

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Fabiana Rassweiler de Souza**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE AFLATOXINA E FUMONISINA SOBRE  
OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS**

**Florianópolis, 2007.**

FABIANA RASSWEILLER DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE AFLATOXINA E FUMONISINA SOBRE  
OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS**

Dissertação de Mestrado Submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico, da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.  
Orientador: Prof. Dr. Humberto Gracher Riella

Florianópolis, 2007.

**FABIANA RASSWEILLER DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE AFLATOXINA E FUMONISINA SOBRE  
OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química no programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 11 de outubro de 2007.

---

**Prof. Dr. Agenor Furigo Junior**  
**Coordenador do Programa**

---

Prof. Dr. Humberto Gracher Riella  
Universidade Federal de Santa Catarina  
**Orientador**

---

Prof. Dr. Nivaldo Cabral Kuhnen  
Universidade Federal de Santa Catarina  
**Membro**

---

Dr. Marcelo Piassi  
Universidade Federal de Santa Catarina  
**Membro**

---

Dra. Elita Urano de Carvalho  
Universidade Federal de Santa Catarina  
**Membro**

A Deus, por estar sempre presente em minha vida,  
A Noir e Marly, meus pais, pelas oportunidades, amor e apoio constantes,  
em todas as ocasiões.  
**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Humberto Gracher Riella, pela orientação e compreensão oferecidas durante todas as etapas do curso.

À Perdigão Agroindustrial S/A, por ter disponibilizado instalações, animais, tecnologia e apoio para a realização deste experimento.

Ao colega Keysuke Muramatsu, pela orientação, dedicação, disposição e indispensável parceria na realização deste trabalho.

Ao colega Ada Otir Pedro Padilha, pelo auxílio, apoio e disposição incondicionais.

Aos funcionários e estagiários do Centro Tecnológico Agropecuário, pelo auxílio na realização do experimento e coleta de dados.

Aos funcionários do Centro de Desenvolvimento Genético, em especial à Elisangela, pela atenção e orientação nas análises de morfologia.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia, em especial à Renata, pelo auxílio na realização de fotos e filmagens do material coletado.

Ao colega Marcelo Piassi, pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao amigo Leonardo Bretas Linares, que mesmo de longe muito me auxiliou no envio de diversas bibliografias.

Ao amigo Leandro Danielski, pelas diversas revisões, sugestões e auxílio oferecidos.

Às minhas queridas amigas e companheiras Iris e Karine, pelo apoio, incentivo e paciência nas horas boas e ruins.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda a escada.  
Apenas dê o primeiro passo.”  
*(Martin Luther King Jr.)*

## RESUMO

Este trabalho foi conduzido visando avaliar o efeito de Aflatoxina e Fumonisina no desempenho reprodutivo de galos, através de dietas específicas. Foram utilizados sessenta galos da linhagem Cobb 500, com aproximadamente 22 semanas, distribuídos em dois experimentos. Quarenta galos distribuídos num delineamento inteiramente casualizado constituído por quatro tratamentos (quatro níveis de aflatoxina e fumonisina) foram alojados em quatro boxes de 10 aves cada (uma ave = uma repetição). Para estes animais foram avaliados o vigor dos espermatozóides, a morfologia espermática e o peso dos testículos. Paralelamente, 20 galos foram alojados com 200 galinhas Cobb 500 e distribuídos em 20 boxes contendo cada um 10 galinhas e 1 galo, num delineamento inteiramente casualizado (quatro níveis de aflatoxina e fumonisina e cinco repetições). Para estes animais foi avaliado o percentual de ovos férteis gerados em relação aos diferentes tratamentos aos quais os galos foram submetidos. Os níveis de micotoxinas desejados foram atingidos utilizando-se milho visivelmente atacado por fungos e previamente analisado, bem como através da suplementação de culturas fúngicas contendo aflatoxina e fumonisina. O período experimental consistiu de 96 dias, divididos num período 30 dias de adaptação das aves às coletas de sêmen e 46 dias para a coleta de dados. Os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quando avaliados o vigor espermático, morfologia espermática e peso dos testículos dos animais utilizados nos experimentos. Para a análise de fertilidade em ovos, os dados mostraram comportamento inverso ao esperado, mostrando melhor resultado para os tratamentos de nível 2 e 4 de micotoxinas adicionadas. Para este parâmetro não foi possível um resultado mais conclusivo, pois resultados de mesma significância foram verificados para tratamentos onde foram utilizados níveis de toxinas bastante diferentes. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que os teores de micotoxinas utilizados não afetaram os índices de fertilidade e características do sêmen de Galos Cobb 500.

**Palavras-chave:** Micotoxinas. Galos. Fertilidade. Sêmen.

## ABSTRACT

This research was conducted with the objective to evaluate the effect of Aflatoxin and Fumonisin in the reproductive performance of broiler breeder males, through specific diets. Sixty broiler breeder males Cobb 500, with approximately 22 weeks of age, were distributed in two experiments. Forty broiler breeder males were distributed in a completely randomized design that was constituted by 4 diets (4 Aflatoxin and Fumonisin levels). The animals were housed in 4 poultry houses (boxes) with 10 birds each (1 bird = 1 repetition). For these animals, were evaluated the spermatic vigor, spermatic morphology (alterations of acrosome, head, middle piece, tail piece and total anomalies) and relative testicular weight. In parallel, twenty broiler breeder males were housed with two hundred chickens Cobb 500 distributed in 20 poultry houses (boxes) containing 10 chickens and 1 broiler breeder male in a completely randomized design (4 Aflatoxin and Fumonisin levels and 5 repetitions), for this animals was evaluated the percentage of fertile eggs produced in relation to the different diets to which the broiler breeder males were submitted. The desired levels of mycotoxins were reached utilizing corn attacked by fungi, previously analyzed, and with fungal cultures containing Aflatoxin and Fumonisin. The experimental period consisted of 96 days, divided in a period 30 days of adaptation of the birds to the semen collection and 46 days for the data gathering. The treatments were compared to Tukey test. Significant differences among the treatments when spermatic vigor, spermatic morphology and relative testicular weight evaluated about animals used in the experiments were not verified. For the fertility analysis in eggs, the data showed inverse behavior to the expected one, showing better results for treatments levels 2 and 4 of added mycotoxins. As for this parameter, more conclusive results were not feasible, therefore results with the same significance were verified for treatments where mycotoxins levels were different. The results obtained in this research appointed that mycotoxins levels used did not affect fertility rates and semen characteristics as of for broiler breeder males Cobb 500.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos encontrados em diversos produtos e subprodutos agrícolas de importância no preparo de rações.....	18
Tabela 2 – Produtos onde Aflatoxinas são encontradas e seus efeitos em animais e humanos (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).....	22
Tabela 3 – Características físico-químicas das principais aflatoxinas.....	25
Tabela 4 – Produção de sêmen e concentração de espermatozóides para diversos tipos de aves <sup>1</sup> .....	39
Tabela 5 – Dietas experimentais com diferentes níveis de Aflatoxina e Fumonisina utilizados no período experimental.....	46
Tabela 6 – Análises bromatológicas e de classificação para os diferentes tipos de milho utilizados no experimento.....	48
Tabela 7 – Valores calculados do nível nutricional das dietas experimentais fornecidas às aves.....	50
Tabela 8 – Composição centesimal das rações utilizadas nos Experimentos 01 e 02.....	51
Tabela 9 – Composição bromatológica das rações utilizadas nos Experimentos 01 e 02.....	51
Tabela 10 – Vigor espermático avaliado como BOM e BAIXO de acordo com os diferentes tratamentos.....	63
Tabela 11 – Morfologia espermática (% médio de anomalias) verificada de acordo com os diferentes tratamentos para a primeira coleta.....	65
Tabela 12 – Morfologia espermática (% médio de anomalias) verificada de acordo com os diferentes tratamentos para a segunda coleta.....	65
Tabela 13 – Média de espermatozóides normais levantadas para cada tratamento, considerando-se as duas coletas.....	69
Tabela 14 – Dados gerados pelo Teste de Tukey com relação à Fertilidade em ovos.....	71
Tabela 15 – Médias dos pesos absoluto e relativo dos testículos para cada tratamento.....	72

