ingredientes previstos em Regulamento Técnico específico e ingredientes declarados no rótulo devem ser observados os dispositivos do

Regulamento Técnico Específico do alimento embalado, bebida ou águas envasadas e as informações declaradas no rótulo.

4.4. Para atualização deste Regulamento Técnico devem ser apresentados estudos científicos que demonstrem que a matéria é prejudicial à saúde humana.

4.5. Para as análises, deve-se proceder a colheita de amostras dos alimentos em suas embalagens originais íntegras, ou seja, sem quaisquer sinais de violação, perfurações ou outros indícios da não integridade da embalagem.

## 5. CONCLUSÃO DOS RESULTADOS ANALÍTICOS

5.1. Alimentos, bebidas ou águas envasadas que não apresentam matéria prejudicial à saúde humana, macroscópica e microscópica:

"Produto ou Lote DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO VIGENTE NO QUE SE REFERE ÀS MATÉRIAS MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS PREJUDICIAIS À SAÚDE HUMANA"

5.2 Alimentos, bebidas ou águas envasadas que apresentam matéria prejudicial à saúde humana:

"Produto ou Lote IMPRÓPRIO PARA O CONSUMO HUMANO POR APRESENTAR ... (citar a matéria prejudicial à saúde detectada)" .

## 6. MÉTODOS DE ANÁLISE

Para a avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas podem ser utilizadas a observação direta e ou observação com auxílio de instrumentos ópticos, devendo ser utilizados os métodos de análise adotados e/ou recomendados pela Food and Drug Administration (FDA), pela Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), pela International Organization for Standardization (ISO), pelo Instituto Adolfo Lutz e pela Comissão do Codex Alimentarius e seus comitês específicos ou outros métodos validados segundo protocolos adotados por entidades internacionalmente reconhecidas.

Retificação:

Publicado no D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo. Republicada no D.O.U de 10 de julho de 2003.

## ANEXO 4

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E  
DO ABASTECIMENTO**  
**SECRETARIA DE APOIO RURAL E COOPERATIVISMO**  
**INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 7, DE 15 DE AGOSTO DE 2001**

O SECRETÁRIO DE APOIO RURAL E COOPERATIVISMO DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o inciso III, do art. 11, do Decreto nº 3.552, de 28 de junho de 2000, tendo em vista o disposto na Lei nº 9.972, de 25 de maio de 2000, nos arts. 8º e 12 e seus parágrafos do Decreto nº 3.664, de 17 de novembro de 2000,

Considerando a necessidade de disciplinar a classificação do trigo, facilitando e agilizando a comercialização desse produto mediante a uniformização de critérios, procedimentos e o uso de terminologia técnica única, e o que consta do Processo nº 21000.003336/2001-93, resolve:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade do Trigo, contido em anexo à presente Instrução Normativa.

Art. 2º Para o trigo importado, a presente Instrução Normativa será aplicada a partir do dia 01 de janeiro de 2002.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

MANOEL ANTONIO RODRIGUES PALMA

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E DE QUALIDADE DO TRIGO

1. Objetivo: o presente Regulamento tem por objetivo definir as características de identidade e qualidade do trigo.

2. Âmbito de aplicação: este Regulamento Técnico será aplicado para atender a obrigatoriedade de classificação prevista nos incisos I, II e III, do art. 1º, da Lei nº 9.972, de 25 de maio de 2000.

3. Definição do Produto: entende-se por trigo os grãos provenientes das espécies *Triticum aestivum* L. e *Triticum durum* L.

4. Conceitos: para efeito deste Regulamento, considera-se:

4.1. Peso do hectolitro: é a massa de 100 litros de trigo, expressa em quilogramas, determinado em balança para peso específico;

4.2. Umidade: é o percentual de água encontrada na amostra do produto, podendo ser determinado por métodos indiretos, calibrados pelo método de estufa (método 44-15 A da American Association of Cereal Chemists, 1995);

4.3. Isento de substâncias nocivas à saúde: quando a ocorrência se verifica dentro dos limites máximos previstos na legislação específica em vigor;

4.4. Fisiologicamente desenvolvido (maduro): quando o trigo atinge o seu desenvolvimento fisiológico completo, característico da cultivar, e está em condições de ser colhido;

4.5. Grãos avariados: são os grãos que se apresentam danificados pelo calor, danificados por insetos, ardidos, mofados, germinados, esverdeados, chochos, bem como os quebrados (fragmentados) e o triguilho.

4.5.1. Grãos danificados pelo calor (queimados): são os grãos inteiros ou quebrados que apresentam a coloração do endosperma diferente da original, no todo ou em parte, devido à ação de elevada temperatura na secagem.

4.5.2. Grãos ardidos: são os grãos inteiros ou quebrados que apresentam a coloração do endosperma diferente da original, no todo ou em parte, pela ação de processos fermentativos.

4.5.3. Grãos mofados: são os grãos inteiros ou quebrados que apresentam fungos (mofo ou bolor) visíveis a olho nu.

4.5.4. Grãos chochos: são os grãos que se apresentam desprovidos parcial ou totalmente do endosperma, devido ao incompleto desenvolvimento fisiológico e que vazam através da peneira de crivo oblongo de 1,75 mm x 20,00 mm (espessura da chapa: 0,72 mm).

4.5.5. Triguilho: são os grãos que vazam através da peneira de crivo oblongo de 1,75 mm x 20,00 mm (espessura da chapa: 0,72 mm).

4.5.6. Grãos quebrados (fragmentados): são fragmentos de grãos que vazam através da peneira de crivo oblongo de 1,75 mm x 20,00 mm (espessura da chapa: 0,72 mm).

4.5.7. Grãos danificados por insetos: são os grãos ou pedaços de grãos que apresentam danos resultantes da ação de insetos e/ou outras pragas.

