

FUNGOS E MICOTOXINAS EM SILAGENS

Rafael Camargo do Amaral¹

Luiz Gustavo Nussio¹

Introdução

A conservação da forragem na forma de silagem é caracterizada pela fermentação láctica espontânea que ocorre em ambiente anaeróbico, sendo que, os principais agentes fermentadores são bactérias lácticas que metabolizam os açúcares e produzem o ácido láctico. Desse modo, a manutenção da anaerobiose e a queda do pH constituem os fatores que são responsáveis pela preservação da forragem armazenada (Driehuis et al., 1999; Pahlow et al., 2003), pois os microrganismos capazes de deteriorar a silagem são inibidos pelo efeito sinérgico dos ácidos produzidos durante a fermentação, pela pressão osmótica elevada e pela ausência de oxigênio (Woolford, 1990).

Quanto aos fatores ligados à acidificação da massa, estes são obtidos quando ocorre predominantemente fermentação homoláctica (Driehuis et al., 1999) e podem ser alcançados com facilidade, por exemplo, na cultura do milho, devido às suas características desejáveis relacionadas a capacidade de fermentação (alta concentração de carboidratos solúveis, baixo poder tampicante e umidade reduzida) (Allen et al., 2003).

O contato da massa com o oxigênio é inevitável durante algumas fases que compreendem o processo de ensilagem (abastecimento do silo, armazenamento e desabastecimento). Segundo Sprague (1974), citado por Woolford (1990) e reiterado por Pahlow et al. (2003), em um silo bem vedado o O₂ presente na massa é consumido rapidamente pelo processo de respiração celular e pela microbiota (microrganismos aeróbios facultativos), pois em 15 minutos cerca de 90% do oxigênio é removido e menos de 0,5% permanece após 30 minutos. De fato, a maior quantidade de oxigênio que permeia a silagem se deve à consequência do escape de CO₂ da massa que “bombeia” oxigênio para o interior do silo, buscando o equilíbrio dos gases (Pitt e Muck, 1993). Pelo fato do silo não ser ambiente hermético, durante o período de armazenamento o ar penetra no seu interior (Muck et al., 2003), principalmente no topo e nas zonas laterais em contato com a parede (Bolsen et al., 1993), sendo que este problema pode se agravar, sobretudo durante o fornecimento da silagem aos animais (Honig, 1991). A presença de O₂ desencadeia a proliferação de microrganismos indesejáveis presentes na massa (leveduras, fungos e bactérias aeróbias) que se desenvolvem utilizando reservas energéticas presentes na forragem, acarretando em perdas no valor nutritivo da silagem e redução do consumo pelos animais (Lindgren et al., 1985).

No Brasil, devido a negligência aos processos de oxidação de nutrientes pelos microrganismos aeróbios e a, conseqüente, deterioração da silagem, pouca importância tem-se dado na prática, por se tratar na maioria das vezes de um problema assintomático. A dificuldade em se mensurar as perdas totais que ocorrem por manejo inadequado nas propriedades rurais e, a não mensuração de perdas qualitativas por meio de avaliações laboratoriais, resultam em falta do estímulo à percepção e à divulgação de resultados para a economia de produção. Dificilmente os produtores acreditam em perdas elevadas decorrentes de oxidação da massa, pois só consideram como tal aquelas que são visíveis (com presença de micélios), o que subestima perdas reais envolvidas na ensilagem.

¹ Universidade de São Paulo, ESALQ, Departamento de Zootecnia, Piracicaba, SP, Brasil.
rcamaral@esalq.usp.br; nussio@usp.br

Apesar de antigo e muito estudado, o assunto instabilidade aeróbia de silagens somente começou a receber atenção recentemente. Várias causas podem estar relacionadas a este fato, pois poucos são os trabalhos, como os de Ruppel et al. (1995) e Kuzin e Savoie (2001) que se dedicaram à estudar a importância dos fatores inerentes ao manejo e mais raros os que caracterizaram o efeito da silagem deteriorada e de seus produtos (aminas biogênicas, micotoxinas) sobre a ingestão e metabolismo dos animais, como os trabalhos de Bolsen et al. (2002) e Tabacco e Borreani (2002).

O tema deterioração aeróbia não se limita as questões relacionadas às perdas, porque o desenvolvimento de microrganismos, como algumas espécies de bactérias (*Bacillus*, *Clostridium* e *Listeria*) e alguns fungos filamentosos podem influenciar nos aspectos ligados a qualidade higiênica da silagem (Lindgren et al., 2002). O crescimento de fungos pode vir acompanhado pela produção de micotoxinas na massa. Dessa forma, os animais que são alimentados com grandes proporções de silagem na ração (vacas leiteiras) podem intoxicar-se, causando efeitos diretos ao seu desempenho e colocando em risco a saúde humana que utiliza alimentos de origem animal ao longo da cadeia alimentar (Whitlow e Hagler Jr., 1997).

Por estas razões, se faz necessário colocar em ação todas as estratégias para reduzir a penetração de O₂ no silo, evitando seus efeitos deletérios, tanto de ordem nutricional como sanitária, durante o armazenamento ou durante o consumo da silagem.

Fungos filamentosos produtores de toxinas

O reino Fungi é um grande grupo de organismos eucariontes, cujos membros são denominados fungos, representados pelas leveduras e fungos filamentosos (bolores). Os fungos são classificados num reino separado das plantas, animais e bactérias, sendo que a grande diferença é o fato de suas células apresentarem paredes celulares que contêm quitina, ao contrário das células vegetais que contêm celulose (Alexopoulos et al., 1996).

O conhecimento de que os fungos são microrganismos contaminante de alimentos e de que seus produtos metabólicos são responsáveis por intoxicações alimentares no homem e nos animais domésticos data da Idade Média. Os primeiros quadros patológicos, ocorridos na França entre os séculos XI e XVI, foram constatados em populações que se alimentavam com pães elaborados a partir de farinha de centeio, contaminada com fungos. A doença caracterizada posteriormente como ergotismo produzia convulsões, gangrena seca das extremidades, e surgia de forma epidêmica em consequência da ingestão de micotoxinas presentes nos escleródios (esporão do centeio) do fungo Ascomiceto *Claviceps purpúrea* (Pier, 1973). A micotoxicose foi inicialmente chamada de Fogo de Santo Antônio porque os romeiros, portadores da doença, quando se afastavam da fonte de infecção, em romaria ao túmulo de Santo Antônio de Pádua, na Itália, retornavam recuperados e às vezes até curados, fato esse considerado pelo povo na época como milagre (Forgacs e Carll, 1962). Os animais domésticos também eram afetados pelos ergocalcóides quando consumiam feno, centeio ou outros cereais contaminados pelo *Claviceps purpúrea*. O ergostismo nesses animais se manifestava sob a forma gangrenosa e nervosa, dependendo das características do ergocalcóide consumido.

As intoxicações pela ingestão de alimentos contaminados com toxinas produzidas por fungos foi uma constante ao longo do século passado. Durante a II Guerra Mundial duas epidemias importantes ocorreram na Rússia, em consequência do consumo de cereais contaminados por fungos. Em 1960 na Inglaterra, ocorreu a morte de 100.000 perus

alimentados com rações que continham em sua formulação torta de amendoim importadas do Brasil, chamada de doença X dos perus. Segundo Morgavi e Riley (2007), a partir desse evento foram iniciados os estudos e a descoberta da aflatoxina.

Dentre as características dos fungos filamentosos, a biossíntese de produtos naturais os tornam de grande interesse para a comunidade científica. Seus metabólitos possuem contrastes marcantes, com funções diversas: as vezes útil no uso farmacêutico (penicilina) e por outro lado apresentando potentes propriedades tóxicas e carcinogênicas (aflatoxinas).

