

Desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas em milho armazenado em bolsas plásticas inoculado com esporas de *Aspergillus spp*

Rodríguez, J.C.; Malinarich, H.D.; Exilar J.P.; Nolasco, M. y Escande A.

Introdução:

O incremento na área plantada e na produtividade dos distintos cultivos que aconteceram nos últimos anos em Argentina, acentuou os problemas de armazenamento e tratamento pós-colheita dos grãos. Esse crescente problema foi amenizado a partir do ano 2000 com a introdução do sistema conhecido como silo bolsa o Silo Bag. Essa técnica foi amplamente adotada pelos produtores agrícolas de todo país e, em cinco campanhas superou folgadoamente os 10 milhões de toneladas armazenadas. Contudo, não cresceu na mesma forma da informação científica que garantia essa prática, desconhecendo-se muitos dos mecanismos físicos, químicos e biológicos que se produzem dentro desses silos e as conseqüências que os mesmos podem gerar desde ponto de vista comercial, industrial, fisiológico ou nutricional.

As primeiras evoluções que se realizaram a partir do ano 2001, limitaram-se a registrar e analisar as variáveis mais facilmente mensuradas, como umidade, peso, hectolítrico, poder e energia germinativa, que serviram para explicar muitos dos resultados observados no campo.

Dentro do complexo biológico que o armazenamento de grãos existe diversos fatores bióticos que podem alterar a qualidade do grão desde o ponto de vista comercial, industrial, nutricional e até sanitário, segundo o destino final dos mesmos.

Assim é como a qualidade industrial pode definir o uso da farinha resultante do trigo, o a digestibilidade e palatibilidade determinaram a possibilidade de consumo dos grãos forrageiros, que tem como destino final o consumo por parte de animais domésticos em forma direta ou formando parte de rações complexa balanceadas, onde os grãos ou seus subprodutos são só um componente das mesmas. A importância está em que os microorganismos ou elementos produzidos por eles baixam a palatibilidade das rações ou produzem toxicidade que afetam ao incremento de peso ou, em alguns casos, provocam a morte dos animais. Dentro destes fatores, as micotoxinas têm grande importância, já que dentro do mercado internacional representam uma das principais barreiras para o comércio e seus limites de tolerância são manobrados arbitrariamente pelos compradores. De todas as formas estas barreiras são justificadas já que estas toxinas transladam-se ao produto final de consumo humano, como leite, ovo, carne, etc.

Este trabalho trata de iniciar estudos sobre a viabilidade dos fungos sobre os grãos armazenados a umidade superior à que recebe dentro das bolsas plásticas e sua capacidade para produzir toxinas.

Antecedentes

As micotoxinas são agentes químicos resultantes das atividades metabólicas de alguns fungos, que podem intoxicar seres humanos e animais. A intoxicação pode ser produzida quando um produto, subproduto e/ou derivado (rações balanceadas, leite, ovos) é utilizado na alimentação humana ou de animais. Isso produz substanciais perdas econômicas na atividade agrícola e na indústria alimentícia no mundo inteiro. Em um dos primeiros informes sobre contaminação por micotoxinas a FAO há estimado que aproximadamente 25% dos grãos no mundo têm algum nível de contaminação com micotoxinas (Devegowda 1999). O aparecimento de fungos produtores de micotoxinas em alimentos (arroz, milho, trigo, cevada, etc.) deve-se principalmente a condições inadequadas de armazenamento.

Na Argentina, Resnik ET AL. (1997) estudando a ocorrência natural de aflatoxinas e zearalenona em milho nas províncias de Buenos Aires e Santa Fé entre os anos 1983 e 1994, descobriram que em 54% das amostras analisadas tinham algum nível de contaminação: Aflatoxina B1 foi identificada em 20% das amostras, Aflatoxina B2 em 4% e zearalenona em 30%. Para o caso de Aflatoxina G1 somente apresentou-se em uma amostra durante todo o período e algo mais de Aflatoxina G2, mas também afirmam que dos doze anos analisados somente em três meses não se detectaram aflatoxinas e, com

exceção do ano de 1989, os níveis de contaminação foram leves. A Zearalenona esteve presente todos os anos de análises.