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1: Fórmula estrutural química das principais aflatoxinas.....	24
Ilustração 2: Fórmula estrutural química das Fumonisina B <sub>1</sub> e Fumonisina B <sub>2</sub> ....	34
Ilustração 3: Fotografia - vista aérea do Centro Tecnológico Agropecuário.....	44
Ilustração 4: Fotografia - instalações do Aviário 1 do Centro Tecnológico agropecuário.....	45
Ilustração 5: Fotografia - aparência lote Milho 2.....	47
Ilustração 6: Fotografia - aparência lote Milho 1.....	48
Ilustração 7: Fotografia - coleta de sêmen pelo método de massagem dorsal....	55
Ilustração 8: Fotografia - a gema de um <i>ovo estéril</i> carrega um acúmulo de material branco em seu centro.....	57
Ilustração 9: Fotografia - o disco embrionário fertilizado se parece com um anel, iluminado ao centro, é nesta área que se inicia o crescimento embrionário.....	58
Ilustração 10: Fotografia - Aparência do primeiro crescimento no centro do blastoderme.....	58
Ilustração 11: Fotografia - Formação do sistema circulatório e identificação visual do desenvolvimento de tecido circulatório e nervoso.....	59
Ilustração 12: Fotografia - característica de amostra de sêmen analisadas em microscópio de contraste de fases, com aumento de 1000 vezes.....	68
Ilustração 13: Fotografia - Espermatozóide com defeito de “cabeça enrolada”, visualizado em microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000 vezes.....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Vigor espermático de acordo com os diferentes tratamentos.....	64
Gráfico 2 – Morfologia espermática avaliada durante a primeira e segunda coletas com relação aos diferentes tratamentos.....	65
Gráfico 3 – Dados comparativos de morfologia espermática entre primeira e segunda coletas realizadas.....	67
Gráfico 4 – Dados comparativos de peso de testículos absoluto e relativo entre os diferentes tratamentos.....	73

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
3.1 PROBLEMÁTICA.....	17
3.2 FUNGOS.....	18
<b>3.2.1 Fungos de campo.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2 Fungos de armazenamento.....</b>	<b>20</b>
3.3 MICOTOXINAS.....	21
3.4 AFLATOXINAS.....	23
<b>3.4.1 Ocorrência natural das Aflatoxinas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.2 Características físico-químicas das Aflatoxinas.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4.3 Micotoxicoses causadas por Aflatoxinas – Aflatoxicoses.....</b>	<b>26</b>
3.5 FUMONISINAS.....	28
<b>3.5.1 Ocorrência natural das Fumonisinas.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5.2 Micotoxicoses causadas por Fumonisinas.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5.3 Mecanismo de ação das Fumonisinas.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.4 Características Físico-Químicas das Fumonisinas.....</b>	<b>32</b>
3.6 FERTILIDADE EM AVES.....	34
<b>3.6.1 Características do espermatozóide e do sêmen de galo.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6.2 Avaliações de fertilidade em galos.....</b>	<b>40</b>
3.7 MILHO.....	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 LOCAL E PERÍODO.....	43
<b>4.1.1 Centro Tecnológico Agropecuário (CTA).....</b>	<b>43</b>
4.2 ANIMAIS.....	44
4.3 INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS.....	45
4.4 PARAMETROS AVALIADOS.....	46
4.5 TRATAMENTOS.....	46
<b>4.5.1 Dietas Experimentais.....</b>	<b>49</b>

4.6 AMOSTRAGEM PARA RAÇÕES E MILHO.....	52
4.7 PERÍODO PRÉ-EXPERIMENTAL.....	52
4.8 PERÍODO EXPERIMENTAL.....	53
4.9 ANÁLISE DE VIGOR ESPERMÁTICO.....	53
<b>4.9.1 Método massagem dorsal.....</b>	<b>54</b>
4.10 ANÁLISE DE MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	56
4.11 ANÁLISE DE FERTILIDADE EM OVOS.....	56
4.12 AVALIAÇÕES DE PESO DOS TESTÍCULOS.....	59
4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
<b>4.13.1 Experimento 01.....</b>	<b>60</b>
<b>4.13.2 Experimento 02.....</b>	<b>60</b>
4.14 ANÁLISE ESTADÍSTICA.....	60
<b>4.14.1 Teste Qui Quadrado.....</b>	<b>61</b>
<b>4.14.2 Teste de Tukey.....</b>	<b>61</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
5.1 VIGOR ESPERMÁTICO.....	63
5.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	65
5.3 ANÁLISE DE FERTILIDADE EM OVOS.....	70
5.4 PESO DOS TESTÍCULOS.....	72
<b>6 SUGESTÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
APÊNDICE A – Tabela de temperaturas (°c) máximas e mínimas registradas durante os dias em que correram os experimentos.....	88
APÊNDICE B – Dados coletados para análise de Vigor Espermático.....	89
APÊNDICE C – Dados coletados para análise de Morfologia Espermática.....	90
APÊNDICE D – Dados coletados para análise de Fertilidade em Ovos.....	93
APÊNDICE E – Dados coletados para a análise de Peso de testículos.....	105
ANEXO A – Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002.....	106
ANEXO B – Portaria nº 183, de 21 de março de 1996.....	109
ANEXO C – Portaria nº 11, de 12 de abril de 1996.....	113

## 1 INTRODUÇÃO

A fertilidade é uma das características de maior importância econômica em matrizes pesadas. Tem-se observado, entretanto, uma queda nesse parâmetro nos últimos anos que poderia ser atribuída à falta de atenção ao macho em relação à seleção no que se refere à fertilidade (CELEGHINI et al., 2001).

Segundo Burke (1996), o sêmen é uma mistura de células espermáticas e líquidos de transporte. Bongalhardo et al. (1994), estudando as características seminais, encontraram correlações entre características seminais de galos e fertilidade dos ovos.

As micotoxinas, metabólitos fúngicos secundários presentes numa grande parte de alimentos, além de provocarem grandes perdas econômicas para os produtores de cereais e processadores de alimentos, representam um sério risco para a saúde humana e animal. A microflora está estimada entre 200.000 e 300.000 espécies, tendo sido identificadas mais de 400 micotoxinas. A produção mundial anual de cereais excede os 160 kg *per capita*, com tendência para aumentar, mas estima-se que cerca de 10 a 30% dos grãos colhidos se percam ao serem afetados pelo desenvolvimento de fungos. A Organização Mundial de Saúde e a Organização para Alimentação e Agricultura (OMS/FAO, 1998) estima que, em todo o mundo, cerca de 25% das colheitas de alimentos estão afetadas por micotoxinas (CIRILLO et al., 2003).

As Fumonisinas são um grupo de metabólitos tóxicos produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, especialmente *Fusarium moniliforme* e *Fusarium proliferatum* (BEZUIDENHOUT et al., 1988; NELSON, 1992). Estas espécies são contaminantes naturais de cereais e são encontrados principalmente em milho e seus derivados (SHEPHARD et al., 1996). Muitas fumonisinas que ocorrem naturalmente são conhecidas, a Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) é o metabólito mais abundante e tóxico deste grupo de micotoxinas, representando 70% da quantidade total de fumonisina presente em alimentos e rações naturalmente contaminados, seguida pela Fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub>.

Aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos por algumas linhagens das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. Pertencem à classe de compostos denominados furanocumarinas

(ARAÚJO, 1995; HEATHCOTE, 1984). Foram identificadas pela primeira vez em 1961 em ração para animais, contaminada por *Aspergillus parasiticus* (SARGENT; SHERIDAN; OKELLY, 1961). De um modo geral, admite-se que *Aspergillus flavus* produz aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e *Aspergillus parasiticus* produz aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Essas toxinas diferem entre si por pequenas variações em sua composição e estrutura molecular (TOLEDO; FONSECA ; OETTERER, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dietas contendo diferentes níveis de micotoxinas (fumonisina e aflatoxina) sobre as características qualitativas (peso dos testículos, vigor e morfologia dos espermatozóides) e quantitativas (produção de ovos férteis) do sêmen de galos reprodutores de corte da linhagem Cobb 500.