- 4.5.8. Grãos germinados: são os grãos que apresentam germinação visível.
- 4.5.8.1. O percentual de grãos germinados será de declaração obrigatória no laudo e no Certificado de Classificação do produto, não sendo, contudo, considerado para efeito de determinação do tipo do trigo.
- 4.5.9. Grãos esverdeados: são os grãos que não atingiram a maturação completa e apresentam coloração esverdeada.
- 4.5.9.1. O percentual de grãos esverdeados será de declaração obrigatória no laudo e no Certificado de Classificação do produto, não sendo, contudo, considerado para efeito de determinação do tipo do trigo.
- 4.6. Matérias estranhas: são todas as partículas não oriundas da planta de trigo, tais como fragmentos vegetais, sementes de outras espécies, pedra, terra, entre outras.
- 4.7. Impurezas: são todas as partículas oriundas da planta de trigo, tais como: cascas, fragmentos do colmo, folhas, entre outras.
- 4.8. Lote: é a quantidade definida de um produto que possui as mesmas características de identidade, qualidade e apresentação.
- 4.9. Embalagem: é o recipiente, pacote ou envoltório, destinado a garantir a conservação, e a facilitar o transporte e o manuseio dos produtos.
- 4.10. Produto embalado: é todo produto que está contido em uma embalagem, pronto para ser oferecido ao consumidor.
- 4.11. Número de Queda (Falling Number): medida indireta da concentração da enzima alfa-amilase, determinada em trigo moído, pelo método 56-81B da American Association of Cereal Chemists (1995), sendo o valor expresso em segundos.
- 4.12. Alveografia: teste que analisa as propriedades de tenacidade (P), de extensibilidade (L) e o trabalho mecânico (W), necessários para expandir a massa, expresso em Joules (J), sendo determinado pelo método 54-30 A da American Association of Cereal Chemists (1995).
- 4.13. Fora de Tipo: refere-se ao produto que não atende, em 1 (um) ou mais aspectos, às especificações ou requisitos de identidade e qualidade estabelecidos neste Regulamento Técnico.
- 4.14. Substâncias nocivas à saúde: refere-se a substâncias de qualquer natureza prejudiciais à saúde, cuja ocorrência não pode ser superior aos limites máximos estabelecidos em legislação específica vigente.
- 4.15. Micotoxina: substância tóxica (metabólito) produzida por fungos, capaz de provocar danos à saúde do homem e dos animais.
5. Classificação: o trigo será classificado em 5(cinco) classes e 3(três) tipos, de acordo com os seguintes critérios:
- 5.1. Classes: o trigo será classificado em 05(cinco) classes: Trigo Brando, Trigo Pão, Trigo Melhorador, Trigo para outros usos e Trigo Durum, definidas em função das determinações analíticas de Alveografia (Força de Glúten) e Número de Queda (Falling Number), conforme a Tabela I deste Regulamento.
- 5.1.1. Será facultado ao interessado a determinação da classe do trigo a que se refere o subitem 5.1, desde que seja possível sua identificação no armazém.
- 5.1.2. A determinação das classes será providenciada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento ou pela Pessoa Jurídica responsável pela classificação, sendo, neste caso, obrigatório informar o resultado no laudo e Certificado de Classificação do Produto.
- 5.1.3. O ressarcimento das análises a que o subitem 5.1 faz menção ocorrerá por conta do interessado.
- 5.2. Tipos: O trigo será classificado em 03 (três) tipos, expressos por números de 01(um) a 03(três) e definidos em função do limite mínimo do peso do hectolitro e dos limites máximos dos percentuais de umidade, de matérias estranhas e impurezas e de grãos avariados, conforme a Tabela II, deste Regulamento.
- 5.3. Umidade, matérias estranhas e impurezas
- 5.3.1. O teor máximo de umidade, tecnicamente recomendável para conservação e empacotamento do trigo, será de 13% (treze por cento).
- 5.3.2. Os limites máximos de matérias estranhas e impurezas admitidos para o produto estão estabelecidos na Tabela II deste Regulamento.
- 5.4. Fora de tipo
- 5.4.1. Será classificado como Fora de Tipo o trigo que não atender os percentuais de umidade, matérias estranhas e impureza, de grãos avariados, bem como o valor do peso hectolítrico, estabelecidos para o Tipo 3, constantes da Tabela II deste Regulamento.
- 5.4.2. O trigo classificado como Fora de Tipo não poderá ser comercializado e nem internalizado como se apresenta, devendo ser rebeneficiado, visando ao reenquadramento em tipo.
- 5.4.3. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento poderá, excepcionalmente, autorizar a utilização de trigo fora das especificações estabelecidas neste Regulamento, devendo disciplinar também os critérios e procedimentos a serem adotados para o produto nessas condições.

5.4.3.1. Caberá ainda, às partes interessadas ou envolvidas, as responsabilidades quanto ao manuseio, uso apropriado e demais cuidados necessários à conservação da qualidade do produto nessas condições.

5.4.3.2. No caso específico de que trata o item 5.4.3, as informações de identidade e qualidade, bem como as demais declarações sobre o produto classificado como Fora de Tipo, deverão atender às disposições específicas, referentes a sua marcação ou rotulagem, estabelecidas nos itens 7.6.7, 7.7.7 e seus subitens, deste Regulamento.

5.5. Insetos vivos e sementes tóxicas

5.5.1. Será exigida, previamente à classificação, o expurgo e/ou beneficiamento do produto que apresentar insetos vivos ou sementes tóxicas prejudiciais a sua utilização normal.

5.6. Desclassificação

5.6.1. Será desclassificado o trigo que apresentar uma ou mais das características indicadas abaixo, sendo proibida a sua comercialização para a alimentação humana. São elas:

5.6.1.1. Aspecto generalizado de mofo ou fermentação;

5.6.1.2. Resíduos de produtos fitossanitários, teor de micotoxinas, de outros contaminantes ou substâncias nocivas à saúde acima do limite estabelecido, por legislação específica vigente;

5.6.1.3. Mau estado de conservação;

5.6.1.4. Acentuado odor estranho de qualquer natureza, impróprio ao produto;

5.6.1.5. Presença de insetos vivos no produto destinado diretamente à alimentação humana.

5.6.2. Sempre que julgar necessário, o Ministério da Agricultura e do Abastecimento ou a Pessoa Jurídica responsável pela Classificação poderá requerer análise laboratorial prévia do produto suspeito de contaminação, visando a se certificar de sua impropriedade para consumo humano.

5.6.3. As análises laboratoriais serão realizadas por laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, com o respectivo ônus para o detentor do produto.