Nas regiões tropicais e subtropicais do mundo as aflatoxinas são as mais importantes. Estas são produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Nas regiões mornas, as micotoxinas mais comuns são zearaleona, ocratoxina A, toxina T-2 e a ultimamente descoberta fumonisina.

Devido ao potencial de risco que as micotoxinas podem exercer sobre a saúde humana e animal, muitos países regularizaram controles, centralizados basicamente nas aflatoxinas. Alguns dos regulamentos têm forma de lei e outros são de caráter consultivo ou de recomendação. Vários países têm ao menos limites para aflatoxina B1 ou para o total das aflatoxinas (B1+B2+G1+G2), com uma variação que vai de 5 a 30 ppb. Outros países também estabeleceram limites para as AFM1 no leite e seus derivados. Além das aflatoxinas, outras micotoxinas como patulina e ocratoxina, estão recebendo maior atenção por parte da legislação. Outros países também recomendam limites máximos para tricotecenos, particularmente deoxinivalenol, em farinhas de trigo. A legislação para a mesma micotoxina pode variar muito de um país a outro. Esta situação gera muitas dúvidas sobre quais foram os fatores que os países tiveram em conta para estabelecer esses limites.

Os fungos que produzem micotoxinas estão divididos em dois grupos, aqueles que infestam os grãos durante o cultivo, antes da colheita, chamados de fungos de campo e os que infestam no período pós-colheita, chamados fungos de armazenamento. Os fungos de campo contaminam os grãos durante o cultivo por isso requerem ambientes com umidade relativa superior a 80%. Enquanto que os fungos de armazenamentos necessitam menor quantidade de água e por isso podem proliferar em pós-colheita.

Os grãos, sementes e alimentos possuem a características de ser higroscópicos, e entre esses e o ar estabelece-se intercâmbios de água, principalmente na forma de vapor. De este modo, sobre as superfícies dos produtos se estabelece microlimas, cujas situações de estado são influenciadas principalmente de acordo ao teor da umidade dos produtos. Neste microlima a quantidade de água disponível esta expressada pelo fator de atividade aquosa (a_a), que varia de 0 a 1. Define-se este fator como a razão entre os valores da pressão de vapor de água atual no microlima e a pressão de vapor na superfície de uma porção de água pura, que representa a pressão de vapor para condição do ar saturado. Deste modo, o teor de umidade define os valores da pressão de vapor e do fator a_a sobre a superfície do produto. Durante o armazenamento e no espaço entre os grãos, é estabelecido um ambiente cujas condições de estado são afetadas principalmente pelo teor de umidade da massa grão, o que pode favorecer ou não o desenvolvimento de microorganismos segundo o valor do fator a_a . As bactérias desenvolvem-se em produtos cuja atividade aquosa é superior a 0,90, enquanto que os fungos requerem valores entre 0,65 e 0,90, banda em que os grãos podem ter um teor de umidade de 14 a 22%. Por isso, na conservação de grãos é utilizado o processo de secagem para reduzir o teor de umidade dos produtos a um nível em que a a_a não propicie a proliferação de fungos.

Em situações de equilíbrio higroscópico, a umidade relativa do ar, intergranular corresponde a 100 vezes ao valor da atividade aquosa. Para esta situação, a umidade relativa do ar é denominada umidade relativa de equilíbrio e a umidade dos grãos umidade de equilíbrio.

Para uma grande quantidade de espécies de interesses para o consumo tanto animal como humanos muitos investigadores determinaram o equilíbrio que existe entre a umidade relativa que circula o grão e a do próprio grão. (Quadro 1)

Grãos	Porcentagem de umidade relativa						
	15	30	45	60	75	90	100
Cevada	6,0	8,4	10,0	12,1	14,4	19,5	26,8
Milho	6,4	8,4	10,5	12,9	14,8	19,1	23,9
Aveia	5,7	8,0	9,6	11,8	13,8	18,5	24,1
Centeio	7,0	8,7	10,5	12,2	14,8	18,4	26,7
Sorgo	6,4	8,6	10,5	12,0	15,2	18,8	21,9
Trigo	6,6	8,5	10,0	11,5	14,1	19,3	26,6
Amendoim	2,5	4,2	5,6	7,2	9,8	13,0	-