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa foram traçados a partir da necessidade em serem conhecidos os efeitos isolados e combinados de diferentes micotoxinas nas dietas de galos reprodutores. Existe também, a necessidade em se prever estes efeitos considerando-se como condições experimentais, àquelas vivenciadas nos plantéis da Perdigão Agroindustrial S/A., buscando-se adequação as atuais condições de campo.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar diferentes doses de Aflatoxina e Fumonisina administrados via ração, em parâmetros associados à reprodutibilidade de galos da linhagem Cobb 500, repetindo as condições de campo aplicadas aos plantéis da Perdigão Agroindustrial S/A.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos citam-se:

a) Determinar as doses específicas de Aflatoxina e Fumonisina que administradas a fases específicas de desenvolvimento de galos da linhagem Cobb 500, geram prejuízos a parâmetros de reprodutibilidade.

b) Verificar quais são os parâmetros específicos de reprodutibilidade (morfologia e vigor espermáticos, peso de testículo e produção de ovos férteis) afetados quando da administração destas micotoxinas na alimentação dos galos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para que se possa avaliar o potencial de contaminação de micotoxinas associadas, no caso: Aflatoxina e Fumonisina com relação à influência na capacidade de reprodução de aves se faz necessário avaliar também separadamente os efeitos gerais já conhecidos que a presença destes contaminantes na alimentação animal podem trazer as aves. Bem como traçar um panorama geral sobre a ocorrência das mesmas em matérias-primas utilizadas para produção de rações. Outro item a ser analisado neste capítulo é a importância do estudo de parâmetros associados à reprodução de aves de corte na cadeia produtiva da indústria de carne.

#### 3.1 PROBLEMÁTICA

O Brasil é um dos maiores produtores de aves do mundo, sendo em consequência, um dos maiores produtores de rações. A presença de micotoxinas em grãos e rações, cujo tipo ou estrutura química depende do desenvolvimento de linhagens fúngicas específicas, está sujeita à influência de fatores ambientais como umidade do substrato e temperatura ambiente. Portanto, a contaminação de rações e outros alimentos por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais, métodos de processamento ou produção e armazenamento. Depende, também, do tipo de alimento, já que alguns grãos são substratos mais susceptíveis que outros para o crescimento de determinados fungos. Em um sistema com elevado grau de desenvolvimento tecnológico, tal como ocorre na avicultura de modo geral, qualquer fator que afete negativamente a produção, determina enormes prejuízos aos produtores. Neste contexto deve-se ressaltar a importância dos contaminantes naturais de rações, como as micotoxinas, as quais acarretam perdas consideráveis às criações de aves (SANTURIO, 2000).

Em nossas condições, diversas micotoxinas têm sido identificadas em alimentos destinados ao consumo humano e animal. Contudo, deve-se destacar a importância das aflatoxinas, não apenas pela ocorrência freqüente, mas também

pelo elevado potencial toxigênico demonstrado em aves de produção (FERNANDES, 2004).

### 3.2 FUNGOS

Os fungos toxigênicos podem contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento de grãos, desde o cultivo até o transporte e armazenagem. Os fatores que influenciam o crescimento dos fungos, também participam da biossíntese das micotoxinas, entre os quais se pode citar: umidade, temperatura, composição do substrato, presença de microbiota competitiva, além das características específicas de linhagem do fungo. O desenvolvimento dos fungos e a produção de micotoxinas requerem certas condições ambientais, entre elas:

- a) Umidade e água disponível, temperatura, zonas de microflora (pequenas zonas do alimento com alto conteúdo de umidade) e integridade física da semente do alimento. Com relação à água disponível, ou atividade de água ( $A_w$ ), esta indica a quantidade de água disponível para o desenvolvimento dos microorganismos, uma vez que se tenha alcançado o equilíbrio hídrico no sistema alimento/meio ambiente. A água pura tem uma atividade de água igual a um. Nos alimentos, a  $A_w$  será sempre inferior a um. A maior parte dos fungos que contaminam os cereais, por exemplo, necessitam de valores superiores a 0,7.
- b) Composição do substrato, pH, nutrientes minerais e disponibilidade de oxigênio.
- c) Presença de insetos e fungos específicos produtores de micotoxinas.

O tempo de sobrevivência desses fungos nas sementes está diretamente relacionado com as condições de ambiente do campo e armazém (LÁZZARI, 1993a).

Na tabela 1, encontramos relacionadas algumas famílias de fungos, os produtos onde as mesmas se desenvolvem e as faixas de umidade necessárias para seu desenvolvimento.

Tabela 1 – Fungos encontrados em diversos produtos e subprodutos agrícolas de importância no preparo de rações.

Fungos	Soja, Farelo de Soja	Sorgo, Milho, Trigo, Cevada	Coco, Amendoim, Farelo de Amendoim
<i>Aspergillus spp.</i>			
<i>A. restrictus</i>	12,0 - 12,5	12,5 – 13,5	6,0 – 6,5
<i>A. glaucus</i>	13,0 – 13,5	14,5 – 15,0	6,0 – 6,5
<i>A. candidus</i>	14,5 – 15,0	15,0 – 15,5	7,0 – 7,5
<i>A. ochraceus</i>	14,5 – 15,0	15,0 – 15,5	7,0 – 7,5
<i>A. flavus</i>	17,0 – 17,5	18,0 – 18,5	8,5 – 9,5
<i>Penicillium spp.</i>	17,0 – 17,5	18,0 – 18,5	10,0 – 12,0
<i>Bactérias, leveduras e outros fungos</i>	> 17,5	> 19,0	15 – 16,0
<i>Fusarium spp.</i>	-	22,0 – 25,0	-

Fonte: LÁZZARI (1993a).

### 3.2.1 Fungos de Campo

Há uma enormidade de fungos de campo, sendo os mais representativos a *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*, que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. A microflora fúngica é variável em função da espécie vegetal, localização geográfica e condições climáticas. Os fungos de campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90% ou mais para crescerem (LÁZZARI, 1993a).

Esses fungos podem descolorir e causar enrugamento das sementes, enfraquecer ou matar o embrião, bem como causar doenças nas plantas de tais sementes. Eles podem afetar a qualidade de grãos para vários usos. Os danos resultantes da invasão de fungos causados antes da colheita podem ser detectados por análise de rotina de inspeção. Eles não continuam crescendo na armazenagem. Contudo esporos podem sobreviver por vários anos no grão seco (LORINI et. al, 2002).

Segundo LAZZARI (1993b), 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. A separação entre

fungos de campo e de armazenamento não é absoluta, mas os de campo mantêm-se claramente distintos daqueles de armazenamento pelos seus hábitos de crescimento e danos que causam antes da colheita.

Dentre os fungos de campo veiculados pelas sementes de milho, no Brasil, *Fusarium moniliforme* é o mais freqüente (REIS et al., 1995; PEIXOTO et al., 1998; GOULART & FIALHO, 1999). Vários outros fungos, podendo-se citar *Bipolaris maydis*, *Cephalosporium acremonium*, *Colletotrichum graminicola*, *Curvularia* spp., *Diplodia maydis*, *Drechslera* spp., *Epicoccum* spp., *Nigrospora oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Trichoderma* spp., também são comumente detectados em associação com as sementes de milho.

### 3.2.2 Fungos de armazenamento

Os fungos de armazenamento, por sua vez, estão presentes nas sementes recém-colhidas, geralmente em porcentagens muito baixas. São capazes de sobreviver em ambiente com baixa umidade, proliferando em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes (BERJAK, 1987a; WETZEL, 1987; CARVALHO & NAKAGAWA, 1988).

Os fungos de armazenagem compreendem cerca de 10 a 15 grupos de espécies *Aspergillus*, dos quais somente cinco ou seis são conhecidos como de deterioração e várias espécies de *Penicillium*. Invadem os grãos e ocorrem normalmente durante o armazenamento. Não invadem de forma intensa os grãos antes da colheita. Algumas espécies de *Penicillium* são fungos de campo, outros de armazenagem. São encontrados em grande número no ar, poeira, solo, nos resíduos de grãos. São encontrados normalmente na película de grãos e sementes sob forma de esporos e irão se desenvolver tão logo estejam em condições adequadas de umidade e temperatura. Todos os fungos de armazenagem têm habilidade de crescer em materiais onde a umidade está em equilíbrio com umidade relativa entre 70 e 90% (LORINI et. al, 2002).

Para o milho essa umidade corresponde a 13-20%. Sementes e grãos, como tantos outros materiais biológicos, são variáveis. Deferentes lotes da mesma

variedade, quando submetidos à mesma umidade relativa atingem o equilíbrio em diferentes teores de umidade.

Os maiores efeitos do desenvolvimento fúngico em grãos e sementes armazenados são: deterioração de sementes e grãos, descoloração, perda do poder germinativo, perda de matéria seca, produção de micotoxinas e alteração do valor nutricional (LÁZZARI, 1993c).

Em nossas condições tropicais e subtropicais o teor de umidade é o mais importante fator no desenvolvimento dos fungos de armazenamento. A temperatura se encontra em níveis favoráveis ao desenvolvimento de fungos quase o ano todo. A refrigeração de silos e armazéns graneleiros ainda é bastante cara. O mais utilizado é o controle de umidade dos grãos e aeração dos silos, da maneira mais eficaz possível.