Segundo Hoffmeister e Keller (2007), os estudos sobre os metabólitos fúngicos datam de anos anteriores a 1870, onde pigmentos sintetizados por cogumelos atraíram a atenção dos químicos orgânicos da época. Já no século XX foi testemunhado, isolado e caracterizado quimicamente vasta diversidade de produtos naturais de fungos filamentosos, movido pela descoberta da penicilina.

Segundo Woolford (1990), a atenção direcionada aos microrganismos aeróbios em silagens só foi dada nas últimas duas décadas. Antes desse evento a presença de fungos na superfície de silagens, era tida como evento normal, inevitável, uma manifestação da fermentação ou perda intrínseca ocasionada por esta atividade.

Condições para desenvolvimento

A exigência mais óbvia para desenvolvimento fúngico é a necessidade de fontes de nitrogênio e energia. Um segundo requerimento é a temperatura ambiente. Embora os fungos possam respirar em diversidade de temperaturas, existem limites estabelecidos para seu crescimento e produção de toxinas (Figura 1). *Aspergillus* e *Penicillium* são espécies que apresentam seu desenvolvimento ótimo em condições de temperatura elevada, enquanto que espécies de *Fusarium* tem preferência por menores temperaturas.

Os fungos filamentosos são organismos obrigatoriamente aeróbios, mesmo assim seu crescimento e proliferação podem ser controlados pela aeração durante o armazenamento de grãos, embora essa estratégia não seja opção no caso de preservação da silagem. Apesar da necessidade de ambiente aeróbio, algumas espécies de fungos são capazes de sobreviver em concentrações baixas de oxigênio, inferiores a 4% (Magan e Lacey, 1988).

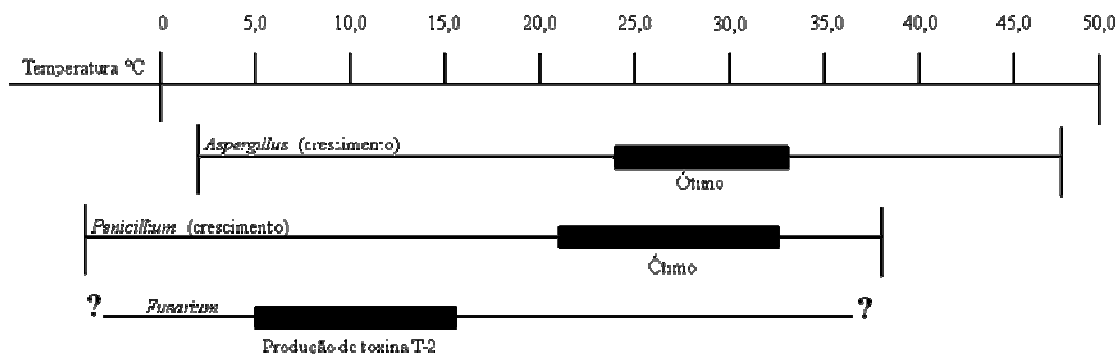


Figura 1. Amplitude e temperatura ótima de crescimento para fungos filamentosos comumente associados com alimentos destinados a alimentação animal. Adaptado de Nelson (1992).

Segundo Tuite (1969), a maioria dos fungos filamentosos necessita de pelo menos 1 – 2% de oxigênio. Entretanto existe a exceção para a espécie *Fusarium verticillioides*, a qual é capaz de sobreviver em ambiente com 60% de CO₂ e concentração de O₂ inferior a 0,5%. Estas condições reforçam a ideia da necessidade de se realizar o processo de ensilagem de maneira rápida e eficiente, bem como realizar a vedação do silo de maneira adequada.

Fundamentalmente importante no crescimento de fungos é a água livre ou disponível no alimento, também denominada de atividade de água (Aw). A atividade de água é definida pela relação entre a pressão de vapor de determinado alimento e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura, com valores variando entre 0 e 1 (Coultrate, 1996). À medida que se aumenta os valores para atividade de água, a velocidade de reações e crescimento microbiano é beneficiado. Os fungos são os microrganismos mais resistentes à diminuição da atividade de água, sendo os principais responsáveis pela deterioração de alimentos (Figura 2 e Tabela 1). Alguns bolores, como é o exemplo de *Monascus* sp., podem crescer em condições de baixa atividade de água (0,62). Em razão total, a atividade de água pode variar entre valores de 0,50 a 0,94, sendo dependente da quantidade de silagem e do teor de matéria seca desse volumoso.

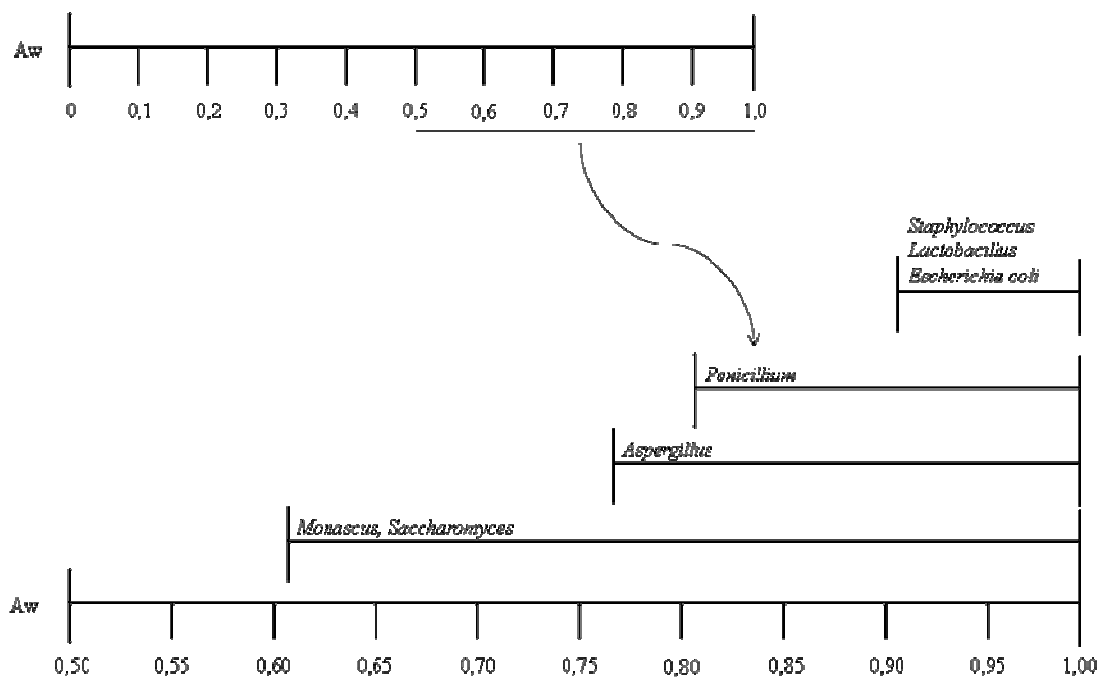


Figura 2. Relação entre atividade de água e crescimento fúngico em alimentos.
Adaptado de Nelson (1992).

Tabela 1. Atividade de água para crescimento e para produção de toxina de alguns fungos filamentosos.

Microrganismo	Aw mínima	
	Crescimento	Produção de toxina
<i>Aspergillus clavatus</i>	0,85	0,99 (patulina)
<i>Aspergillus flavus</i>	0,78	0,83 – 0,87 (aflatoxina)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,81	0,88 (ácido penicílico)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,83	0,85 (ocratoxina)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,82	0,87 (aflatoxina)
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,87	0,97 (ácido penicílico)
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,81	0,87 – 0,90 (ocratoxina)
<i>Penicillium expansum</i>	0,83 – 0,85	0,99 (patulina)
<i>Penicillium patulum</i>	0,83 – 0,85	0,95 (patulina)
<i>Penicillium viridicatum</i>	0,83	0,83 – 0,86 (ocratoxina)

Adaptado de Beuchat (1981).