Feijão	5,6	7,7	9,2	11,1	14,5	-	-
Soja	4,3	6,5	7,4	9,3	13,1	18,8	-

Quadro 1: Teor de umidade de diversos grãos em equilíbrio com diferentes

Níveis de umidade relativa à temperatura de 25°C (segundo Harrington – mencionado por Puzzi, D. 1977)

Para fins práticos enquanto a variação da temperatura não seja muito acentuada, pode-se dizer que o equilíbrio higroscópico não é afetado pelos câmbios térmicos (Puzzi 1977). Mas quando se verificam variações térmicas de grande amplitude, o equilíbrio higroscópico é influenciado de maneira significativa (Gráfico 1)

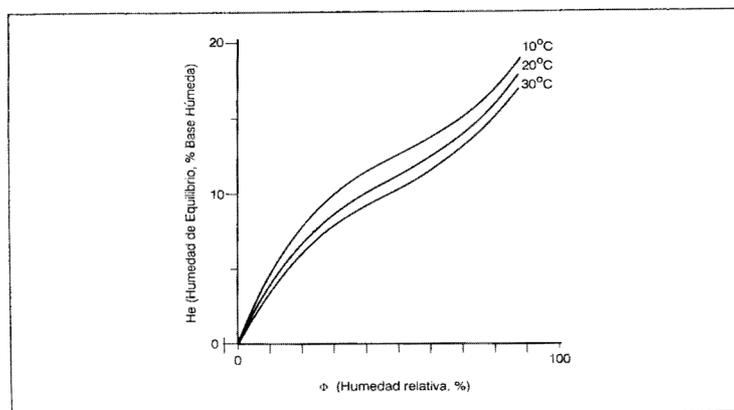


Gráfico 1 Equilíbrio higroscópico do milho submetido a diferentes temperaturas

Nas curvas observa-se que para uma mesma umidade relativa o teor de umidade de equilíbrio dos grãos apresenta uma tendência a baixar à medida que a temperatura aumenta. Existe outro fator que pode alterar este equilíbrio e que é histeresis, onde o valor de equilíbrio do grão varia um pouco dependendo de que o grão esteja ganhando umidade do ambiente (adsorção) ou que esteja cedendo umidade do ar (desorção). Os extremos das curvas sempre coincidem e o espaço formado entre ambas as curvas é chamado histeresis (Gráfico 2)

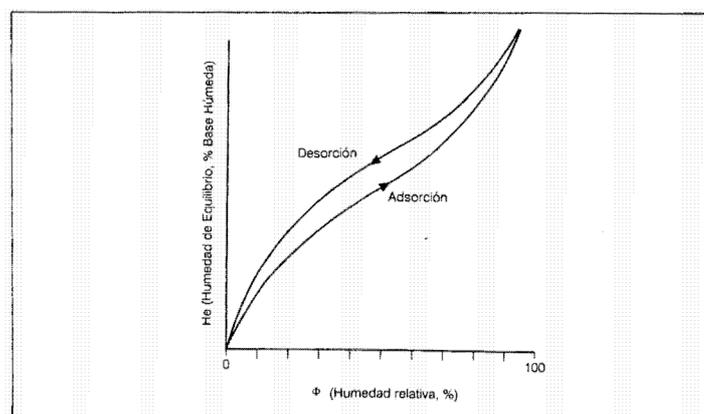


Gráfico 2: Fenômeno de histeresis nas curvas de equilíbrio higroscópico do milho.

O equilíbrio entre ar e grão é variável dependendo dos valores iniciais, da temperatura, da quantidade de grãos, etc. Mas estima-se que aos 30 dias já se consiga um equilíbrio higroscópico independente das condições em que se encontre o grão, sendo o tempo necessário muito mais curto para o grão liberar umidade ao ar circulante (dessorção)

Quadro 2 – Condições para o crescimento de fungos em grãos para temperaturas entre 25 e 27°C

Espécie	Umidade relativa do ar intergranular - %	Teor de umidade dos grãos %
<i>Aspergillus halophilieus</i>	68	12-14
<i>Aspergillus restrictus</i>	70	13-15
<i>Aspergillus glaucus</i>	73	13-15
<i>A. candidus</i> , <i>A. ochraeus</i>	80	14-16
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	82	15-18
<i>Penicillium spp.</i>	80-90	15-18

Fonte: Bakker-Arkema – University of Missouri (1999)

No quadro 2 estão enumeradas as condições de umidade ambiental e umidade dos grãos que permitem um desenvolvimento ótimo de populações de fungos a 25°C, observa-se que teores de umidade levemente superiores aos valores de recibo já predispõem ao desenvolvimento de fungos, e em alguns casos a própria umidade de recibo pode proporcionar um meio adequado para o desenvolvimento dos fungos.