Alguns fungos necessitam pouca água para viver. Quando a umidade relativa do ar for de 70 a 75%, a maioria dos materiais irá absorver água em poucas horas ou dias, permitindo o crescimento dos fungos de armazenamento. Se grãos e sementes de qualquer tipo contiverem, quando armazenadas, água suficiente para manter uma umidade relativa de 75% nos espaços intergranulares, os fungos irão crescer internamente e externamente nas sementes ou grãos. Para uma armazenagem segura, os grãos ou sementes precisam ter um teor de umidade baixo o suficiente para que a umidade relativa do ar intergranular fique abaixo de 70%. Para uma armazenagem em longo prazo é recomendável uma umidade relativa intergranular de 65% (LÁZZARI, 1993a).

### 3.3 MICOTOXINAS

A micotoxicologia moderna começou com a descoberta das Aflatoxinas, no início da década de 1960. Contudo, doenças como o ergotismo era conhecido desde a Idade Média. Atualmente, são conhecidos milhares de metabólitos fúngicos.

Micotoxinas são causadoras de doenças em humanos e animais e a patogenia de muitos dos fungos produtores de micotoxinas, são focos de discussão a respeito de segurança alimentar e impactam fortemente o mercado de grãos e de alimentos para humanos e animais. A principal classe de micotoxinas inclui as

Aflatoxinas, Tricotecenos, Fumonisinias, Zearalenona, Ocratoxina A e os Alcalóides de Ergot. Toxinas produzidas pelo gênero *Stachybotrys* também são candidatas potenciais a inclusão na lista das principais micotoxinas, pois são hoje consideradas por muitos como sendo responsáveis por problemas de qualidade do ar em todo o mundo.

A maioria das micotoxinas conhecidas é produzida por três gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os principais fungos produtores de micotoxinas não são agentes patógenos agressivos a plantas, mas muitas micotoxinas são produzidas por muitas espécies e gêneros de fungos ainda durante o crescimento destas culturas, quando as condições são apropriadas (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

### 3.4 AFLATOXINAS

A possível existência de aflatoxinas nos alimentos, substâncias altamente tóxicas e carcinogênicas para o homem e animais, tem levado nos últimos anos há uma intensa investigação no sentido de detectá-las e prevenir seu desenvolvimento (AMADO, 1999).

*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são fungos de grande importância na agricultura, por contaminar várias culturas e produzirem aflatoxinas, tanto na pré como pós-colheita (STEINHART; DOYLE; COCHRANE; 1996). Dentre as aflatoxinas, destacam-se B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, que são bem conhecidas e estudadas do ponto de vista toxicológico (SHARMA & SALUNKE, 1991).

Aflatoxinas são assim denominadas: devido ao fungo produtor: **A** – de *Aspergillus*-, **fla** – de *flavus* – seguido do sufixo: **toxina**)

A tabela 2 relaciona os produtos de alimentação humana e produtos utilizados em rações animais que podem ser contaminados pelas diferentes espécies de aflatoxinas, bem como as espécies por elas afetadas e os efeitos patológicos relacionados.

Tabela 2 – Produtos onde Aflatoxinas são encontradas e seus efeitos em animais e humanos (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

Micotoxina	Produtos que podem ser contaminados	Efeitos das Micotoxinas	
		Espécies Afetadas	Efeitos Patológicos
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> )	Amendoim, milho, trigo, arroz, semente de algodão, polpa de côco, nozes	Aves:  Patos jovens, Perus, Pintinhos, Faisão jovem, Frangos de corte	Hepatotoxicidade (danos no fígado), Bile – hiperplasia do duto  Hemorragias:  Trato intestinal, Rins
	Vários alimentos: leite, ovos, queijo, figo	Mamíferos:  Suínos jovens, Suínos em fase de gestação, Cães, Vitela, Bovinos, Carneiros, Macacos, Humanos  Peixes:  Animais de laboratório	Carcinogênese (tumor no fígado)

Fonte: LÁZZARI (1993a).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde estabelece o limite de 30 µg/kg AFB<sub>1</sub>+AFG<sub>1</sub> em alimentos de consumo humano (anexo A), e o Ministério da Agricultura, [Pecuária](#) e Abastecimento estabelece o de 20 µg/kg de aflatoxinas totais para matérias-primas de alimentos e rações (anexo B). Este limite é similar aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial de Saúde e a Organização para Alimentação e Agricultura (OMS/FAO).

As primeiras aflatoxinas estudadas foram designadas com o nome de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, respectivamente, devido à sua fluorescência azul (do inglês blue) ou verde (green), em placas de cromatografia de camada delgada. Posteriormente, se descobriram aflatoxinas secundárias e toxinas diferentes nas espécies mencionadas e em outras espécies (HERRERA; ULLOA, 1990).

### 3.4.1 Ocorrência natural das Aflatoxinas

Verifica-se maior ocorrência de aflatoxinas em produto vegetal oriundo de debulha manual, ensacado e armazenado com uma umidade elevada e quando se reumedece o produto depois de seco. Essa toxina pode ser encontrada em muitos produtos, tais como: amendoim, milho, sementes oleaginosas, nozes, trigo, feijão etc. Estudos sobre a ocorrência de aflatoxinas em diversos produtos mostram que o amendoim, o milho e a semente de algodão são os mais suscetíveis à contaminação (FONSECA 1984; JELINEK 1988).

Os fungos produtores dessas toxinas estão presentes no solo possibilitando a invasão durante a fase de pré-colheita dos grãos. As toxinas podem ser produzidas no campo, durante o armazenamento e no processamento. São altamente resistentes ao calor, e sua inativação varia de 237°C a 285°C. São instáveis na presença de agentes oxidantes e em condições extremas de pH (ARAÚJO 1995).

A presença e a magnitude da contaminação dos alimentos por aflatoxinas variam em função de fatores geográficos e estacionais e também das condições em que se cultiva, colhe e armazena os produtos agrícolas. Os cultivos em zonas tropicais e subtropicais são mais propensos à contaminação do que em regiões temperadas, pois as condições ótimas para a produção de toxinas imperam nas zonas de umidade e temperaturas elevadas. Os fungos toxigênicos podem infectar os cultivos em crescimento, em consequência de danos causados por insetos e outros agentes e produzir toxinas antes da colheita ou durante esta e após o seu armazenamento (ORGANISACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1983).

Uma característica importante da aflatoxina é a sua capacidade de se concentrar, isto é, seus níveis vão se acumulando ao longo da cadeia produtiva, uma vez que, são moléculas altamente estáveis em diferentes meios bióticos e abióticos (QUEZADA et al.,2000).

### **3.4.2 Características Físico-Químicas das Aflatoxinas**

Atualmente, mais de 20 tipos de moléculas de aflatoxinas e seus derivados isolados, são conhecidas. Porém, os principais tipos estudados continuam sendo a

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, estas micotoxinas ocorrem naturalmente (HUSSEIN & BRASEL, 2001). Outras aflatoxinas, como a M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, aflatoxicol, etc. ocorrem como metabólitos de sistemas biológicos ou animais (SMITH & ROSS, 1991) e não são abordadas como foco do presente trabalho.

A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, dado que são compostos químicos simples e de baixo peso molecular, sendo que todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide conforme se observa na ilustração 1. As aflatoxinas B apresentam anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona.

As aflatoxinas assim como outros compostos hetrocíclicos são substâncias fluorescentes com características próprias. Tanto a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) como a aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) apresentam uma fluorescência azul, enquanto que a aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e a aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) apresentam uma fluorescência verde-amarelada sob luz ultravioleta (Sargeant, 1963 apud HUSSEIN & BRASEL, 2001).