Os fungos e a silagem

Os fungos em geral são apontados como principais responsáveis pela deterioração aeróbia de silagens, com destaque para fungos filamentosos e leveduras. As populações de leveduras em silagens podem variar de $< 10^2$ ufc para valores de 10^{12} ufc/g forragem num intervalo de tempo de 3 dias. Além disso, a vulnerabilidade da silagem para deterioração aeróbia é função da população de leveduras, sendo que, caso a silagem apresente populações acima de 10^5 ufc/g forragem, o problema da deterioração já estará instalado no sistema.

As leveduras relacionadas com o processo de deterioração aeróbia tem sido classificadas dentro de dois grandes grupos: 1) Utilizadoras de ácidos, grupo que compreende os gêneros *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia* e; 2) Utilizadoras de açúcar, tendo o gênero *Torulopsis* como representante. No caso de deterioração da silagem após a exposição ao ar, as leveduras utilizadoras de lactato serão as responsáveis pela maior magnitude da deterioração. Em estudo com 13 diferentes silagens de milho, Middlehoven e Franzen (1986) citado por Woolford (1990), observaram que a micoflora presente foi dominada por dois gêneros principais: *Candida* e *Saccharomyces* e, com a exceção da espécie *S. dairensis*, todas toleraram ácido acético no pH 4,0 e assimilaram os ácidos láctico e acético, bem como, o etanol.

Utilizando combinação de métodos de plaqueamento e testes moleculares para identificação da população fúngica na planta de milho e sua silagem, Mansfield e Kuldau (2007) isolaram seis espécies de *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. paneum*, *P. expansum*, *P. crustosum*, *P. commune* e *P. citrinum*), sete espécies de *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides* e *F. verticillioides*) e uma espécie de *Aspergillus*, *A. fumigatus* (Figura 3).

Em termos de abundância das espécies, *P. roqueforti* e *F. graminearum* foram as espécies prevalentes. *P. roqueforti* foi isolado em 50% das amostras de milho na colheita (n = 24) e em 75% das amostras de silagens (n = 24), enquanto *F. graminearum* foi encontrado em 58% de amostras na colheita e não foi verificado na silagem. *P. paneum*, que já foi relatado como sendo pertencente à espécie *P. roqueforti* e, recentemente

designado nova espécie (Boysen et al., 2000), foi isolado em amostras obtidas na colheita e nas silagens de milho.

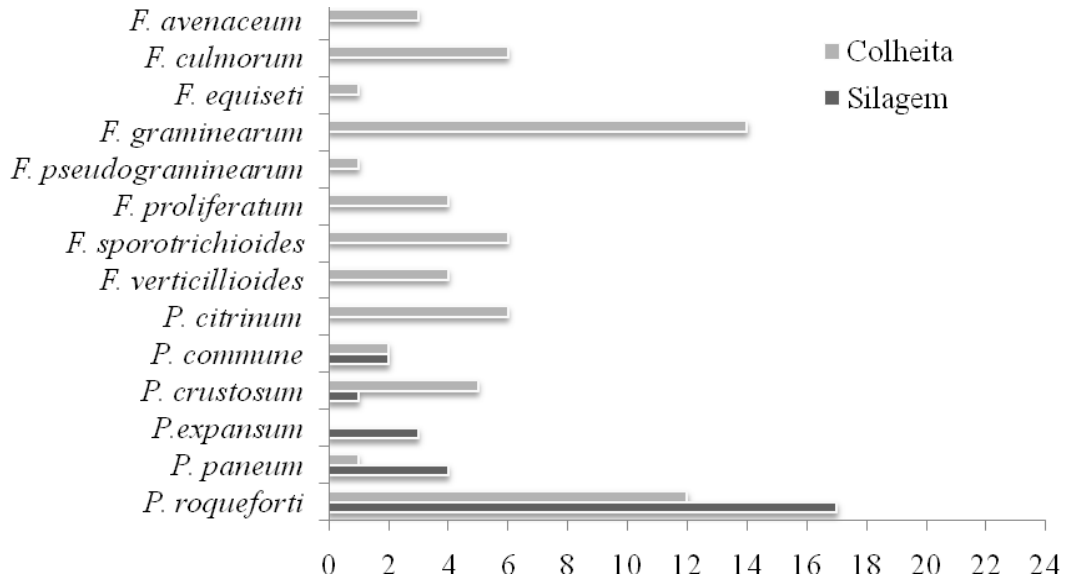


Figura 3. Espécies micotoxigênicas isoladas da planta de milho no momento da colheita e após ensilagem (3 – 6 meses).

Adaptado de Mansfield e Kuldau (2007).

Em adição as espécies micotoxigênicas isoladas, outras espécies de fungos filamentosos e leveduras foram isolados. Os gêneros de fungos filamentosos isolados incluíram: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cordyceps*, *Epicoccum*, *Mortierella* e *Mucor* (Tabela 2). De maneira geral, as leveduras representaram o grupo maioritário entre os fungos isolados da silagem. *Geotrichum candidum* foi a espécie mais encontrada, sendo isolada em 75% das amostras da planta na colheita e 21% nas silagens. Outras espécies de leveduras que se apresentaram em altas concentrações incluíram: *Candida intermédia*, *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia anomala*, *Pichia fermentans* e *Pichia membranifaciens*.

Tabela 2. Fungos filamentosos e leveduras isolados da planta e na silagem de milho.

Espécies	Colheita	Silagem
<i>Acremonium strictum</i> *	✓	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	✓	✓
<i>Candida cleridarum</i>	✓	
<i>Candida intermedia</i>	✓	✓
<i>Candida quinlingensis</i>	✓	
<i>Candida sake</i>	✓	✓
<i>Cladosporium tenuissimum</i> *	✓	✓
<i>Clavispora lusitaniae</i>	✓	✓
<i>Cardyiceps sinensis</i> *	✓	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	✓	✓
<i>Epicoccum nigrum</i> *	✓	✓
<i>Geotrichum candidum</i>	✓	✓
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	✓	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	✓	✓
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		✓
<i>Metschiakowia pulcherrima</i>	✓	✓
<i>Mortierella hyaline</i> *	✓	
<i>Mucor circinellioides</i> *	✓	✓
<i>Mucor racemosus</i> *	✓	✓
<i>Mucor rouxii</i> *	✓	✓
<i>Pichia anomala</i>	✓	✓
<i>Pichia fermentans</i>	✓	✓
<i>Pichia membranifaciens</i>	✓	✓
<i>Pichia segobiensis</i>	✓	
<i>Saccharomyces castelli</i>	✓	
<i>Saccharomyces paradoxus</i>		✓

*Indica espécies filamentosas.

Adaptado de Mansfield e Kuldau (2007).

Ocorrência de micotoxinas em silagens: etiologia

Os fungos filamentosos podem ser considerados coadjuvantes na deterioração aeróbia de silagens, pois durante o desabastecimento do silo, o desenvolvimento deles acontece somente em sucessão ao crescimento das leveduras (McDonald et al., 1991). Contudo, a deterioração aeróbia dos ingredientes de rações para animais causada por fungos filamentosos determina perda de elementos nutritivos e de energia (Lindgren et al., 2002), além do risco de contaminação com micotoxinas (Tabela 3). Recentemente, tem-se observado grande interesse em micotoxinas no que se refere à segurança alimentar, a despeito da origem e qualidade dos produtos destinados à alimentação humana. Dessa forma, um segmento que vem crescendo atualmente é o relacionado com triagem de micotoxinas em vários tipos de alimentos.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que causam respostas tóxicas (micotoxicoses) quando ingerida por animais (Binder et al., 2007). As plantas e forragens podem ser contaminadas pelas micotoxinas, de maneira geral, por dois meios: 1) patogenicidade fúngica e; 2) fungos saprofitos (Glenn, 2007). Entretanto, a formação das micotoxinas não ocorre obrigatoriamente durante o

desenvolvimento fúngico e, o mais importante: a detecção de fungos não implica necessariamente na presença de micotoxinas.