No quadro 3, enumera-se micotoxinas de grande importância comercial e sanitária, o agente causal e a sintomatologia que apresenta certos animais quando consomem alimentos alterados. Fazendo uma leitura detalhada das mesmas não se observa grandes riscos para a vida dos animais intoxicados, porém observam-se efeitos graves sobre a produtividade.

Quadro 3 – Micotoxinas, agentes causais, grãos e alimentos que são afetados e alguns dos efeitos que causam em animais.

Micotoxina	Agente causal	Alimento afetado	Possível efeito em animais
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , y G ₂ (B _{2a} , G _{2a} , M ₁ , y M ₂ são metabolitos e raras vezes estão presentes em grãos; M ₁ y M ₂ são importantes contaminantes no leite)	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>	Cereais, amendoim, soja e outros alimentos.	Hepatotóxico; cancerígeno; redução da taxa de crescimento; enterites hemorrágicas; supressão da imunidade natural de infecção; queda da produção de carne, leite e ovos.
Ocratoxina A (nefrotóxica)	<i>A. ochraceus</i> y <i>Penicillium viridicatum</i>	Cereais	Tóxico para os rins e fígado; aborto; baixa conversão alimentícia, redução no nível de crescimento; redução da imunidade ante infecções.
Sterigmatocystina	<i>A. nidulans</i> y <i>A. versicolor</i>	Cereais	Toxemia; cancerígeno.
Zearalenona (Síndrome estrogênico) Zearalenol	<i>Fusarium graminearum</i> (estado sexual <i>Gibberella zeae</i>), <i>F. tricinatum</i> , e em menor grau, <i>F. moniliforme</i>	Cereais	Hiperestrogenismo, infertilidade, nanismo e eventualmente morte.
Vomitoxina, deoxivalenol ou DON	<i>F. graminearum</i>	Cereais	Refluxo de alimentos em porcos, gatos, cachorros; redução no aumento de peso.
Outros tricotecenos (T-2, HT-2, Monoacetoxiscirpenol o MAS, Diacetoxiscirpenol o DAS)	<i>F. tricinatum</i> , alguns grupos de <i>F. graminearum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. lateritium</i> , <i>F. poae</i> , y <i>F. sporotrichoides</i>	Cereais	Severa inflamação do trato gastrointestinal e possível hemorragia; edema; vômitos e diarreia; infertilidade; degeneração de medula espinhal; morte; redução no aumento de peso; crescimento reduzido; esterilidade.
Fumonisina B ₁ , B ₂	<i>F. moniliforme</i>	Milho	Leucoencephalomalacia, "blind staggers," em eqüinos.

Fusarium spp – Tricotecenos: Os níveis críticos de umidade para o desenvolvimento das espécies de *Fusarium* variam entre 22 e 30% em cereais. Dependendo da temperatura, da espécie e do substrato pode-se produzir mais de um tricoteceno por espécie (Badiale e Furlong, 1992).

Geralmente a contaminação ocorre em temperaturas que variam entre 0 e 35°C e umidade relativas entre 60 e 90%. A produção de toxinas pelos fungos contaminantes ocorre entre 8 e 15 °C e uma umidade relativa superior a 80% (Pitt e Hocking, 1997).

Para o caso de *Penicillium*, Comercio *et al* (1997) estudo a cinética de produção de citrinina e o crescimento de *P. citrinum* em trigo em distintos níveis de a_w . Determinaram crescimento micelial aos 12 dias e frutificação aos 17 dias com a_w 0,79, mas não detectaram toxinas logo de 95 dias com a_w de 0,801, determinando a igual que outros autores que esse é um umbral de produção de Citrinina. Com a_w de 0,812 iniciou-se a acumulação de toxinas depois de 22 dias de incubação, chegando ao máximo aos 46 dias. Rovarias (1998) determinou que somente 30% das cepas de *P. citrinum* eram produtoras de citrinina em arroz.