5.6.4. A pessoa jurídica responsável pela classificação deverá comunicar imediatamente ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento a ocorrência de produto desclassificado, para as providências cabíveis junto ao setor técnico competente.

5.6.5. Caberá ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento a decisão quanto ao destino do produto desclassificado, podendo, para isso, articular-se, onde couber, com outros órgãos oficiais.

5.6.5.1. No caso específico da permissão ou autorização de utilização do produto desclassificado para outros fins, o Ministério da Agricultura e do Abastecimento deverá estabelecer, ainda, todos os procedimentos necessários ao acompanhamento do produto até a sua completa desnaturação ou destruição, cabendo ao proprietário do produto ou ao seu preposto, além de arcar com os custos pertinentes à operação, ser o seu depositário e responsável pela inviolabilidade e indivisibilidade do lote, em todas as fases de manipulação, imputando-lhe as ações civis e penais cabíveis em caso de irregularidades ou de uso não-autorizado do produto nestas condições.

5.7. Substâncias nocivas à saúde

5.7.1. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento poderá, sempre que julgar necessário, em ação de caráter temporário ou por tempo indeterminado, exigir a análise de micotoxinas, resíduos e outros contaminantes do trigo, independentemente do resultado de sua classificação.

5.7.2. O ressarcimento dos custos das análises, a que se refere o item 5.7.1, correrá por conta do interessado.

5.7.3. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento, juntamente com outros órgãos oficiais, as pessoas jurídicas responsáveis pela classificação, instituições de pesquisa, redes de laboratórios credenciados e em parceria com o setor privado, poderá desenvolver programas específicos de monitoramento de micotoxinas, resíduos e outros contaminantes do trigo, visando ao controle e à garantia de sua qualidade para a alimentação humana.

6. Embalagem

6.1. As embalagens utilizadas no acondicionamento do trigo podem ser de material natural, sintético ou outros materiais adequados.

6.2. Dentro de um mesmo lote, é obrigatório que todas as embalagens sejam do mesmo material e tenham idênticas capacidades de acondicionamento.

6.3. As especificações quanto à confecção e à capacidade permanecem de acordo com legislação vigente.

7. Rotulagem e marcação

7.1. As especificações de qualidade do produto, contidas na marcação ou rotulagem, e na identificação do lote, deverão estar em consonância com o seu respectivo Certificado de Classificação.

7.2. Todo lote ou embalagem deve trazer as especificações qualitativas, marcadas ou rotuladas, na vista principal, em lugar de destaque, de fácil visualização e de difícil remoção.

7.3. Os rótulos dos produtos embalados não deverão apresentar vocábulos, símbolos, emblemas, ilustrações ou outras representações gráficas que possam induzir o consumidor a equívoco, erro, confusão ou causar qualquer prejuízo à sua qualidade.

7.4. No nível de atacado, para o produto ensacado ou a granel (neste caso desde que não haja mistura do lote ou carga com outros produtos a granel, de diferentes qualidades ou origem), a marcação do lote deve trazer, no mínimo, as seguintes indicações:

7.4.1. Identificação do lote;

7.4.2. Classe (quando houver a sua determinação);

7.4.3. Tipo;

7.4.4. Safra de produção, de acordo com a declaração do responsável pelo produto;

7.4.5. Identificação do responsável pelo produto (nome ou razão social e endereço completo);

7.4.6. Peso líquido;

7.4.7. Informações específicas sobre a condição qualitativa, manuseio, estocagem, prazo de armazenagem ou uso apropriado para o produto classificado como Fora de Tipo, a serem fornecidas pelo seu responsável, no caso previsto no item 5.4.3 deste Regulamento.

7.5. No nível de varejo (trigo embalado), a marcação ou rotulagem das especificações de qualidade será feita na posição horizontal em relação à borda superior ou inferior da embalagem, a qual deverá conter, no mínimo, as seguintes indicações, no idioma oficial do país de consumo:

7.5.1. Denominação de venda do produto;

7.5.2. Número do lote;

7.5.3. Identificação da origem (deverá ser indicado o nome ou a razão social, o endereço completo e o CNPJ do produtor ou embalador, conforme o caso, assim como a localidade, o Estado e o País de origem, quando for o caso);

7.5.4. Data de validade;

7.5.5. Peso líquido;

7.5.6. Tipo;

7.5.7. Informações específicas sobre a condição qualitativa, manuseio, uso, estocagem ou consumo para o produto classificado como Fora de Tipo (fornecidas pelo responsável do produto), no caso previsto no item 5.4.3, deste Regulamento.

7.5.7.1. No caso específico do trigo Fora de Tipo por excesso de umidade superior a 13% (treze por cento), deverá ser informado claramente o percentual de umidade encontrado no produto, juntamente com o seu correspondente prazo de validade para consumo, bem como as restrições para conservação e manuseio.

7.5.7.2. As informações relativas ao prazo de validade e restrições para o produto com excesso de umidade serão fornecidas pelo seu responsável.

7.6. Em todo rótulo deverá ser impresso, gravado ou marcado de qualquer outro modo, uma indicação em código ou linguagem clara, que permita identificar o lote a que pertence o alimento.

7.7. A indicação a que se refere o item 7.8 deverá figurar de forma visível, legível e indelével.

7.8. O lote será determinado, em cada caso, pelo produtor, fabricante ou embalador do produto, quando for necessário, segundo seus critérios.

7.9. Para indicação do lote poderá ser utilizado:

7.9.1. Um código-chave precedido da letra "L", que deverá constar da documentação comercial, quando ocorrer comércio nacional e internacional;

7.9.2. A data de fabricação ou de validade mínima, sempre que seja(m) indicado(s) claramente, pelo menos, o dia e o mês, nesta ordem.

7.10. As expressões qualitativas referentes à denominação do produto e da classe devem ser grafadas por extenso e o indicativo do tipo em algarismo arábico.

7.11. Os indicativos de Classe e Tipo devem ser grafados em caracteres do mesmo tamanho, segundo as dimensões especificadas para o peso líquido, em legislação metrológica vigente.