Muitas são as dúvidas e divergências sobre os estímulos que levam a formação dos metabólitos secundários pelos fungos filamentosos. Segundo Calvo et al. (2002), o metabolismo secundário dos microrganismos é comumente associado com o processo de esporulação, incluindo os fungos filamentosos. Esses metabólitos secundários associados a esporulação podem ser agrupados em três grandes categorias: 1) metabólitos que ativam a esporulação (por exemplo, compostos derivados de ácido linoléico produzidos por *Aspergillus nidulans*; 2) Pigmentos requeridos para a estrutura de esporulação (por exemplo, melaninas necessárias para formação ou integridade dos esporos e; 3) metabólitos tóxicos secretados pelas colônias em crescimento no momento da esporulação (por exemplo, produção de micotoxinas).

A relação existente entre a produção da micotoxina e a esporulação do fungo foi documentada em muitos gêneros de fungos micotoxigênicos. Em *Aspergillus parasiticus*, alguns produtos químicos que inibem sua esporulação também fazem que ocorra inibição da produção de aflatoxina (Reib, 1982). Alguns trabalhos científicos têm apresentado que espécies mutantes de *Aspergillus* deficientes na esporulação também são incapazes de produzir aflatoxinas (Calvo et al., 2002).

Fox e Howlett (2008) destacaram o papel dos metabólitos secundários na biologia dos fungos. Segundo os autores, em muitos casos, o motivo para a produção de toxinas pelos fungos é dada pela falta de resposta do hospedeiro (planta), se este o permitirá completar seu ciclo de vida, dessa maneira, a população fúngica presente produz toxinas. A conclusão dos autores é de que os metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos ainda não são compreendidos claramente, envolvendo algumas proteínas e complexos que respondem a vários estímulos ambientais e do hospedeiro.

Tabela 3. Fungos filamentosos e potenciais micotoxinas encontradas em silagens.

Espécies	Micotoxinas
<i>Acremonium lolli</i>	Lolitre B, paxilina
<i>Alternaria</i> spp	Ácido tenuazóico, alternariol
<i>Aspergillus clavatus</i>	Toxina A <i>clavatus</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavina A, gliotoxina
<i>Aspergillus versicolor</i>	Esterigmatocistina
<i>Byssochlamis nivea</i>	Ácido bissoclâmico, patulina
<i>Claviceps</i> spp	Ergotamina, ergostina, ergocriptina
<i>Fusarium</i> spp	Deoxinivalenol, nivalenol, toxina HT2, toxina T2, zearalenona, fumonisina
<i>Paecilomyces varotia</i>	Patulina
<i>Penicillium roquefort</i>	Roquefortina A, B e C, toxina PR, festuclavina
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A, citrinina

Adaptado de Scudamore e Levesey (1998).

Presença de micotoxinas no campo

Os fungos podem se desenvolver em vários tipos de ambiente, sendo que em condições de campo o gênero *Fusarium* tem predominância de crescimento. A exigência mínima para o desenvolvimento de fungos do gênero *Fusarium* é elevada umidade (>70%), oxigênio e temperaturas flutuantes (dias quentes e noites frias). Esse gênero é responsável por ampla gama de doenças de gramíneas e cereais. Em lavouras de milho, esses tem capacidade de causar podridões em partes distintas da planta, tais como: caule, espiga e grão. Em trigo e outros cereais de inverno, *Fusarium* causa uma doença chamada de ferrugem do trigo (*head scab*), considerada bem importante para essas culturas.

A eliminação de esporos de *Fusarium* do ambiente é impraticável, uma vez que esses hibernam durante o inverno no solo, em detritos de plantas ou nas sementes. Sendo assim, o contato do esporo com a planta será inevitável e o grau de infecção será determinado em função das condições de ambiente e de estresse da planta. Segundo Rankin e Grau (2002), a competição por nutrientes na planta se estabelece entre a própria planta e outros microrganismos, e nesta ocasião, os fungos presentes produzem micotoxinas como forma de obter vantagens na competição por alimento.

Segundo Jouany (2007), existem mais de 500 micotoxinas conhecidas, entretanto as espécies de fungos e as toxinas mais conhecidas, pertencentes ao gêneros *Fusarium* são: Dioxinivalenol (DON), produzida por *F. moliniforme* e *F. graminearum*; Toxina T2, produzida por *F. sporotrichioides*; Zearalenona, produzida por *F. graminearum* e; Fumonisina, produzida por *F. moliniforme*.

Fatores agronômicos envolvidos com a formação de micotoxinas

De maneira geral, a cultura implantada deve ter um programa balanceado para ajustes na fertilidade do solo com vistas à redução do estresse da planta e, conseqüentemente, incidência de doenças. Segundo Rankin e Grau (2002), o nitrogênio (N) e o potássio (K) estão diretamente associados com o aumento na podridão dos colmos em milho. Tanto o excesso como baixas concentrações desses nutrientes conduzem para aumento da incidência dessa doença, o que gera grande probabilidade de produção de micotoxinas.

A escolha do híbrido poderá influir na susceptibilidade ao ataque fúngico, com conseqüente produção de toxinas. Segundo Jouany (2007), o melhoramento de plantas pode ser uma solução para controle de *Fusarium*, entretanto, com a melhoria na resistência ao seu ataque, a qualidade de híbridos é afetada. Miedaner et al. (2006) verificaram que o gene associado a resistência aos fungos do gênero *Fusarium* em trigo são coincidentes com genes que controlam as características morfológicas da planta, havendo conflitos de interesses.

O momento da colheita da planta também é caráter decisório para produção de micotoxinas. Oldenburg e Höppner (2003) verificaram aumento de amostras positivas para deoxinivalenol à medida que o milho foi colhido mais tardiamente. Em plantas de milho colhidas com 30% de MS, os autores obtiveram 34% de amostras positivas (n=82), ao passo que quando a planta foi colhida com 40% de MS, 86% das amostras (n=50) se apresentaram contaminadas pela micotoxina.

A textura do grão é uma característica dos híbridos que vem sendo discutida com relação a qualidade nutricional e a susceptibilidade ao ataque fúngico. Apesar de híbridos de milho com grãos dentados (textura macia) apresentarem maior qualidade nutricional,

(maior facilidade ao ataque enzimático para digestão), estes também apresentam maior suscetibilidade a incidências de doenças e ataques de insetos, o que gera porta de entrada para colonização de fungos (Rankin e Grau, 2002).

Atualmente, grande foco tem sido dado aos híbridos de milho transgênicos (híbridos *Bt*), aos quais foram inseridos genes de *Bacillus thuringiensis* que levam à produção de proteínas tóxicas a determinadas ordens de insetos considerados pragas na cultura. A premissa para redução de fungos e, conseqüentemente, micotoxinas nesses híbridos é de que a integridade da planta será preservada por menor quantidade de ataques de insetos, fazendo com que a planta apresente menor quantidade de portas de entrada para esporos de fungos e sua posterior colonização nos tecidos da planta (Hammond et al., 2004).

Adicionalmente, práticas agrônômicas como a rotação de culturas, controle de pragas e doenças devem ser consideradas para redução da infestação fúngica.

Presença de micotoxinas durante o período fermentativo da silagem

De acordo com a classificação de Pelhate (1977) para fungos filamentosos em silagens, as espécies do gênero *Fusarium* são estritamente aeróbias. Espécies de fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Monascus ruber*, *Penicillium varioti* e *Penicillium roqueforti* são consideradas micro-aerofílicas ou indiferentes a presença de oxigênio.