Prevenção e controle de micotoxinas em grãos e sementes armazenados

Secagem do grão

Os fungos não podem crescer (ou as micotoxinas ser produzidas) em alimentos devidamente secos. Por isso a secagem eficiente dos produtos e sua conservação sem umidade é a arma mais poderosa contra o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas.

Para reduzir ou prevenir a produção da maioria das micotoxinas, a secagem deve ser realizada imediatamente depois da colheita e o mais rápido possível. A quantidade crítica de água para o armazenamento seguro corresponde a uma atividade de água próxima a 0,7. A manutenção de alimentos por debaixo de 0,7 a_w é uma técnica eficaz utilizada mundialmente para controlar danos provocados por fungos e produção de micotoxinas em alimentos.

Os problemas para manter a a_w adequadamente baixa ocorrem freqüentemente nos trópicos pela elevada umidade ambiental. É possível controlar o crescimento de fungos em produtos armazenados através de um controle ambiental ou com uso de preservativos ou inibidores naturais, mas estas técnicas são sempre mais caras que uma secagem eficaz e, portanto, raramente viáveis em países em desenvolvimento.

Evitar danos no grão

O grão estragado está mais predisposto à invasão de fungos e conseqüentemente, à contaminação de micotoxinas. Por isso é importante evitar os estragos antes e durante o processo de secagem, como também no armazenamento. A secagem do milho em espiga é uma arma prática muito boa.

Os insetos são uma das principais causas dos estragos. Insetos de campo e algumas espécies de pragas de grãos armazenados estragam o grão e estimulam o desenvolvimento de fungos; em climas úmidos o crescimento de fungos no grão inicia-se geralmente na sua etapa de amadurecimento. No

armazenamento, muitas espécies de insetos atacam o grão e a umidade que podem acumular oferece um meio ideal para o desenvolvimento de fungos. É essencial que o grão armazenado seja conservado livre de insetos, do contrário são inevitáveis os problemas de umidade e fungos. Estes são produzidos ao faltar ao grão ventilação adequada e particularmente ao utilizar contentores metálicos.

Materiais e Métodos

Na fazenda San Lorenzo da empresa Zubiaurre S.A., na cidade de Tandil, província de Buenos Aires, realizou-se um ensaio em bolsa de milho (Cultivar Axel, Sursem) confeccionada na colheita 2001/02. As dimensões da bolsa utilizada foram 60 metros de comprimento, 2,70 metros de diâmetro e 250 micrones de espessura (Marca Ipesasilo). O grão tinha uma umidade de 19,5% ao ingressar no silo. As determinações do conteúdo de umidade foram realizadas em laboratório por meio de estufas e levando aos grãos até o peso constante. Desde o momento da coleta até a chegada ao laboratório, as amostras foram mantidas em bolsas de polietileno de fechamento hermético para não produzir variações nos níveis de umidade.

Foi tomada uma amostra de aproximadamente 20 kg do grão armazenado, homogeneizou-se e dividiram-se em 20 sub-amostras. Quatro delas foram analisadas diretamente para conhecer o estado inicial do grão armazenado. O restante foi inoculado com *Aspergillus* spp. obtido desde grãos de milho com infecção natural. O inoculo foi encubação por 15 dias a $18 \pm 5^\circ\text{C}$ e obscuridade em um substrato de grãos de trigo estéreis. Imediatamente antes de ingressar as amostras no silo bolsa, 50 gramas de trigo invadidos por *Aspergillus* spp. foram introduzidos em cada sub-amostras de milho de 1 kg e misturados por agitação para homogeneizar a mistura. As 16 sub-amostras inoculadas foram introduzidas na bolsa no dia 25 de outubro de 2002. A metade das sub-amostras foram colocadas na parte superior da bolsa e a outra metade na parte do meio, de maneira que se possam ter quatro repetições e poder retirá-las em dois momentos aos 53 dias e aos 122 dias do início do ensaio. As repetições foram colocadas ao comprimento do silo bolsa separadas por um espaço de 15 metros. Por cada repetição foram tomadas amostras que foram analisadas para determinar a eficiência da inoculação e a possível contaminação prévia com micotoxinas (D_0). Foram colocados sensores de temperaturas na parte superior interna a 5 cm por debaixo da lâmina de polietileno e outro no centro a 80 cm debaixo do primeiro e a 1,20 metros da parede lateral do silo para o interior do mesmo e na parte exterior, no terço superior e no lado sombreado da mesma (temperatura ambiente). O seguimento da temperatura foi realizado mediante registradores de dados marca Onset Hobo que coletaram valores de temperatura horária durante todo o período do ensaio. Em cada uma