7.12. No caso específico da comercialização feita a granel ou em conchas, o produto exposto diretamente ao consumidor deverá ser identificado e a identificação colocada em lugar de destaque, de fácil visualização, contendo, no mínimo, as seguintes indicações:

7.12.1. Denominação de venda do produto;

7.12.2. Classe, quando for classe misturado, sendo facultativa para as demais classes;

7.12.3. Tipo;

7.12.4. Identificação da origem (deverá ser indicado o nome ou a razão social, o endereço completo e o CNPJ do fabricante, produtor ou embalador, conforme o caso, assim como a localidade, o Estado e o país de origem, quando for necessário);

7.12.5. No caso do produto classificado como Fora de Tipo ao nível do consumidor, observar os mesmos procedimentos previsto no item 7.7.7 e seus subitens, deste Regulamento.

#### → 8. Amostragem

8.1. Previamente à amostragem, deverão ser observadas as condições gerais do lote do produto e, em caso de verificação de qualquer anormalidade, tais como: presença de insetos vivos ou a existência de quaisquer das características desclassificantes (odor estranho, mau estado de conservação, aspecto generalizado de mofo, entre outras), adotar os procedimentos específicos previstos neste Regulamento.




8.1. A retirada ou extração de amostras em lotes de trigo, ensacado ou a granel, obedecerá aos critérios estabelecidos pela NBR 5425/85, da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT e suas normas complementares, as NBR 5426/85 e 5427/85, e será efetuada do seguinte modo:

8.1.1. Trigo ensacado: por furação ou calagem, sendo os sacos tomados inteiramente ao acaso, mas sempre representando a expressão média do lote, numa quantidade mínima de 30g (trinta gramas) de cada saco, observando-se o plano de amostragem abaixo:

Tamanho do lote em sacos	Nº mínimo de sacos a serem amostrados
2 a 25	2
26 a 50	3
51 a 90	5
91 a 150	8
151 a 280	13
281 a 500	20
501 a 1200	32
1201 a 3200	50
3201 a 10000	80
10001 a 35000	125
35001 a 150000	200
150001 a 500000	315
500001 ou mais	500

8.1.2. Trigo a granel:

8.1.2.1. em veículos: com uso de amostrador apropriado, coletar amostras parciais em diferentes pontos e profundidades da carga, distribuídos de modo equidistantes; observando-se os seguintes critérios:

Carga do produto (toneladas)	No. mínimo de pontos a serem amostrados	Distribuição dos pontos de amostragem
Até 15	5	
Mais de 15	8	
Mais de 30	11	

8.1.2.2. em silos ou armazéns: a coleta será feita com o uso de sonda ou caladores apropriados, ou através dos sistemas de descarga, observando-se os seguintes critérios:

TAMANHO DO LOTE	Nº MÍNIMOS DE COLETAS
Até 10 toneladas	20
Mais de 10 até 50 toneladas	22
Mais de 50 até 100 toneladas	23
Mais de 100 toneladas	25

8.1.2.3. grãos em movimento (carga, descarga ou transilagem): a coleta de amostra será feita em intervalos regulares de tempo, calculados em função do volume da carga e da duração da operação, introduzindo-se o amostrador em distintos setores do fluxo do grão, observando-se os mesmos critérios previstos neste Regulamento;

8.1.2.4. em navios e similares: serão adotados os mesmos critérios e procedimentos de amostragem, previstos neste Regulamento, para o produto a granel ou ensacado, conforme o caso, até que o Ministério da Agricultura e do Abastecimento, através de seu órgão competente, decida em contrário.

8.1.3. Trigo embalado (empacotado): considerando-se que o produto empacotado apresenta-se homogêneo quanto à sua qualidade, quantidade, apresentação e identificação (mesmo número do lote), será retirado, para fins de amostragem, um número de pacotes suficiente para compor, no mínimo, 03 (três) amostras, com peso de 1 kg (um quilograma) cada.

8.2. Quando a amostra for coletada e enviada pelo interessado, deverão ser observados os mesmos critérios e procedimentos de amostragem previstos neste Regulamento, visando a garantir a identificação da mesma com o lote ou volume da qual se originou, sendo o coletor o responsável legal pela sua representatividade.

8.3. As amostras assim extraídas serão homogeneizadas, reduzidas e acondicionadas em 3 (três) alíquotas, com peso de 1kg (um quilograma) cada, devidamente identificadas, lacradas e autenticadas.

8.4. Uma amostra será entregue ao interessado, e as outras duas (amostra de trabalho/revisão e de contraprova) ficarão com a pessoa jurídica responsável pela classificação e o restante da amostra será obrigatoriamente recolocado no lote ou devolvido ao proprietário.

8.5. Para efeito de classificação, a amostra de trabalho será de 250 (duzentos e cinquenta) gramas.

8.6. O trigo, quando for destinado para indústria, terá como facultativa sua determinação de classe, devendo, neste caso, retirar também 2 (duas) amostras de 2 (dois) quilogramas cada, sendo que uma delas será utilizada para a análise e a outra permanecerá como contraprova.

#### 9. Certificado de Classificação

9.1. O Certificado de Classificação será emitido pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento ou pelas pessoas jurídicas devidamente credenciadas pelo mesmo, de acordo com a legislação vigente.

9.2. O Certificado de Classificação é o documento hábil para comprovar a realização da classificação, correspondendo a um determinado lote do produto classificado.

9.3. O Certificado somente será considerado válido quando possuir a identificação do classificador (carimbo e assinatura), pessoa física devidamente habilitada e registrada no Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

9.4. A sua validade será de 45 (quarenta e cinco) dias, contados a partir de sua emissão.

9.4.1. A validade a que se refere o item anterior se aplica à validação do serviço de classificação, ou seja, ao prazo em que se pode questionar administrativamente o resultado apresentado (laudo e Certificado emitidos) e será averiguada com base na amostra de arquivo (contraprova) ou, se necessário, com uma nova amostra do produto, caso o lote em questão se mantenha inalterado nos aspectos qualitativo e quantitativo.