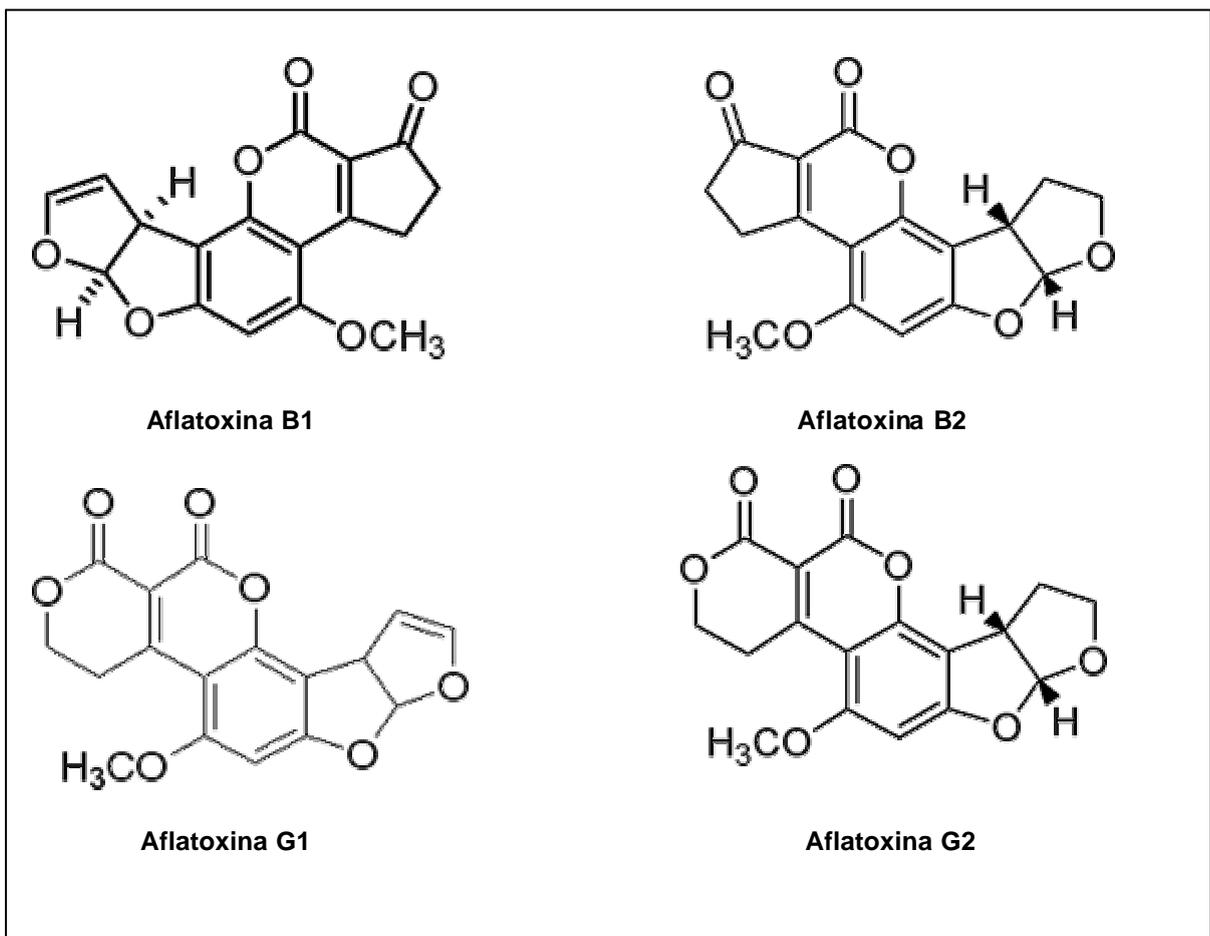


Ilustração 1: Fórmula estrutural química das principais aflatoxinas.

Fonte: *Homepage* Sigmaaldrich.

Apesar das semelhanças estruturais, as aflatoxinas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB<sub>1</sub>, além de ser a mais freqüentemente encontrada nos cereais, é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida das aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> (COULOMBE et al., 1991). A aflatoxina B<sub>1</sub> é a mais tóxica, tanto nos casos de aflatoxicose aguda como na crônica, Terao e Ueno (1978) demonstraram que a magnitude da toxidez da AFG<sub>2</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>1</sub> correspondem a 10, 20 e 50% da AFB<sub>1</sub>, respectivamente.

Podemos classificar as aflatoxinas como compostos de natureza cristalina, termoestáveis e solúveis em solventes polares, como clorofórmio e metanol. Podem ser destruídas totalmente na presença de soluções fortemente alcalinas, como a amônia e o hipoclorito (OPAS, 1983). A tabela 3 apresenta as principais características físico-químicas das aflatoxinas de maior importância em saúde humana e animal.

Tabela 3 – Características físico-químicas das principais aflatoxinas.

AFL	Fórmula Química	Massa Molecular	Temperatura de Fusão (°C)	Emissão de Fluorescência Nanômetros (nm) E Cor*
AFB <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	269	425-azul
AFB <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	425-azul
AFG <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	450-verde
AFG <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240	450-verde
AFM <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299	425-violeta azulada
AFM <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293	425-violeta
Aflatoxicol	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	230-234	425

\*Sob luz ultravioleta

Fonte: ORGANISACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (1983).

A desnaturação das aflatoxinas ocorre na faixa de temperatura entre 237-306°C, variando de acordo com a atividade de água, pH do substrato e tempo de exposição ao calor. Por outro lado, os raios ultravioleta da luz do sol são muito eficazes na desativação das moléculas de aflatoxina. Não há um método totalmente eficaz para a inativação das aflatoxinas, sendo que eficiência de cada processo depende do tipo de alimento a ser descontaminado, sua atividade de água, os tipos

de aflatoxina nele presentes, o nível de contaminação e o grau de associação em que as aflatoxinas estão ligadas aos constituintes do alimento, principalmente às proteínas (RUSTOM, 1997).

Quando citado o teor de aflatoxina utilizado para este trabalho, considera-se o somatório de AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>1</sub>.

### 3.4.3 Micotoxicoses causadas por Aflatoxinas – Aflatoxicoses

Micotoxicose é o termo utilizado para definir qualquer enfermidade causada aos homens e animais pela exposição às micotoxinas. Os quadros tóxicos variam de acordo com a micotoxina, seu efeito dose-dependente, espécie animal e até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie. A micotoxicose é caracterizada por estar relacionada à alimentação, não é contagiosa, não é infecciosa e é sempre causada pelas toxinas produzidas por fungos (HUSSEIN & BRASEL, 2001). As micotoxicoses são caracterizadas por síndromes difusas, porém, com predomínio de lesões em determinados órgãos, como fígado, rins, tecido epitelial e sistema nervoso central, dependendo do tipo de toxina. Existe, também, a possibilidade de ocorrência simultânea de duas ou mais micotoxinas, o que pode conduzir à potencialização de seus efeitos tóxicos sobre o organismo susceptível (FERNANDES, 2004).

O mais conhecido episódio de micotoxicose ocorreu em 1960, na Inglaterra, quando a torta de amendoim importada do Brasil foi responsabilizada como causadora da “Doença X dos perus”. Desta torta, foi obtido um extrato clorofórmico que, ao ser administrado a marrecos jovens, foi capaz de reproduzir as lesões hepáticas semelhantes à doença original, sendo a toxina denominada de *Aspergillus flavus* toxin ou aflatoxina (ALLCROFT et al., 1961; ALLCROFT & CARNAGHAM, 1962).

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas são dependentes da dose e do tempo de exposição, determinando assim, intoxicações agudas ou crônicas. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com alta concentração de aflatoxina, sendo os efeitos observados em curto espaço de tempo. Caracteriza-se principalmente pela rápida deterioração do estado geral do animal, perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILER, 1990).

Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). Ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com baixos níveis de aflatoxinas por um longo período de tempo, podendo a exposição ao contaminante ser contínua ou intermitente. Esta patologia é de difícil diagnóstico, apesar de constituir a principal forma de intoxicação em condições naturais, verificadas em campo (PIER, 1992), como no presente trabalho.

Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança é alteração no tamanho dos órgãos internos. Ocorre aumento de tamanho no fígado, baço e rins e diminuição da bursa e timo. Também ocorrem alterações na coloração e textura dos órgãos. Por exemplo, o fígado de aves com aflatoxicose tem como característica a coloração amarelada e friável, com acentuada infiltração de gordura. Na aflatoxicose não ocorrem erosões na moela, apesar de muitas aves com lesões características dessa micotoxicose também apresentarem esse tipo de alteração. Isso parece um paradoxo, mas, de acordo com Wyatt (1991), cerca de 36% das linhagens de *Aspergillus flavus*, além de produzirem aflatoxinas, também produzem uma outra micotoxina, o ácido ciclopiazônico (CPA), responsável por erosões na mucosa da moela.

Observa-se, ainda, em frangos e poedeiras que receberam aflatoxinas, extrema palidez das mucosas e pernas. Essa pigmentação deficiente parece ser resultado da menor absorção, diminuição no transporte e diminuição tecidual dos carotenóides da dieta (TYCZKOWSKI & HAMILTON, 1987; LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

Na avicultura industrial, rações contaminadas mesmo com doses inferiores a 75 µg/kg de aflatoxina provocam reduções de até 10% no peso das aves (LAZZARI, 1993a).