das amostras obtidas logo do período estabelecido foram realizadas análises da presença de fungos e de micotoxinas nos grãos tratados. Das quatro repetições planejadas, duas foram fechadas deficientemente para medir a incidência do ar no desenvolvimento dos fungos e a produção de micotoxinas.

Resultados e discussões

No quadro 3 observa-se o resultado das análises de fungos e micotoxinas realizada no momento de introdução das amostras a silo bolsa (R_0) para assegurar que a presença de fungos ou micotoxinas era devido ao tratamento.

	$R_0H_0D_0$	$R_1H_1D_0$	$R_2H_1D_0$	$R_3H_1D_0$	$R_4H_1D_0$
ASPERGILLUS SP.	0.0%	8.0%	9.5%	22.0%	8.3%
AFLATOXINA B1	ND	31 ppb	ND	ND	ND
AFLATOXINA B2	ND	ND	ND	ND	ND
AFLATOXINA G1	ND	ND	ND	ND	ND
AFLATOXINA G2	ND	ND	ND	ND	ND
OCRATOXINA A	ND	ND	ND	ND	ND
TOXINA T-2	ND	ND	ND	ND	ND
ZEARALENONA	ND	< 10 ppb	ND	< 10 ppb	ND
ESTERIGMATOCISTINA	ND	380 ppb	ND	ND	ND

Referências

Quadro 3: Contaminação de grãos com micotoxinas na amostra inicial de milho, sem inocular (R_0) e inoculadas (R_x) antes de ser colocadas dentro do silo bolsa.

Pode-se observar que no momento de iniciar o ensaio, durante o período de armazenamento transcorrido desde a coleta não se havia produzido colonização natural de fungos dentro da bolsa.

Quando esse material foi inoculado com spp., obteve-se uma infestação suficiente para conseguir, se as condições fossem adequadas para o fungo, um desenvolvimento de colônias importante e a conseguinte produção de micotoxinas.

Como se pode observar no quadro 3, com a inoculação além de conseguir a infestação dos fungos também se produz algumas transmissões de micotoxinas que pode haver desenvolvido a colônia durante a incubação.

Foram feitas curvas de temperatura (Gráfico 3) na massa de grãos para determinar a condições térmicas dos grãos armazenados e compará-la com as temperaturas ótimas de crescimento e desenvolvimento dos fungos. Variações de temperatura entre 26,7 e 37,8°C e umidade relativa de 85% são ótimas para o crescimento de *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas (University of Missouri-Columbia, 1999). Da mesma forma com a obtenção da umidade das amostras estima-se a a_a do ambiente intergranario. A partir das curvas de equilíbrio higroscópico é possível determinar que o grão de milho armazenado permita manter uma umidade relativa do ar intergranario algo superior a 90%, a qual é ótima para o desenvolvimento de fungos.