9.5. Do Certificado de Classificação deverão constar, além das informações estabelecidas no Regulamento Técnico específico, as seguintes indicações:

9.5.1. Discriminação dos resultados de cada análise efetuada e dos percentuais encontrados para cada determinação de qualidade do trigo, estabelecidos neste Regulamento, bem como as informações conclusivas (enquadramento em classe e tipo), que serão transcritos do seu respectivo laudo de classificação;

9.5.2. Os motivos que determinaram a desclassificação do produto;

9.5.3. Os valores de tenacidade (P) e extensibilidade (L) e do trabalho mecânico (W), quando a determinação de classe for solicitada pelo interessado;

9.5.4. O percentual de grãos germinados e de grãos esverdeados encontrados no produto, como informação qualitativa obrigatória, estabelecida no item 3.5.8.1 deste Regulamento;

9.5.5. O valor do peso hectolítrico, o percentual de umidade, o de impurezas e matérias estranhas encontrados no produto.

#### 10. Armazenamento e meios de transporte:

10.1. Os armazéns e os meios de transporte devem oferecer plena segurança e condições técnicas, imprescindíveis à perfeita conservação do trigo.

#### 11. Fraude

11.1. Será considerada fraude toda alteração dolosa de qualquer ordem ou natureza, praticada na classificação, na embalagem, no transporte, no armazenamento, bem como nos documentos de qualidade do produto.

11.2. É também considerada fraude a comercialização do trigo em desacordo com o estabelecido neste Regulamento.

#### 12. Tabelas

TABELA I

CLASSES	VALOR MÍNIMO DA FORÇA DO GLUTEN (10 - 4 J)	VALOR MÍNIMO DO NÚMERO DE QUEDA (segundos)
Trigo Brando	50	200
Trigo Pão	180	200
Trigo Melhorador	300	250



Trigo para outros usos	Qualquer	< 200
Trigo Durum	-	250

TABELA II

	Tipos	Peso mínimo do Hectolitro (kg/hl)	Umidade (% máximo)	Matérias Estranhas e Impurezas (% máximo)	Grãos avariados (% máximo)	
					Danificados por insetos	Danificados pelo Calor, Mofados e Ardidos.
1	78	13	1,00	0,50	0,50	1,50
2	75	13	1,50	1,00	1,00	2,50
3	70	13	2,00	1,50	2,00	5,00

### 13. Roteiro de classificação do trigo

13.1. Coletar a amostra conforme os critérios definidos no item 8 do presente Regulamento.

13.2. Observar na amostra a ocorrência de fatores que possam ocasionar a desclassificação do lote, tais como odor estranho, mau estado de conservação, insetos vivos, etc.

13.2.1. Caso a amostra apresente características desclassificantes, proceder conforme o item 4 do presente Regulamento.

13.3. Homogeneizar a amostra média (1 Kg) destinada à classificação.

13.3.1. Todas as determinações qualitativas serão efetuadas com base nesta amostra, com exceção da classe do produto, que obedecerá aos procedimentos previstos no subitem 12.5.1. deste roteiro.

13.4. Aferir a balança.

#### 13.5. Classificação

13.5.1. Determinação da Classe (Alveografia e Número de Queda): quando solicitado pelo interessado, será coletada amostra do produto conforme os procedimentos previstos no subitem 12.5.2., bem como no item da amostragem deste Regulamento, observando especialmente o que estabelece o subitem 8.1.8. (tamanho da amostra para determinação da classe).

13.5.2. A amostra assim coletada será enviada ao laboratório credenciado e, após o resultado das análises, será feito o enquadramento em classe, conforme Tabela I do presente Regulamento.

13.5.3. Anotar no laudo os valores referentes ao W, L e P, informando-os também no Certificado de Classificação do produto.

13.6. Determinação da umidade: a umidade será determinada com a amostra em seu estado natural (sem limpeza), anotando no laudo o valor encontrado.

13.7. Determinação do peso do hectolitro: proceder conforme a seqüência abaixo:

13.7.1. Utilizar a balança para peso específico;

13.7.2. Colocar o TUBO MEDIDA na base dos tubos;

13.7.3. Colocar a NAVALHA no orifício do TUBO MEDIDA;

13.7.4. Colocar o PESO PADRÃO DE QUEDA sobre a NAVALHA no TUBO MEDIDA;

13.7.5. Acoplar o TUBO RECEBEDOR ao TUBO MEDIDA;

13.7.6. Acoplar o REGULADOR DE FLUXO ao TUBO RECEBEDOR;

13.7.7. Colocar o produto (amostra de trigo em seu estado original - sem limpar) diretamente no REGULADOR DE FLUXO;

13.7.8. Abrir o REGULADOR DE FLUXO permitindo a passagem do produto(trigo) ao TUBO RECEBEDOR;

13.7.9. Retirar a NAVALHA de um só movimento, deixando passar o PESO PADRÃO DE QUEDA e o produto(trigo) para o TUBO MEDIDA;

13.7.10. Repor a NAVALHA novamente no TUBO MEDIDA, forçando sua passagem através dos grãos;

13.7.11. Retirar o conjunto de TUBOS da base, retirando o produto que sobrou acima da NAVALHA. Esta operação deve ser feita cuidadosamente, não permitindo a retirada da NAVALHA e nem o desencaixe dos TUBOS;