Qureshi et al. (1998), verificaram que expondo poedeiras a níveis de 0,2 a 10 mg/kg de aflatoxina, foram verificadas mortalidade embrionária e redução da eclodibilidade dos ovos, verificaram ainda que para as aves que consumiram 5 e 10 mg/kg de aflatoxina os efeitos eram maiores quanto maior o tempo de exposição à toxina. Este efeito é devido à transferência de metabólitos da aflatoxina ou a própria toxina ao ovo, causando alterações imunes ao embrião.

Briggs et al. (1974), estudaram o efeito de dieta contendo aflatoxinas em 20 mg/kg, durante 4 semanas, sobre parâmetros de contagem de espermatozoides, volume de sêmen, análise de ácido desoxiribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) e teor de proteínas em amostras de sêmen de 20 galos da linhagem Cobb Vantress. Para nenhum dos parâmetros estudados foram verificadas alterações significativas em parâmetros reprodutivos de acordo com o tratamento.

O estudo citado acima foi o único encontrado na literatura consultada que faz menção a efeito de aflatoxinas em parâmetros reprodutivos de galos. Apesar da similaridade com a micotoxina estudada (aflatoxina), verifica-se ainda a necessidade em avaliar doses similares às encontradas atualmente no já desenvolvido setor agropecuário.

### 3.5 FUMONISINAS

Em decorrência dos grandes esforços da comunidade científica internacional, desde 1960 a micotoxicologia tem sido desenvolvida e novas micotoxinas têm sido isoladas e caracterizadas, especialmente as fusariotoxinas, micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, dentre as quais se destacam as fumonisinas, que assim como as aflatoxinas, podem ser consideradas de ocorrência mundial.

As fumonisinas compreendem o mais recente grupo de micotoxinas descoberto. Desde seu isolamento em 1988, têm sido associadas a doenças animais previamente conhecidas como a leucoencefalomalácia equina e edema pulmonar suíno (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

As fumonisinas são produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*. O principal produtor é o *Fusarium moniliforme* (SHEPHARD et al., 1992), porém outras espécies de *Fusarium* também são produtoras, como *F. proliferatum* (ROSS; NELSON; RICHARD, 1990), *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. napiforme* (NELSON, 1992). Entretanto, fungos do gênero *Alternaria* spp. Também podem produzir fumonisinas (CHEN et al., 1992).

As espécies do gênero *Fusarium* são citadas por MILLS (1989) como as principais invasoras de grãos de milho no campo, causando inclusive várias doenças, como a podridão de sementes e colmo. O pesquisador alerta que estas

espécies, que invadem a planta no campo, também podem ser encontradas no armazenamento, caso as condições de temperatura e umidade sejam adequadas. O *Fusarium verticillioides* é o fungo mais freqüente em grãos de milho recém colhidos, com níveis de contaminação de até 100%. No Brasil, algumas espécies do gênero *Fusarium* já foram isoladas do milho e outros substratos procedentes de vários estados brasileiros, com predominância do *F. verticillioides* (ASEVEDO et al., 1994; POZZI; CORRÊA; GAMNALE, 1995; ORSI; CORRÊA; POZZI, 2000; SILVA et al., 2001).

São conhecidas, atualmente, 16 estruturas moleculares designadas pelo termo fumonisina, são elas: Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, AK<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, PH<sub>1a</sub>, PH<sub>1b</sub> (MUSSER & PLATTNER, 1997; AH-SEO & WON LEE, 1999), porém a toxina predominante produzida por linhagens de *F. moniliforme* é a fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) (NORRED, 1993). Somente a FB<sub>1</sub>, além das fumonisinas B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>), foram detectadas quando a produção de fumonisinas ocorreu em condições naturais (HENRY & WYATT, 1994).

As fumonisinas FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> são as mais isoladas em alimentos naturalmente contaminados, sendo que a FB<sub>1</sub> é quase sempre a mais abundante, representando cerca de 70% da concentração total das fumonisinas detectadas (SYDENHAM; GELDERBLOM; THIEL, 1991; THIEL; SHEPARD; SYDENHAM, 1991).

Quando citado o teor de fumonisina utilizado para este trabalho, considera-se o somatório de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>.

### 3.5.1 Ocorrência Natural das Fumonisinas

O gênero *Fusarium* tem ampla distribuição mundial e é encontrado tanto no solo quanto na superfície de plantas. Assim como acontece com os fungos do gênero *Aspergillus*, a contaminação de grãos e cereais pode ocorrer ainda no campo, ou durante o armazenamento. O fungo desenvolve-se bem no milho em condições naturais, onde, devido à dificuldade da colheita no estágio correto de maturação da planta e ao alto teor de umidade de armazenamento, encontra condições ideais para a produção das toxinas (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

As fumonisinas foram detectadas naturalmente em vários tipos de alimentos, em vários países (Canadá, Egito, Peru, África do Sul, EUA), indicando a exposição do homem às micotoxinas em até 3 mg/kg (SYDENHAM; GELDERBLOM; THIEL, 1991). Nos Estados Unidos, Rottinghaus et al. (1992) encontraram concentrações de FB<sub>1</sub> entre 0,1 a 5,0 mg/kg em 15% das amostras de milho analisadas. Em outro trabalho, amostras de farelo de milho provenientes da mesma região produtora, os níveis detectados foram de até 2,8 mg/kg (HOLCOMB; SUTHERLAND; CHIARELLI, 1993).

Devido à predominância de regiões de clima tropical e subtropical, têm-se verificado no Brasil grande incidência desta micotoxina, em níveis de contaminação bastante acentuados. Porém, ainda não existe legislação específica que determine o nível de contaminação considerado seguro para alimentos destinados a consumo humano e animal.

Yamaguchi; Hirooka; Shibata (1992) analisaram 39 lotes de milho colhidos na safra de 1990 e 1991, provenientes de quatro regiões produtoras no Estado do Paraná. A análise de fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi positiva em 97,4% das amostras para FB<sub>1</sub> e 4,8% para FB<sub>2</sub>. As concentrações das micotoxinas detectadas no milho variaram, conforme a região, de 0,6 a 12,6 mg/kg para FB<sub>1</sub> e 0,0 a 10,4 mg/kg para FB<sub>2</sub>.

Hirooka; Yamaguchi; Aoyama (1996) analisaram quarenta e oito amostras de milho no Estado do Paraná e nove no Mato Grosso do Sul e Goiás, colhidas entre 1990 e 1991. Os pesquisadores detectaram fumonisinas em todas as amostras colhidas no Paraná, com níveis que variavam, de acordo com a região, de 3,25 a 4,79 mg/kg de FB<sub>1</sub> e 2,34 a 3,45 mg/kg para FB<sub>2</sub>. Com exceção de uma amostra proveniente do Estado de Goiás, as outras provenientes da região Central do Brasil também estavam contaminadas com FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> (5,45 e 5,0 mg/kg, respectivamente).

Mallmann, Santurio; Dilkin (1997) analisaram 169 amostras de alimentos entre os anos de 1996 e 1997 no estado do Rio Grande do Sul, verificando contaminação por fumonisinas em 47,1% das amostras de milho, com concentração média de 8,4 mg/kg.

Orsi, Correa e Pozzi (2000) mostraram a ocorrência natural de fumonisinas em 195 amostras de híbridos de milho no Estado de São Paulo, sendo 90,2% delas positivas para FB<sub>1</sub> e 97,4% para FB<sub>2</sub>. Os índices médios de contaminação foram de 9,72 mg/kg de FB<sub>1</sub> e 7,67 mg/kg de FB<sub>2</sub>. Diferenças regionais na concentração de

fumonisinina foram encontradas quando o mesmo milho híbrido foi analisado no Estado do Paraná, indicando interferências climáticas na predominância de linhagens toxigênicas de *Fusarium* (ONO; ONO; FUNO, 2001).

### 3.5.2 Micotoxicoses causadas por Fumonisininas

Os fungos filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas além de compostos tóxicos, denominados de micotoxinas. Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (MOSS, 1991).

A primeira descrição sobre a ocorrência natural de FB<sub>1</sub> foi realizada por Sydenham; Gelderblom; Thiel (1990) a partir de milho mofado colhido de uma área em Transkei, Sul da África, que apresentava alta incidência de câncer de esôfago em humanos. Os níveis detectados nas amostras variavam de 44 a 83 mg/kg. O milho proveniente de algumas regiões da África, com histórico da doença, apresentou altos níveis de contaminação (117 mg/kg), segundo análises realizadas por Thiel; Sydenham; Sydenham (1992).