Auerbach (1996) verificou que a população de fungos em silagem de milho decresceu ao longo do período de fermentação em condições estritamente anaeróbias (Figura 4). A partir do 10º dia após a ensilagem, *Penicillium roqueforti* foi a única espécie presente até o 100º dia de fermentação. Em contraste a esse fato, a simulação com o suprimento adicional de oxigênio durante o processo de fermentação (100 mg O₂/kg MS/dia) estimulou o crescimento da população fúngica e aumentou a diversidade de espécies não somente representados pela espécie *Penicillium roqueforti*.

Outro fator que contribui para a sucessão da micoflora em silagens durante a fermentação é a variação no pH causada pela produção dos ácidos orgânicos, tal como láctico, acético, propiônico e butírico. Embora o pH per se não afete os fungos filamentosos, podendo estes crescer ou permanecerem dormentes em amplitude larga de valores, entre 3 a 8, a variação nesse parâmetro pode influenciar sua susceptibilidade a outros fatores ambientais (Lacey, 1989).

A resistência dos esporos de fungos para ácidos orgânicos tem se mostrado variável entre as espécies. Segundo Woolford (1975), o ácido láctico não apresenta efeito prejudicial importante ao crescimento fúngico, ao passo que os ácidos orgânicos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) são potentes inibidores de fungos. Esporos de *Penicillium roqueforti* mostraram-se menos sensíveis a ação do ácido propiônico em relação à outras espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* (Auerbach, 1996).

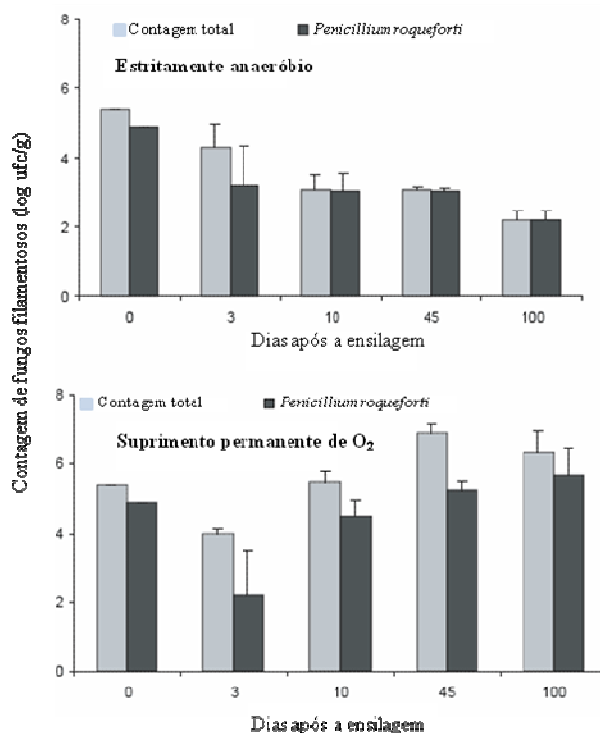


Figura 4. Efeito da presença de oxigênio na dinâmica de crescimento fúngico durante o período de fermentação em silagem de milho.

Adaptado de Auerbach (1996).

Auerbach et al. (1998) verificaram predominância de *Penicillium roqueforti* tanto em silagens de gramíneas emurchecidas como em silagens de milho (Tabela 4). Segundo os autores, essa espécie tem habilidade de crescer em baixas concentrações de oxigênio, altas concentrações de dióxido de carbono, baixas temperaturas e na presença de ácidos orgânicos voláteis. Tanto a silagem de gramínea emurchecida como a silagem de milho apresentaram maior contagem fúngica nas amostras consideradas visualmente contaminadas com a presença de micélios. Entretanto, os valores encontrados para roquefortina C foram maiores na silagem de milho, o que pode ser explicado em função da maior concentração de ácido lático e componentes solúveis, ou seja, a mesma abundância de substratos para o desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas não foi encontrada na silagem de gramínea.

Tabela 4. Incidência de *Penicillium roqueforti* e roquefortina C em silagens.

Tipo de silagem	Aparência visual	Amostras (n)	Contagem de fungos filamentosos (ufc/g)	<i>Penicillium roqueforti</i>		Roquefortina C (mg/kg MS)
				(n)	(%)	
Gramínea	Normal	30	$4,0 \times 10^4$	21	70	0,1 - 0,3
	Fungada	30	$1,0 \times 10^8$	21	71	0,2 - 15
Milho	Normal	36	$4,0 \times 10^4$	22	61	0,0 - 0,2
	Fungada	36	$1,6 \times 10^8$	29	80	0,7 - 36

Adaptado de Auerbach et al. (1998).

A Figura 5 mostra a relação estabelecida entre a contagem fúngica e a produção de micotoxina, sendo que a partir da contagem de 10^6 verificou-se aumento na produção de roquefortina C. Provavelmente, com o aumento na contagem de fungos no ambiente em questão, esses microrganismos produziram micotoxinas como meio de defesa e instinto de sobrevivência para garantir sua permanência, reprodução e perpetuação da espécie.

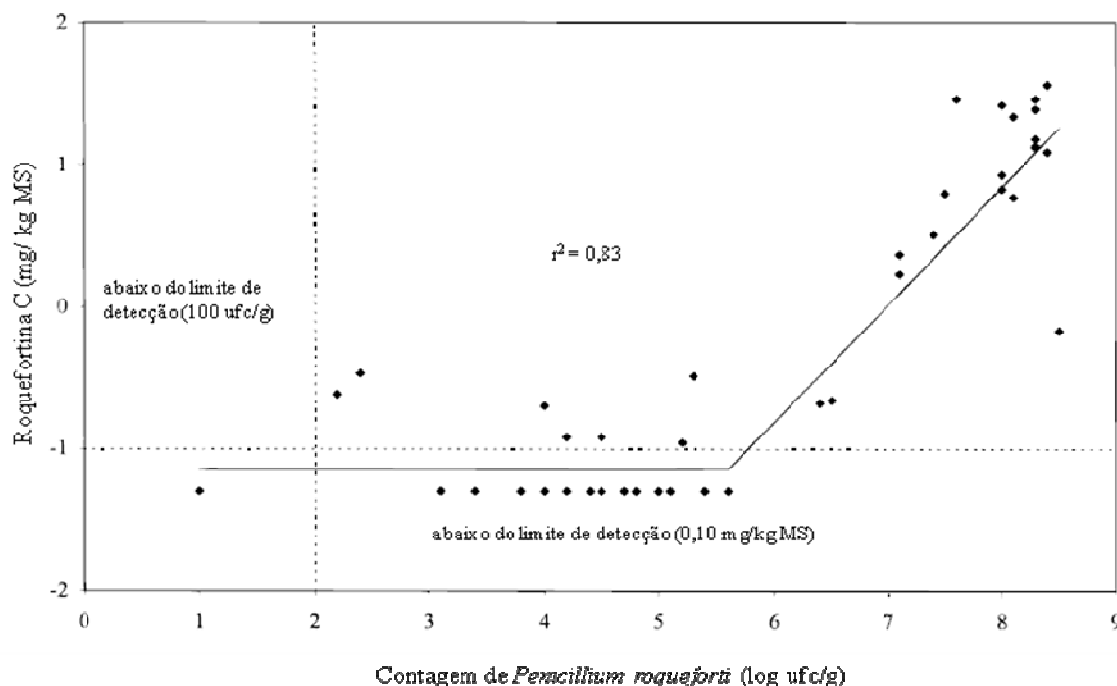


Figura 5. Relação entre contagem de *Penicillium roqueforti* e quantidade de roquefortina C em silagens (n=48).

Adaptado de Auerbach et al. (1998).