13.7.12. Separar o TUBO RECEBEDOR do TUBO MEDIDA;

13.7.13. Retirar a NAVALHA do TUBO MEDIDA, mantendo-o na posição vertical;

13.7.14. Pendurar o TUBO MEDIDA no braço da balança;

13.7.15. Utilizando-se do conjunto de pesos que acompanham a balança, proceder à pesagem do produto (trigo).

- 13.7.16. A sistemática descrita nos itens 13.7.14 e 13.7.15 poderá ser substituída pela pesagem em balança eletrônica.
- 13.7.17. Fazer a conversão utilizando a tabela específica (gramas para pH) e, em seguida, anotar o valor encontrado no laudo.
- 13.8. Separação dos defeitos: pesar exatamente 250g (amostra de trabalho) para proceder à separação dos defeitos.
- 13.8.1. Passar a amostra na peneira 1,75mm x 20,00mm e o que vazarem, com exceção das impurezas e matérias estranhas, serão considerados como chocho, trigulho e quebrados; em seguida, pesar separadamente e anotar no laudo os valores encontrados.
- 13.8.1.1. As impurezas e matérias estranhas que vazarem da peneira deverão ser juntadas àquelas que ficarem retidas; em seguida, pesar e anotar no laudo o valor encontrado.
- 13.8.1.2. Os insetos mortos encontrados na amostra serão considerados como matérias estranhas.
- 13.8.1.3. Os grãos chochos, quebrados e trigulho (sem outro dano) que ficaram retidos na peneira não serão considerados como defeitos.
- 13.8.2. Proceder à separação dos grãos danificados por insetos, danificados pelo calor, ardidos, mofados, germinados e esverdeados; em seguida, pesar separadamente cada defeito e anotar no laudo os valores encontrados.
- 13.8.2.1. O percentual encontrado de grãos germinados e de grãos esverdeados será de informação obrigatória no laudo e no Certificado de Classificação, mas não será considerado para efeito de enquadramento em tipo do trigo.
- 13.8.2.2. Quando houver a presença de 2 (dois) ou mais defeitos sobre o mesmo grão, prevalecerá para seu enquadramento o de maior gravidade, observando-se o seguinte critério decrescente de gravidade: mofado, ardido, grãos danificados pelo calor, grãos danificados por insetos, chochos, trigulho e quebrados.
- 13.8.2.3. Os valores obtidos deverão ser convertidos em porcentagem (multiplicar o peso pelo índice 0,4).
- 13.8.2.4. Efetuar o enquadramento em tipo, conforme os limites para os defeitos estabelecidos na Tabela II do presente Regulamento.
- 13.8.2.5. O tipo inferior encontrado definirá o tipo final do produto.
- 13.8.2.6. O trigo que ultrapassar os limites estabelecidos para o tipo 3 será enquadrado conforme prevê o item 4.2.1. do presente Regulamento.
- 13.8.2.7. Revisar o preenchimento do laudo, datar e assinar.
- 13.9. Preencher cuidadosamente o Certificado da Classificação do produto, observando:
- 13.9.1. Validade de 45 (quarenta e cinco) dias, contados a partir da data de sua emissão;
- 13.9.2. Além das informações padronizadas, deverão constar, conforme o caso:
- 13.9.2.1. Valores de W, L e P, quando a determinação da classe for solicitada pelo interessado;
- 13.9.2.2. Motivos que determinaram a desclassificação do produto;
- 13.9.2.3. Os percentuais de grãos germinados, esverdeados, bem como os percentuais de umidade, matérias estranhas, impurezas e o valor do peso hectolítrico encontrados no produto;
- 13.9.3.4. Revisar, datar e assinar o Certificado de Classificação.
14. Disposições gerais
- 14.1. Este Regulamento Técnico será também aplicável quanto à classificação dos produtos orgânicos e dos transgênicos, desde que os mesmos tenham cumprido previamente os trâmites necessários a sua identificação ou certificação, atestando-os como tal e, ainda, tenham atendido as disposições específicas vigentes.
- 14.2. É de competência exclusiva do Órgão Técnico do Ministério da Agricultura e do Abastecimento resolver os casos omissos, porventura surgidos na utilização do presente Regulamento.

## ANEXO 5



## LEGISLAÇÃO SOBRE MICOTOXINAS

[www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)

## BRASIL

Alimentos para consumo humano

Ministério da Saúde: Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002:

Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado) pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim):

Aflatoxinas B1+B2+G1+G2 = 20 µg/kg (ppb)

Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, fariinhas e sêmolas):

Aflatoxinas B1+B2+G1+G2 = 20 µg/kg (ppb)

Leite líquido: Aflatoxina M1 = 0,5 µg/L (ppb)

Leite em pó: Aflatoxina M1 = 5,0 µg/L (ppb)

Ministério da Agricultura. Portaria MAARA No.183 de 21 de março de 1996, publicada no Diário Oficial da União de 25 de março de 1996, Seção I, página 4929:

Aflatoxinas B1+B2+G1+G2 = 20 µg/kg µg/kg

OBS. Esta Portaria internalizou as normas do MERCOSUL GMC/RES. No. 56/94

Alimentos para consumo animal: matérias primas e rações

Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968, 1988:

Para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal:

Aflatoxinas (máximo) = 50 µg/kg

OBS.: O MA não especifica quais metabólitos mas, depreende-se (**dedução minha**) que seja a somatória de B1+B2+G1+G2. O limite é valido para toda e qualquer produto, seja para alimentação direta ou como ingrediente para rações.

**A Portaria citada especifica quais os produtos nela enquadrados.**

MERCOSUL

CLF  
Central Laboratories Friedrichsdorf

## ANEXO 6

From: Peter Vögler

10.05.2004

**Analytical Report R04-05070CON1**

**WHEAT (GRAIN) (english)**

**WHEAT (GRAIN) (original)**

**Sample Information:**

Samples for Technical Assistance (TAS), Contaminants (CON)

CLF sample code	: 04-05070	date analysis order	: 06.04.2004
client sample code	: 13 SILO	date sample receipt	: 26.04.2004
local article no.	: 105		
Nutraco article no.	:		
concern article no.	:		
end product class	:		
raw material class	: cereals / cereals based		
batch	: 13 silo	production date	:
supplier:	:	expiry date	:
consistence	: solid/ dry	delivery date	:
sample amount	: 670g		
packaging	:		
sample preparation	:		
remarks	: Production Date : Saeson 2003 Supplier: Moinho Cotrigucu		
background for TAS	:		

**Remark:** The results relate exclusive to the above mentioned sample. Without permission of the CLF GmbH it is not allowed to give this report, results or parts of it to a person not belonging to NUMICO.