Estudos feitos com hepatócitos de roedores têm demonstrado que as fumonisininas bloqueiam a formação de esfingolipídios. Esta evidência corrobora a hipótese de que a interrupção da formação de esfingolipídios, com conseqüente acúmulo de esfinganina e esfingosina constitui o mecanismo pelo qual se manifestam os efeitos de toxicidade aguda e carcinogenicidade das fumonisininas (NORRED, 1993).

Estudos sobre os efeitos tóxicos das fumonisininas em aves foram conduzidos utilizando material de cultura de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenb. como fonte de contaminação. Ledoux; Brown; Weibking (1992) alimentaram pintinhos de um dia com dietas contendo níveis de 0, 100, 200, 300 ou 400 mg/kg de FB<sub>1</sub>, durante 21 dias. O ganho diário de peso diminuiu com o aumento do nível de FB<sub>1</sub> na dieta. Lesões histopatológicas indicaram atrofia do timo, hiperplasia biliar e necrose hepática.

Henry & Wyatt (1994) estudaram a toxicidade da fumonisina B<sub>1</sub> purificada em frangos em crescimento. A toxina foi incorporada na dieta de pintinhos de 1 dia nas concentrações de 0, 20, 40 e 80 mg/kg. Níveis de até 80 mg/kg não alteraram o ganho de peso, conversão alimentar e consumo de água. Nenhuma diferença quanto ao peso dos órgãos (fígado, baço e rins) foi observada. Os autores concluíram que dietas com níveis de até 80 mg/kg não alteram o desempenho de frangos. Entretanto, os autores salientam a necessidade de pesquisas sobre a interação das fumonisinas com outras micotoxinas.

Efeitos de dietas contendo fumonisina na fertilidade de galos foram dados não encontrados na literatura consultada, motivo pelo qual se objetivou o estudo das mesmas a níveis verificados em campo, no presente estudo.

### **3.5.3 Mecanismo de ação das Fumonisinias**

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não é perfeitamente conhecido, mas Wang, et al. (1991), propuseram que a FB<sub>1</sub> poderia intervir na biossíntese de esfingolípídios ou “turnover” de esfingosina, porque existe uma similaridade da molécula de FB<sub>1</sub> com o complexo amino álcool esfingosina, que é um dos trinta ou mais aminoalcoois de cadeia longa encontrados nos esfingolípídeos de várias espécies. Os esfingolípídios são complexos importantes para a manutenção da integridade da membrana celular, além de regulação de receptores de superfície celular, bombas de íons e outros sistemas vitais para o funcionamento e sobrevivência da célula (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995). A inibição de biossíntese dos esfingolípídeos pode ter um profundo efeito sobre a célula, uma vez que esses componentes têm papel importante na estrutura da membrana, comunicação celular, interação intracelular e matrix celular, regulação de fatores de crescimento, como mensageiro de vários fatores, incluindo fator de necrose de tumor, interleucina 1 e fator de crescimento de nervos (MERRILL et al., 1993).

### 3.5.4 Características Físico-Químicas das Fumonisinias

As fumonisinias são metabólitos fúngicos secundários produzidos por *Fusarium verticillioides* (GELDERBLOM; JASKIEWICZ; MARASAS, 1988; BEZUIDENHOUT et al., 1988). Porém, outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinias: *Fusarium proliferatum* (ROSS; NELSON; RICHARD, 1990), *Fusarium nygamai* (THIEL; SHEPHARD; SYDENHAM, 1992), *Fusarium anthophilum*, *Fusarium dlamini* e *Fusarium napiforme* (NELSON, 1992), *Fusarium subglutinans* (SCOTT, 1993), *Fusarium polyphialidicum* (ABBAS & OCAMB, 1995), *Fusarium oxysporum* (AH SEO & WON LEE, 1999).

Sendo já citadas as dezesseis fórmulas estruturais de fumonisinias isoladas e caracterizadas, Bezuidenhout et al., (1988) cita que as análises de ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa revelam que a fumonisinina B<sub>1</sub> é um diéster de propano 1, 2, 3 - ácido tricarbóxico e 2 - amino - 12, 16 dimetil - 3, 5, 10, 14, 15 - pentahidroxicosano em que nos C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub> os grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2, 3 - ácido tricarbóxico.

As fumonisinias chamadas de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram isoladas de cepa *F. verticillioides* causadora de leucoencefalomalácia eqüina por Gelderblom; Jaskiewicz; Marasas (1988). As estruturas químicas das moléculas foram elucidadas por Bezuidenhout et al. (1988). As fumonisinias B<sub>3</sub> e B<sub>4</sub>, bem como os seus produtos de hidrólise (série "HB"), foram caracterizadas por Cawood et al. (1991), as fumonisinias da série "A" por Bezuidenhout et al. (1988) e da série "C" por Branham & Plattner (1993).

As fumonisinias são moléculas fortemente polares, solúveis em água e em acetoneitrila-água e insolúveis em solventes orgânicos. A hidrólise das fumonisinias, através do aquecimento com ácido hidrocloreico 6 M ou hidróxido de potássio 0,05 e 2 M produz ácido tricarbóxico e o aminopoliol correspondente (SCOTT, 1993).

A fumonisinina B<sub>1</sub> e a fumonisinina B<sub>2</sub> possuem cadeia carbônica larga (ver ilustração 2), de estrutura parecida a dos esfingolípidos, esfingosina e esfinganina, por isto também, considera-se que as mesmas tenham um papel em sua toxicidade (WANG et al., 1992; MERRILL et al., 1993; RAMASAMY et al., 1995). A estrutura química da fumonisinina B<sub>1</sub> corresponde a um diéster - 2 - amino, 12,16 dimetil,

pentahidroxi-icosano, onde os grupos hidroxila dos carbonos em posição 14 e 15 estão esterificados com o ácido propano tricarboxílico.

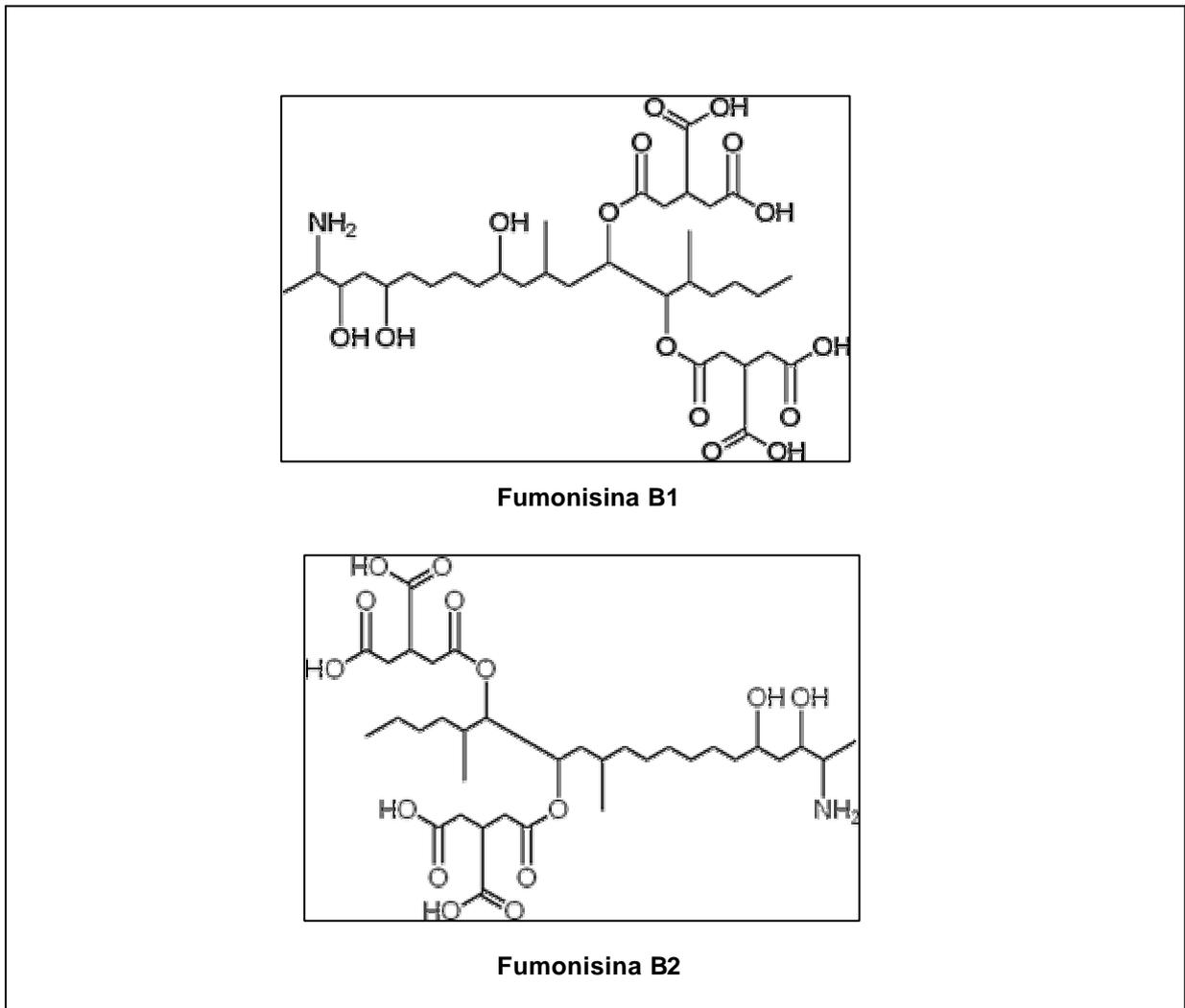


Ilustração 2: Fórmula estrutural química das Fumonisina B<sub>1</sub> e Fumonisina B<sub>2</sub>.  
Fonte: *Homepage* Sigmaaldrich.