Presença de micotoxinas no período de pós abertura do silo

Após a quebra da vedação, a face frontal do silo permanece exposta ao O_2 . A partir deste evento, o principal fator que determina a estabilidade da silagem (anaerobiose) é perdido e a massa se torna potencialmente instável (Weinberg e Ashbell, 2003). O influxo do O_2 na face do silo é influenciado pela densidade alcançada durante a fase de enchimento (Honig, 1991; Pitt e Muck, 1993; Weinberg e Ashbell, 2003). Assim, nas regiões mais porosas da massa (áreas periféricas) aumentam os riscos de deterioração aeróbia (D'Amours e Savoie, 2004).

O processo de deterioração aeróbia é originado pela atividade de microrganismos aeróbios. Desse modo, as perdas durante o desabastecimento também serão influenciadas pela disponibilidade de nutrientes, pela temperatura ambiental (Ashbell et al., 2002) e pelo tempo de exposição da silagem ao O_2 (Weinberg e Ashbell, 2003) e, segundo Ohya et al. (1975), estes três fatores são interdependentes.

Teoricamente, a rota fermentativa mais desejável durante a conservação da forragem na forma de silagem é a do tipo homolática (conversão de uma molécula de glicose em duas de ácido láctico), pois não propicia perdas de MS ou de energia, o que pode resultar em maior consumo de silagem pelos animais (McDonald et al., 1991). Entretanto,

o perfil de fermentação desejável nem sempre evita as perdas após a abertura dos silos, ou em alguns casos pode inclusive aumentá-las (Kung et al., 2003). A alta concentração e predominância de ácido lático em silagens necessariamente não representa efeito positivo na estabilidade aeróbia. Silagens adequadamente fermentadas, com altas concentrações de ácido lático e açúcares remanescentes, são mais afetadas pela deterioração aeróbia (Weinberg e Muck, 1996). Os fungos, as leveduras e algumas espécies de bactérias promovem a assimilação aeróbia de lactato da silagem, reduzindo o seu potencial de conservação (Pahlow et al., 2003).

Os fungos filamentosos podem ser considerados coadjuvantes na deterioração aeróbia de silagens, pois, durante o desabastecimento do silo, o desenvolvimento deles acontece em sucessão ao crescimento das leveduras (McDonald et al., 1991).

Driehuis et al. (2008) realizaram na Holanda o monitoramento de 24 fazendas produtoras de leite. Amostras tanto de silagem de milho como de gramíneas foram utilizadas, sendo colhidas em diferentes regiões do painel dos silos (centro, topo e regiões visualmente mofadas). Adicionalmente, amostras da mistura de silagens, as quais eram oferecidas para os animais, foram coletadas. Os resultados indicaram que a silagem foi a principal fonte de contaminação com micotoxinas (Tabela 5). Silagem de gramínea apresentou baixas concentrações de zearalenona (ZEA), roquefortina C (RC) e ácido micofenólico (AMF) e não houve a presença de dioxinivalenol (DON). Em relação aos locais de coleta das amostras, as concentrações de DON e ZEA foram idênticas tanto para a superfície como para o topo do silo, ao contrário para os valores de RC e AMF que apresentaram maiores concentrações na região do topo dos silos.

Tabela 5. Incidência e concentrações de micotoxinas em silagens de milho, gramínea e suas misturas.

Tipo de silagem	Amostras (n)	DON ¹		ZEA ¹		RC ¹		AMF ¹	
		%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg
Mistura ²	16	81	465	25	48	44	568	38	256
Silagem de milho									
Centro	16	100	933	50	146	25	96	0	<25
Topo	16	94	978	44	137	50	1.605	50	660
Regiões mofadas	7	100	964	29	73	100	29.986	71	9.311
Silagem de gramínea									
Centro	16	0	<125	6	180	13	100	0	<25
Topo	16	0	<125	13	170	19	128	13	40

¹DON = dioxinivalenol; ZEA = zearalenona; RC = roquefortina C; AMF = ácido mefenólico.

²Mistura de silagens (silagem de milho e gramínea) oferecida aos animais.

Adaptado de Driehuis et al. (2008).

Micotoxinas como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina e toxina T2 não foram identificadas no presente estudo. Segundo os autores, apesar de não haver presença dessas micotoxinas, a literatura se reporta com relativa frequência a presença dessas em silagens, co-produtos e ingredientes concentrados. Particularmente para aflatoxina B1, a não contaminação das silagens foi relacionada com as condições ambientais encontradas (baixa temperatura), fato que provavelmente impediu seu desenvolvimento.

As aflatoxinas representam as micotoxinas que mais causam preocupação, pois apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, causando grandes

danos à saúde humana e elevados prejuízos econômicos no desempenho de animais domésticos, como os ruminantes (Lazzari, 1997). São produzidas principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, presentes em vegetais como o amendoim, o milho e o caroço de algodão.

A aflatoxina B1 (AFB1) é considerada uma das mais tóxicas produzidas por estas espécies. No fígado a AFB1 é biotransformada à aflatoxina M1 (AFM1), a qual é excretada no leite de animais em lactação (Battacone et al., 2005). Acreditava-se que a taxa de passagem da micotoxina do alimento para o leite era de 2%. Porém, estudos recentes colocaram em evidência que tal taxa está correlacionada com dois fatores: potencial produtivo do animal e estágio de lactação. Os valores de 2 a 2,5% referem-se a vacas com produção entre 16-25 kg/dia em estágio de lactação avançado. Como os animais estão se tornando cada vez mais produtivos, com produção superior a 30 kg de leite, a taxa se torna mais elevada, com valores próximos a 4% (Veldman et al., 1992).

Amaral et al. (dados não publicados) verificaram durante 14 semanas de experimentação (julho a outubro) que a presença de aflatoxinas em silagens de milho somente foi detectada a partir do momento em que ocorreram mudanças ambientais. A contagem de fungos filamentosos não apresentou variação entre os meses de agosto a outubro (Figura 6), ou seja, população se manteve estável com média de 5,1 e 3,5 log ufc/g nas regiões do topo e centro do silo, respectivamente. Com o início das chuvas em setembro houve início da presença de aflatoxina B1 nas silagens (Figura 7), sendo que à medida que o acúmulo de precipitação foi verificado, também identificou-se a elevação na concentração da toxina nas silagens.

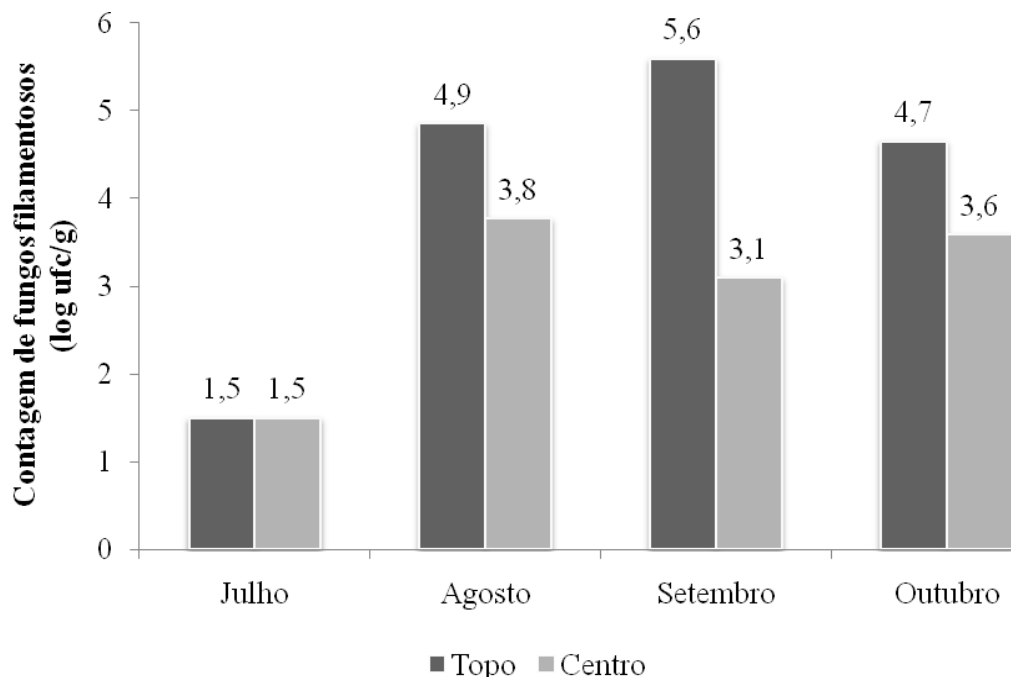


Figura 6. Contagem de fungos filamentosos em silagens de milho ao longo dos meses de julho a outubro de 2010.