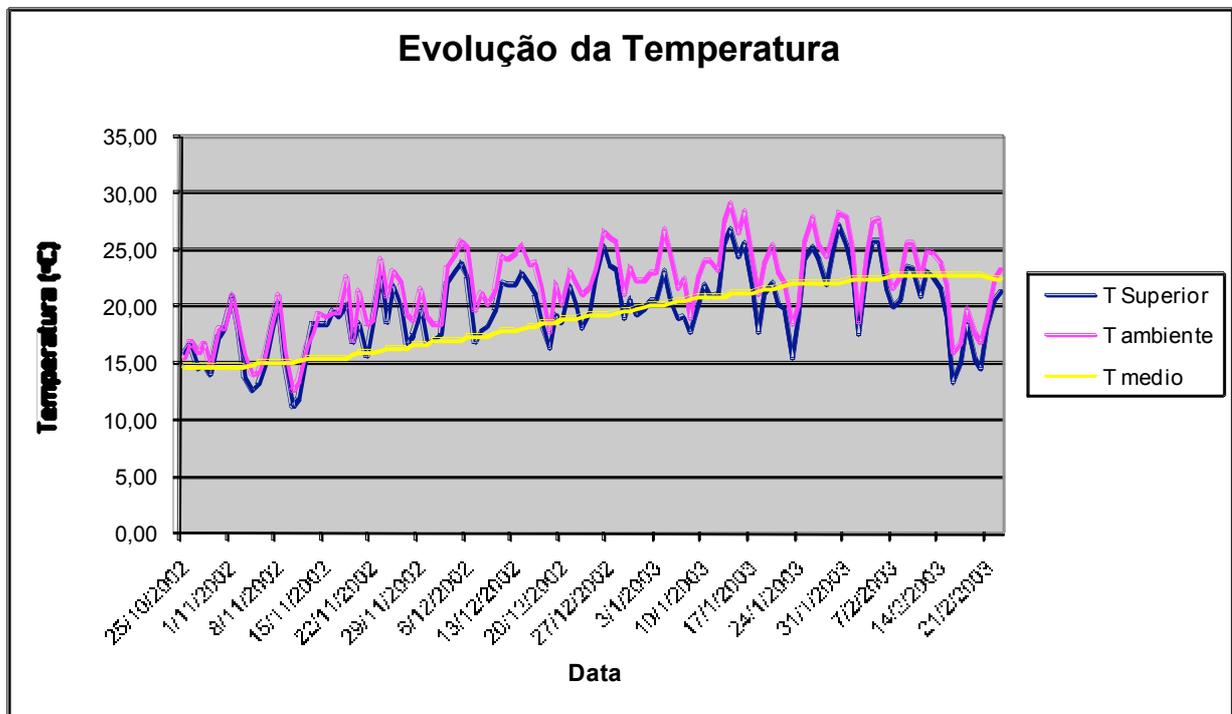


Gráfico 3: Evolução da temperatura ambiente e do ar dentro da bolsa no nível superior e médio durante o período analisado

Aos 53 dias foi feita a primeira extração das amostras do interior dos silos (bolsas). Durante esse período de tempo a temperatura do grão no centro da bolsa foi aumentando continua e gradualmente desde os 14,85°C até os 18,28°C por efeito do incremento da temperatura exterior. Esta tendência na variação da temperatura no interior dos silos plásticos já havia sido observada por Rodriguez et al (2003). A temperatura na parte de fora oscilou entre uma mínima de 11,17°C e uma máxima de 23,96°C, sendo a média de 18,25°C, superior em algo mais de 2°C à média do centro da bolsa que foi de 16,17°C. Isso se deve a que esta é uma etapa de transmissão desde uma estação fria a uma cálida.

Quadro 4: Contaminação de grãos com micotoxinas e fungos depois de 53 dias de incubação no silo bolsa

	R ₁ H ₁ D ₁	R ₁ H ₂ D ₁	R ₂ H ₁ D ₁	R ₂ H ₂ D ₁	R ₃ H ₁ D ₁	R ₃ H ₂ D ₁	R ₄ H ₁ D ₁	R ₄ H ₂ D ₁
AFLATOXINA B1	ND							
AFLATOXINA B2	ND							
AFLATOXINA G1	ND							
AFLATOXINA G2	ND							
OCRATOXINA A	ND							
TOXINA T-2	ND							
ZEARALENONA	ND							
ESTERIGMATOCISTINA	ND							

Referências

ND: Não detectada	
ppb: Partes por bilhão (microgramas/kg)	
R: repetição	R _{1, 2, 3 y 4} = Inoculado
H: altura	H ₁ = Superior H ₂ = Médio
D: dia	D ₁ = Dez 17 (53 dias)

A umidade do grão manteve-se constante ao longo do período de armazenamento de 122 dias. Com estas condições de umidade e temperatura, não se produziram desenvolvimentos massivos de fungos nem houve produção de micotoxinas (Quadro 4). A não proliferação de fungos não significa que estes tenham morrido como consequência da ação do CO₂ acumulado no interior da bolsa, senão que tiveram impedido o seu desenvolvimento, pois ao acondicionar amostras de grãos em câmara úmida os fungos desenvolveram-se abundantemente

Durante o período de armazenamento entre o dia 53 e o dia 122, a temperatura do grão no centro da bolsa foi incrementando-se continua e gradualmente desde os 18,28°C até os 22,86°C pelo efeito do incremento da temperatura exterior, começando a cair até 22,48°C nos últimos 3 dias. A temperatura do lado de fora oscilou entre uma mínima de 16,10°C e uma máxima de 29,15°C sendo a média de 23,41°C superior em algo mais de 2°C à média do centro da bolsa que foi de 21,34°C. Entre ambos os períodos as diferenças de temperatura tanto na parte de fora como no interior foi algo superior aos 5°C (5,16°C e 5,17°C respectivamente).