**CLF**  
Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH  
Residues Divison  
\*\* Bahnstraße 14-30 \* D-61381 Friedrichsdorf \* Germany \*\*  
\*\* Phone ++49 (0) 6172 / 99-1897 ++49 (0) 6172 / 99-1067 \*\*

  
 DAIER  
 DAIER 11, 3404,00 15 01 01  
 Anrechnung Pflanzenschutzmittel  
 Anrechnung Pflanzenschutzmittel  
 Anrechnung Pflanzenschutzmittel  
 Anrechnung Pflanzenschutzmittel

CLF GmbH

**Results****Pesticide residue analysis according to multi method S19**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Pirimiphos-methyl	6	µg/kg	*	µg/kg
Other Pesticide residues	< LOQ	µg/kg	*	µg/kg

method:

DFG Multi Residue Method S19

\*) pesticides covered routinely by CLF with quantitation limits; see list at your disposal  
results below 5 µg/kg are reported as "< LOQ"**Piperonylbutoxide**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Piperonyl butoxide	5	µg/kg	*	µg/kg

method:

DFG Multi Residue Method S19 (GC/MS)

\*) pesticides covered routinely by CLF with quantitation limits; see list at your disposal  
results below 5 µg/kg are reported as "< LOQ"**Aflatoxins B1, B2, G1 and G2**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Aflatoxin B1	n.d.	ng/kg	30	ng/kg
Aflatoxin B2	n.d.	ng/kg	20	ng/kg
Aflatoxin G1	n.d.	ng/kg	30	ng/kg
Aflatoxin G2	n.d.	ng/kg	30	ng/kg
Sum of aflatoxins B1,B2,G1,G2	n.d.	ng/kg		ng/kg

method:

clean-up by by immunoaffinity chromatography; determination by HPLC with fluorescence detection and post-column derivatisation (Kobra-cell)

Werner, Agribiological Research 44 (1991), p. 289-298

**Ochratoxin A**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Ochratoxin A	n.d.	µg/kg	0,1	µg/kg

method:

clean-up by immunoaffinity chromatography; determination by HPLC with fluorescence detection.  
Official methods according to §351 MFG, Method 1 15.00, modified**Deoxynivalenol (DON)**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Deoxynivalenol	n.d.	µg/kg	30	µg/kg

method:

Sample extraction with acetonitrile / water. First cleanup step by solid phase extraction; second cleanup step by immunoaffinity column; determination by HPLC with diode array detection (DAD).

According to: Trucksess Et. Al.: Journal of AOAC International Vol. 79, No. 4, p. 883-887, 1996: Determination and Survey of Deoxynivalenol in White flour, Whole wheat flour and Bran (modified cleanup).

## CLF GmbH

## Zearalenone

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Zearalenone	n.d.	µg/kg	1	µg/kg

method;

Clean-up by immunoaffinity chromatography; determination by HPLC with fluorescence detection.  
Easi-Extract Zearalenone: Application of immunoaffinity columns for sample clean-up prior detection of Zearalenone using HPLC analysis; Instructions for use; Rhône-Diagnostics Technologies Ltd., Glasgow.

## Fumonisin, external analysis

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Fumonisin B1	< LOQ	µg/kg	12	µg/kg
Fumonisin B2	< LOQ	µg/kg	12	µg/kg

method;

(external analytical report available on demand)

LOQ : Quantitation limit; up from this level quantitative results are available

n.d. : not detectable

n.a. : not analysed

## Remarks:

Peter Vögler  
Manager Residues Department - CLF GmbH

## ANEXO 7

CLF  
 Central Laboratories Friedrichsdorf

From: Peter Vögler

10.05.2004

Analytical Report R04-05069CON1

WHEAT (GRAIN) (english)

WHEAT (GRAIN) (original)

**Sample Information:**

Samples for Technical Assistance (TAS), Contaminants (CON)

CLF sample code	: 04-05069	date analysis order	: 06.04.2004
client sample code	: 5 SILO	date sample receipt	: 26.04.2004
local article no.	: 105		
Nutraco article no.	:		
concern article no.	:		
end product class	:		
raw material class	: cereals / cereals based		
batch	: 5 silo	production date	:
supplier	:	expiry date	:
consistence	: solid/ dry	delivery date	:
sample amount	: 610g		
packaging	:		
sample preparation	:		
remarks	: Production Date: Season 2003 Supplier Moinho Cotriguacu		
background for TAS	:		

**Remark:** The results relate exclusive to the above mentioned sample. Without permission of the CLF GmbH it is not allowed to give this report, results or parts of it to a person not belonging to NUMICO.

CLF  
 Central Laboratories Friedrichsdorf GmbH  
 Residues Division  
 \*\* Bahnstraße 14-30 \* D-61381 Friedrichsdorf \* Germany \*\*  
 \*\* Phone ++ 49 (0) 6172 / 99-1887 ++ 49 (0) 6172 / 99-1967 \*\*

  
 GAPI PL 3404.00 15.01.03  
Accounting File #3404.00.15.01.03  
 generated automatically by the GAPI  
 Client/Server Application Management System  
 Copyright © 2003

CLF GmbH

**Results****Pesticide residue analysis according to multi method S19**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Pirimiphos-methyl	145	µg/kg	*	µg/kg
Other Pesticide residues	< LOQ	µg/kg	*	µg/kg

method:

DFG Multi Residue Method S19

\*) pesticides covered routinely by CLF with quantitation limits: see list at your disposal  
results below 5 µg/kg are reported as "< LOQ"**Piperonylbutoxide**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Piperonyl butoxide	< LOQ	µg/kg	*	µg/kg

method:

DFG Multi Residue Method S19 (GC/MS)

\*) pesticides covered routinely by CLF with quantitation limits: see list at your disposal  
results below 5 µg/kg are reported as "< LOQ"**Aflatoxins B1, B2, G1 and G2**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Aflatoxin B1	n.d.	ng/kg	30	ng/kg
Aflatoxin B2	n.d.	ng/kg	20	ng/kg
Aflatoxin G1	n.d.	ng/kg	30	ng/kg
Aflatoxin G2	n.d.	ng/kg	30	ng/kg
Sum of aflatoxins B1,B2,G1,G2	n.d.	ng/kg		ng/kg

method:

clean-up by by immunoaffinity chromatography; determination by HPLC with fluorescence detection and post-column derivatisation (Kobra-cell)

Werner, Agribiological Research 44 (1991), p. 289-298

**Ochratoxin A**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Ochratoxin A	n.d.	µg/kg	0,1	µg/kg

method:clean-up by immunoaffinity chromatography; determination by HPLC with fluorescence detection.  
Official methods according to §35 LMBG. Method L. 15.00, modified**Deoxynivalenol (DON)**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Deoxynivalenol	93	µg/kg	30	µg/kg

method:

Sample extraction with acetonitrile / water. First cleanup step by solid phase extraction; second cleanup step by immunoaffinity column; determination by HPLC with diode array detection (DAO).