Amaral et al. (dados não publicados).

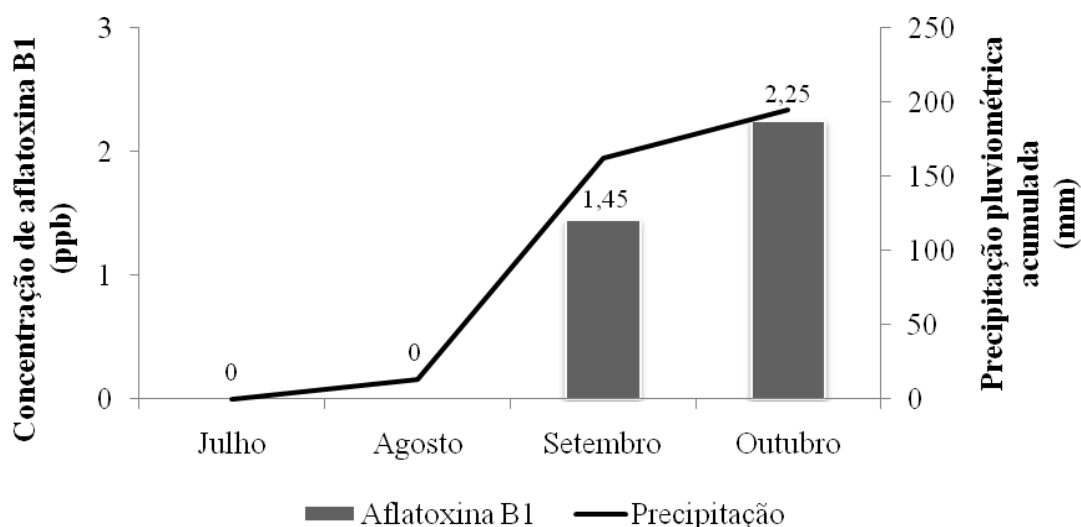


Figura 7. Presença de aflatoxina B1 em silagens de milho e precipitação pluviométrica ao longo dos meses de julho a outubro de 2010. Amaral et al. (dados não publicados).

Efeitos das micotoxinas nos animais

O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas pode conduzir a sintomas agudos de intoxicações, os quais são manifestados de maneira rápida e, geralmente, ocasionados pelo consumo de elevadas concentrações das toxinas. Na maioria dos casos, entretanto, é observado a ocorrência de quadro crônico, que permanece por longo período sem a percepção de sua ocorrência, principalmente pelo fato da ingestão de pequenas concentrações da toxina, tornando os diagnósticos dificultados e sugerindo outras causas que não contaminação por micotoxinas.

Geralmente, os efeitos pela intoxicação com micotoxinas são amplos, incluindo: efeitos teratogênicos, carcinogênicos, mutagênicos, estrogênicos e imunossupressivos (Tabela 6). Dentre os efeitos diretos associados ao consumo de toxina destacam-se: redução da ingestão de matéria seca, recusa do alimento, conversão alimentar ineficiente, baixa no ganho de peso/produção de leite, aumento na incidência de doenças (devido a imunossupressão) e redução na capacidade reprodutiva (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007; Morgavi e Riley, 2007).

A aflatoxina é considerada a micotoxina mais significativa e prevalente, encontrada em diversos alimentos, inclusive em silagens. Quando ingerida pelo animal, apesar de parte desta toxina ser degradada no rúmen, a aflatoxina B1 é biotransformada à aflatoxina M1 no fígado, a qual é excretada no leite de animais em lactação (Battacone et al., 2005).

Em estudo realizado no departamento de zootecnia da USP/ESALQ, Amaral et al. (dados não publicados) avaliaram lonas com diferentes permeabilidades ao oxigênio na vedação de silos. Os tratamentos foram compreendidos pela vedação do silo com: 1) lona de poliamida (45 μm) + lona de polietileno dupla face (200 μm); 2) lona de polietileno dupla face (200 μm); 3) lona de polietileno preta de material virgem (200 μm) e; 4) lona de polietileno preta de material reciclado (200 μm) + 15 cm de cobertura com bagaço de cana.

Tabela 6. Sumário de efeitos tóxicos das principais micotoxinas.

Micotoxinas	Efeitos
Aflatoxina B1	Carcinogênica, hepatotóxica, dano no DNA
Esterigmatocistina	Carcinogênica, dano hepático
Ocratoxina A	Carcinogênica, nefrotóxica, teratogênica
Citrinina	Nefrotóxica
Zearalenona	Estrogênica
Patulina	Carcinogênica, edema pulmonar, hemorragia
Ergotamina	Gangrena, redução da fertilidade
Tricotecenos	Hemorragia, diarreia, dermatite
Toxina PR	Dano no fígado e rins, mutagênica
Gliotoxina	Hematúria, imunossupressor
Ácido tenuazóico	Hemorragia, convulsões, anorexia
Alternariol	Citotóxico

Adaptado de Scudamore e Levesey (1998)

As silagens obtidas foram utilizadas na alimentação de vacas Holandesas, as quais apresentaram consumo médio de 22,3 kg MS/dia e produção média de 32,6 kg leite/dia durante 14 semanas de experimentação. As silagens apresentaram contaminação por aflatoxinas (Figura 7) principalmente nas semanas finais do experimento, o que foi correlacionado com o aumento da precipitação pluviométrica. Juntamente com a verificação da presença de aflatoxinas nas silagens, ocorreu excreção de aflatoxina M1 no leite dos animais. A concentração de AFM1 no leite apresentou valor médio de 0,006 ppb, valor inferior ao estabelecido pelos países da Comunidade Européia de 0,05 ppb.

A maior presença de amostras contaminadas com AFM1 no leite foi observada nas duas últimas semanas (13^a e 14^a semana), com 25% de ocorrência. Em relação aos tratamentos, a silagem proveniente do silo vedado com lona de polietileno preta de material virgem gerou excreção de AFM1 no leite em 40% das amostras analisadas, nos demais tratamentos houve similaridade entre as amostras, sendo observada ocorrência de AFM1 em 20% das amostras por tratamento.

De maneira geral, os ruminantes por apresentarem o rúmen repleto de microrganismos, apresentam vantagens em relação aos animais monogástricos na detoxificação das micotoxinas ingeridas. Entretanto, muitas dessas toxinas passam pelo rúmen, intactas ou biotransformadas em compostos com atividade biológica remanescente que podem causar danos à saúde do animal.

Conclusões

Fungos filamentosos e micotoxinas são contaminantes comumente encontrados em plantas forrageiras e silagens de várias localidades do mundo e são tidos como potenciais causadores de danos a saúde de animais de interesse zootécnico e aos humanos.