Quando comparamos estes valores com o ponto ótimo de crescimento de *Aspergillus flavus* vemos que no centro do silo nunca alcançaram esses valores e poucas vezes na parte de fora. Somente em 5 dias, entre a segunda quinzena de janeiro e os primeiros dias de fevereiro, os valores médios superaram a casa do ponto ótimo, e em 2 dias se iguala, mas a temperatura foi propícia para o desenvolvimento da população de fungos e combinado com a umidade relativa resulta um ambiente muito favorável para haver conseguido não somente o desenvolvimento de fungos senão que também a produção de micotoxinas.

Quadro 5: Contaminação de grãos com micotoxinas e fungos aos 122 dias de incubação no silo bolsa

	R ₁ H ₁ D ₂	R ₁ H ₂ D ₂	R ₂ H ₁ D ₂	R ₂ H ₂ D ₂	R ₃ H ₁ D ₂	R ₃ H ₂ D ₂	R ₄ H ₁ D ₂	R ₄ H ₂ D ₂
AFLATOXINA B1	41 ppb	ND	ND	ND	82 ppb	819 ppb	819 ppb	328 ppb
AFLATOXINA B2	ND	ND	ND	ND	17 ppb	50 ppb	50 ppb	< 1 ppb
AFLATOXINA G1	ND							
AFLATOXINA G2	ND							
OCRATOXINA A	ND							
TOXINA T-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1220 ppb	ND
ZEARALENONA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	202 ppb	ND
ESTERIGMATOCISTINA	ND							
<i>Aspergillus</i> sp.	1%	2%	0%	0%	43%	45%	100%	85%

Referências

ND: Não detectada		
ppb: Partes por bilhão (microgramas/Kg)		
R: repetição		R _{1, 2, 3 y 4} = Inoculado
H: altura	H ₁ = Superior	H ₂ = Médio
D: dia		D ₂ = Fev 24 (122 dias)

Pela metodologia de trabalho utilizada no presente trabalho, as repetições 3 e 4, foram colocadas dentro do silo pelo mesmo orifício e ao extrair as amostras correspondentes ao dia 53, foram deficientemente fechadas, o que determinou que o fechamento não fosse completamente hermético. Ao momento de retirar as amostras do dia 122, os selos de fechamento estavam parcialmente descolados, se descolaram facilmente e as amostras apresentavam alterações visíveis. Esta anomalia observa-se claramente no quadro 5. As repetições 1 e 2 contêm uma baixa presença de fungos, e produção de aflatoxinas, somente na repetição 1 da parte superior o nível é um pouco superior ao que se observa na amostra inicial. Nas repetições 3 e 4 a atividade dos fungos e a produção de micotoxinas são elevadas. Aparentemente onde foram mantidas as condições de hermeticidade a proliferação de fungos é extremadamente baixa e, por conseguinte a produção de micotoxinas é muito baixa ou não detectável.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento dos fungos e a produção de micotoxinas são nulos quando as condições de hermeticidade são mantidas durante o período analisado, ainda quando as condições de temperatura e umidade são ótimas ou muito próximas das ótimas para o desenvolvimento dos fungos.

Quando as condições de hermeticidade são perdidas o desenvolvimento de *Aspergillus* spp. e a produção de aflatoxinas, assim como outros fungos acompanhantes e as micotoxinas associadas a eles são produzidas em forma profusa.

A sobrevivência de spp. Depois de 120 dias de hermeticidade no sistema é muito baixa e nula a produção de aflatoxinas.

Seria desejável conhecer o tempo de exposição e a concentração CO₂ de para produzir a morte de *Aspergillus* spp, assim como a resposta de outras espécies de fungos comuns nos grãos produtores de micotoxinas às mesmas condições.