According to: Trucksess EI. Al.: Journal of AOAC International Vol. 79, No. 4, p. 883-887, 1996: Determination and Survey of Deoxynivalenol in White flour, Whole wheat flour and Bran (modified cleanup).



CLF GmbH

**Zearalenone**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Zearalenone	< LOQ	µg/kg	1	µg/kg

method:

Clean-up by Immunoaffinity chromatography; determination by HPLC with fluorescence detection.  
 Easy-Extract Zearalenone: Application of Immunoaffinity columns for sample clean-up prior detection of Zearalenone using HPLC analysis; Instructions for use; Rhône-Diagnostic Technologies Ltd., Glasgow.

**Fumonisin, external analysis**

<i>Parameter</i>	<i>Result</i>	<i>Unit</i>	<i>LOQ</i>	<i>Unit</i>
Fumonisin B1	< LOQ	µg/kg	12	µg/kg
Fumonisin B2	< LOQ	µg/kg	12	µg/kg

method:

(external analytical report available on demand)

LOQ : Quantitation limit; up from this level quantitative results are available

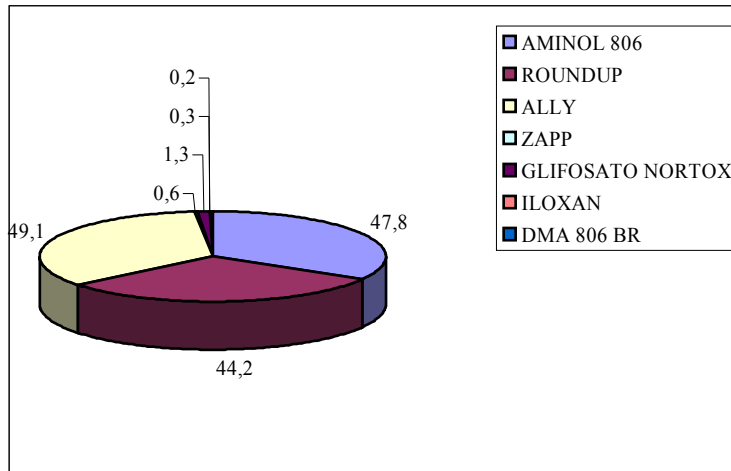
n.d. : not detectable

n.a. : not analysed

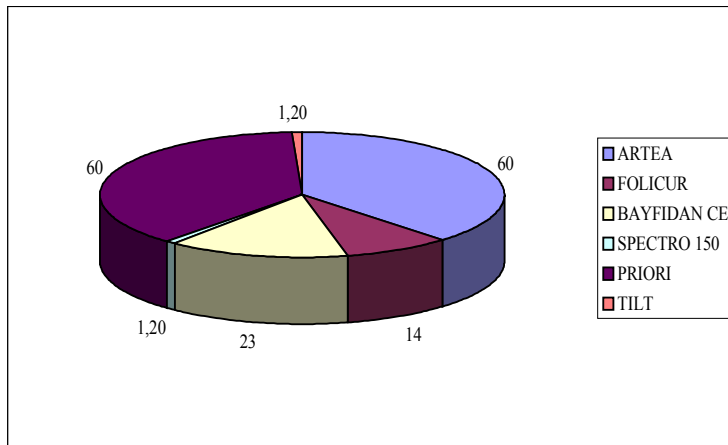
**Remarks:**

Peter Vögler  
 Manager Residues Department - CLF GmbH

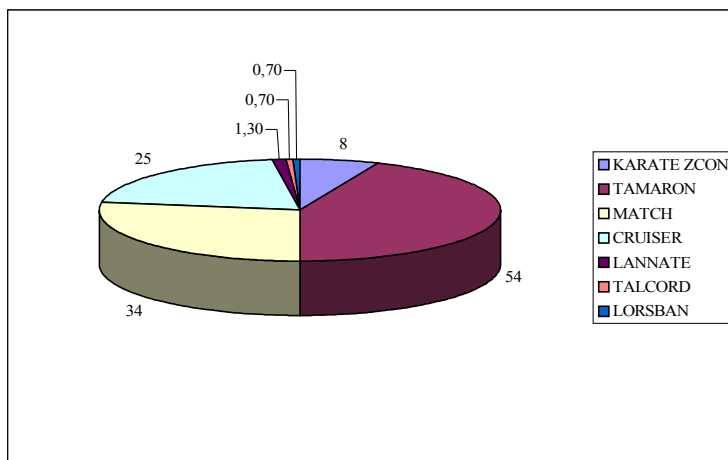
**ANEXO 8**



Herbicidas(%) empregados na cultura do trigo



Fungicidas (%) empregado na cultura do trigo



Inseticidas (%) empregados na cultura do trigo.

**ANEXO 9**

**Nome comercial e técnico dos defensivos agrícolas aplicados no campo onde foram produzidas as 1000 toneladas de trigos no Município de Assis Chateaubriand-PR na safra de 2003-2004.**

<b>NOME COMERCIAL</b>	<b>NOME TÉCNICO</b>
<b>HERBICIDAS</b>	
<b>Aminol 806</b>	2,4 D
<b>Roundup</b>	Glifosato
<b>Ally</b>	Metsulfurom Metílico
<b>Glifosato Nortox</b>	Glifosato
<b>Iloxan</b>	Diclofope Metílico
<b>DMA 806 BR</b>	2,4 D
<b>INSETICIDAS</b>	
<b>Karate Zeon</b>	Lambdacialotrina
<b>Tamaron</b>	Metamidofos
<b>Match CE</b>	Lufenuron
<b>Cruiser 700 ws</b>	Tiametoxan
<b>Lannate BR</b>	Metomil
<b>Talcord</b>	Permetrina
<b>Lorsban</b>	Clorpifós
<b>FUNGICIDAS</b>	
<b>Artea</b>	Ciproconazol + Propiconazol
<b>Folicur</b>	Tebuconazol
<b>Bayfidan CE</b>	Triadimenol
<b>Spectro 150</b>	Difenoconazol
<b>Priori</b>	Azoxistrobina
<b>Tilt</b>	Propiconazol

## ANEXO 10