As micotoxinas estão presentes em todas as etapas do processo de ensilagem, desde a colheita, passando pela fermentação e chegando ao cocho do animal, sendo que os gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* são os maiores representantes das contaminações. Apesar de alguns autores se apoiarem na definição de que micotoxinas são produzidas por fungos em momentos de aumento de competição no ambiente, muitos resultados mostram que realmente o mecanismo para produção de determinada toxina

ainda não esta claramente compreendido. Provavelmente, outros fatores além da competição e estímulos ambientais possam contribuir para produção dessas toxinas, como espécie fúngica, inter-relações entre microrganismos e tipo de alimento a ser deteriorado.

O correto manejo da lavoura, do processo de ensilagem e do período pós abertura do silo são fundamentais para minimizar a contaminação por fungos e micotoxinas. Respeitando esses princípios, certamente ocorrerá redução nas perdas de nutrientes pelo desenvolvimento fúngico e, principalmente, redução dos efeitos tóxicos causados por seus metabólitos no desempenho e saúde do animal.

Referências bibliográficas

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M, **Introductory Mycology**. John Wiley e Sons, INC, New York. 4th ed, 869p. 1996.

ALLEN, M.S.; COORS, J.G.; ROTH, G.W. Corn silage. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 547-608.

ASHBELL, G.; WEINBERG, Z.G.; HEN, Y. et al. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 28, p. 261-263, 2002.

AUERBACH, H. Verfahrensgrundlagen zur Senkung des Risikos eines Befalls von Silagen mit *Penicillium roqueforti* und einer Kontamination mit Mykotoxinen dieses Schimmelpilzes. Landbauforsch. Völkenrode. Sonderheft 168:1-167, 1996.

AUERBACH, H.; OLDENBURG, E.; WEISSBACH, F. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. **J. Sci. Food Agric**. 76, 565-572, 1998.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, M.; PASCALE, M.; NICOLUSSI, P.; PULINA, G. Transfer of aflatoxin B1 from feed to Milk and from Milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.3063-3069, 2005.

BEUCHAT, L. R. Microbial stability as affected by water activity. **Cereal Foods World**. V.26, n. 7, p.345-349, 1981.

BINDER, E.M.; TAN, L.M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients, **Animal Feed Science and Technology**. 137:265-282, 2007.

BOLSEN, K.K.; DICKERSON, J.T.; BRENT, B.E. et al. Rate and extent of top spoilage in horizontal silos. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2940-2962, 1993.

BOLSEN, K.K.; WHITLOCK, L.A.; URIARTE-ARCHUNDIA, M.E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silages diets. In: THE INTERNATIONAL

SILAGE CONFERENCE, 13th, 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, 2002, p.75-77.

BOYSEN, M.E.; JACOBSSON, K.G.; SCHNURER, J. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:1523-1526, 2000.

CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J.W.; KELLER, N.P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 2002, 66, 3, 447-459.

COULTATE, T.P. **Food – The Chemistry of its Components.** Series of the Royal Society of Chemistry Paperbacks, 3rd edition. . p.321-339, 1996.

D'AMOURS, L.; SAVOIE, P. Density profile of corn silage in bunker silos. In: Annual International Meeting Sponsored. Ontario: ASAE/CSAE. 2004, 14p.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p. 583-594, 1999.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology.** 137:326-341, 2007.

FORGACS, J.; CARLL, W.T. Mycotoxicoses. **Adv. Vet. Sci.** 7:273-282, 1962.

FOX, E.M.; HOWLETT, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology.** 2008, 11:481-487.

GLENN, A.E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology.** 137:213-240, 2007.

HAMMOND, B.G.; CAMPBELL, K.W.; PILCHER, C.D.; DEGOOVER, T.A.; ROBINSON, A.E.; McMILLEN, B.L.; SPANGLER, S.M.; RIORDAN, S.G.; RICE, L.G.; RICHARD, J.L. Lower fumosin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. **J. Agric. Food Chem.** 52, 1390-1397, 2004.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N.P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Product Reports.** 2007, 24, 393-416.

HONIG, H. Reducing losses during storage and unloading of silage. In: PAHLOW, G; HONIG, H (Eds). **Forage conservation towards 2000.** 1.ed. Braunschweig: European Grassland Federation, 1991. p.116-128.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**. 137:342-362, 2007.

KUNG, L., Jr.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 305-360.

KUZIN, V.; SAVOIE, P. Modeling air infiltration in bunker silos to optimize the cover. In: Annual International Meeting Sponsored. Sacramento: ASAE. 2001, 10p.

LACEY, J. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. **J. Appl. Bacteriol.** 67:11-25, 1989.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba 2ed., Paranaset. 134p. 1997.

LINDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSON, A. et al. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 765-774, 1985.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influence of microbes and their metabolites on feed and food quality. In: GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN GRASSLAND FEDERATION. 19th, 2002, La Rochelle. **Proceedings...** La Rochelle, 2002, p.503-511.

MAGAN, N.; LACEY, J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. **Int. J. Food Microbiol.** 7:245, 1988.

MANSFIELD, M.A.; KULDAU, G.A. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. **Mycologia**. 99(2), 2007, pp. 269-278.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **Biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publication, 1991. 340p.

MIEDANER, T.; WILDE, F.; STEINER, F.; BUERSTMAYR, H. KORZUN, V. EBMEYER, E. Stacking quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* head blight resistance from non adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. **Theor. Appl. Gen.** 112, 562-569, 2006.

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

MUCK, R.E.; MOSER, L.E.; PITT, R. E. Postharvest factors affecting ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 251-304.

NELSON, C.E. Strategies of mold control in dairy feeds. **J. Dairy Sci.** 76, 898-902, 1992.

OLDENBURG, E.; HÖPPNER, F. *Fusarium* mycotoxins in forage maize – occurrence, risk assessment, minimization. **Mycotoxin Research**. 19:43-46, 2003.

OHYAMA, Y; MASAKI, S.; HARA, S. Factors influencing aerobic deterioration of silages and changes in chemical composition after opening silos. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26 p. 1137-1147, 1975.

PAHLOW, G; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PELHATE, J. Maize silage: Incidence of moulds during conservation. **Folia Vet. Lat.** 7:1-16, 1977.

PIER, A.C. An overview of the mycotoxicosis of domestic animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 163(11): 1259-1261.

PITT, R.E.; MUCK, R.E. A diffusion model of aerobic deterioration at the exposed face of bunker silos. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 55, p. 11-26, 1993.

RANKIN, M.; GRAU, C. Agronomic considerations for molds and mycotoxins in corn silage. **Focus on Forage**. v.4, n.1, p.1-4, 2002.

REIB, J. Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B1 under the influence of conidiogenesis affecting compounds. **Arch. Microbiol.** 133:236-238, 1982.

RUPPEL, K.A.; PITT, R.E.; CHASE, L.E., et al. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 141-1453, 1995.

SCUDAMORE, K.A.; LIVESEY, C.T. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. **J. Sci. Agric.** 1998, 77, 1-17.

TABACCO, E.; BORREANI, G. Extent of aerobic deterioration in farm maize silage as affected by silo management. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13th, 2002, Auchincruive. **Proceedings...** Auchincruive, 2002, p.178-179.

TUITE, J. **Plant pathological methods, fungi and bacteria**. Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minnesota, USA. 239p, 1969.

VELDMAN, A.; MEIJS, J.A.C.; BORGGREVE, G.J.; HEERESVAN DER TOL, J.J. Carry-over of aflatoxin from cows food to milk. **Animal Production**. v.55, p.163-168, 1992.

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G. Engineering aspects of ensiling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 181-188, 2003.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v.19, p.53-68, 1996.

WHITLOW, L.W.; HAGLER Jr., W.N. Effects of mycotoxins on the animal: The producer's perspective. In: **SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK**, Ithaca, 1997. **Proceedings...** Ithaca: NRAES, 1997. p. 222-232.

WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additive. **J. Sci. Food Agric.** 26:219-228, 1975.

WOOLFORD, M.K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, 1990, 68, 101-116.