### 3.6 FERTILIDADE EM AVES

Nos últimos vinte anos, a indústria avícola nacional teve um desenvolvimento extraordinário, com altos índices de produtividade, numa associação entre genética, nutrição, manejo, sanidade e ambiência (BORDIN et al., 2002).

Este crescimento é atribuído à eficiência de produção de carne de frango a

custos mais competitivos. As linhagens de conformação avícolas destinadas à produção de carne são, prioritariamente, selecionadas para ganho de peso. Frangos de corte assim desenvolvidos apresentam durante seu crescimento, característica típica de melhor rendimento de carcaça, melhor conversão alimentar e melhor conformação - fatores importantes para a rentabilidade das indústrias.

Os princípios básicos de manejo de reprodutores machos de frangos de corte são, em muitas formas, similares aos das fêmeas, mas existem diferenças específicas nos programas de nutrição e de alimentação (BRAKE, 1999). Os machos são selecionados levando-se em conta mais especificamente a conversão alimentar do que quando são selecionadas as fêmeas. Eles consomem o alimento mais lentamente que as fêmeas durante as primeiras quatro a cinco semanas de vida, após esta etapa, segue-se rápido aumento no consumo de alimentos, acompanhados por elevada taxa de ganho do peso.

Sabe-se também, que o manejo nutricional da matriz tem recebido maior ênfase, enquanto a nutrição do galo tem sido relegada ao segundo plano. Apesar de a proporção de machos representar apenas 10% em relação à das fêmeas, os machos contribuem com 50% da carga genética e são fundamentais para a fertilidade em um plantel (DANIKOWSKI et al., 2002).

A avaliação de fertilidade em machos é de grande importância na área da avicultura, a fim de garantir melhor produção de ovos férteis.

Em breve estatística e utilizando-se a proporção de 1 galo para a inseminação de 10 galinhas: estas produzindo uma média de 180 ovos/ciclo (matriz pesada), cada galo seria responsável pela fertilização de aproximadamente 1.800 ovos. Considerando uma eclodibilidade de 85%, seria observada uma produção de aproximadamente 1.500 pintos/galo. Alterações de 1% na fertilidade poderiam provocar uma diferença de aproximadamente 15 pintos/galo (COTTA, 2002).

As técnicas para avaliação de fertilidade em galos não são ainda muito exploradas, na maioria das vezes, a avaliação é feita por amostragem e leva em consideração, fatores morfofisiológicos do espermatozóide, o que também foi explorado no presente trabalho.

Para diagnóstico da fertilidade em galos, geralmente explora-se os parâmetros fisiológicos como: peso corporal, peso testicular, dieta alimentar e idade da ave e também características fenotípicas (tamanho de crista e barbela, aspecto da cloaca), relacionando estes fatores a virilidade do animal. Fatores

morfofisiológicos evidenciados na microscopia de luz em preparados de sêmen fresco e diretamente relacionados com o espermatozóide, tais como motilidade, densidade, vitalidade e morfologia espermática, também são usados para a avaliação da fertilidade do macho (SOARES; BELETTI, 2003).

A produção de espermatozoides no galo atinge seu máximo entre 24 e 30 semanas de idade, mantêm-se elevada até 40-45 semanas de idade e decresce a partir dessa idade (BRILLARD & MCDANIEL, 1985; ROSENSTRAUCH; EGEN; FRIEDLÄNDER, 1994). Enquanto que se considerando um lote de aves reprodutoras, seu pico de produção de ovos acontece entre a 30<sup>a</sup> e a 35<sup>a</sup> semana de vida, sendo que as mesmas são descartadas por volta da 58<sup>a</sup> semana, podendo essa idade de abate ser prorrogada, de acordo com a necessidade do mercado. Verifica-se atualmente um aumento deste período até a 66<sup>a</sup> semana. Com o passar do tempo, a produção e a fertilidade do lote diminuem consideravelmente, havendo inclusive necessidade de reposição de parte dos machos, recurso utilizado para melhorar a fertilização. Assim, a avaliação da fertilidade de cada reprodutor é de extrema relevância, sendo necessários métodos precisos e de baixo custo (SOARES; BELETTI, 2003).

A restrição alimentar tem efeito direto na redução do peso corporal e da carcaça, na cria e na produção de galos. No caso de reprodutores de corte que são selecionados pela capacidade de crescimento precoce, uma alimentação à vontade proporciona o desenvolvimento de carcaça muito grande e conformação fisicamente prejudicial para um bom acasalamento e uma boa fertilidade. Aves em restrição apresentam melhor persistência do peso dos testículos na produção do que aves alimentadas à vontade, cujas fertilidades caem rapidamente após 40 semanas de idade (BROWN & MCCARTNEY, 1983; BUCKNER & SAVAGE, 1986).

É importante lembrar, que quando a ave é submetida a um ambiente estressante, várias de suas funções são alteradas, tais como: variação na frequência respiratória, temperatura retal e na ingestão de alimentos; desvio de nutrientes que seriam usados na produção e processo de manutenção, entre outros (BAÊTA, 1998).

A nutrição dos galos é um importante fator que encarece o custo de produção na indústria avícola de corte, este custo está associado às necessidades de crescimento e de manutenção de machos reprodutores. A alimentação contribui com aproximadamente 70% do custo total de produção, sendo evidente a necessidade

de estimar as reais exigências nutricionais dos galos nas diferentes fases de criação.

Associado a isto, o real efeito que as diferentes micotoxinas podem causar quanto ao desempenho de galos reprodutores ainda carece de pesquisas adicionais. Podendo ser estas conseqüências antevistas, é possível também tornar mais específico e eficaz o controle de micotoxinas na alimentação destes animais, prevendo-se melhor desempenho.

O início da inseminação artificial avícola se deu com a descoberta do método de massagem e pressão para coleta de sêmen (BURROWS & QUINN, 1937). O uso do sêmen fresco ou resfriado por algumas horas se tornou possível na prática devido à facilidade da coleta e a proximidade das fêmeas nas grandes fazendas de procriação.

A qualidade do sêmen é um dos melhores indicadores do desempenho reprodutivo. No sêmen existe um número de características vitais que um reprodutor deve possuir para ser bem sucedido. A fertilização requer o sêmen de qualidade suficiente para que o espermatozóide possa alcançar e penetrar o embrião do ovo (McDANIEL, 2001).

### **3.6.1 Características do espermatozóide e do sêmen de galo**

Em mamíferos, a maior proporção do volume seminal é originária das glândulas acessórias (HAFEZ, 1982). Por outro lado, em aves, a ausência de vesículas seminais e glândula prostática resulta em reduzido volume seminal, o qual é composto basicamente de frutose, fosfatidilcolina e alguns eletrólitos (PARKHURST e MOUNTNEY, 1988). A espermatogênese é realizada a uma temperatura de aproximadamente 41°C.

Os espermatozoides das espécies aviárias diferem dos mamíferos domésticos por serem menores, com cabeças filamentosas e longas e por não possuírem gota citoplasmática. O acrossoma, a cabeça, a peça principal da cauda e a intermediária estão presentes (GILBERT, 1982). Já Sturkie (1968) diz que os espermatozoides das aves exibem uma grande variação no tamanho e forma dependendo da espécie, e que em galos domésticos estes possuem uma cabeça grande com um acrossoma pontiagudo e uma peça intermediária curta.

De acordo com Burke (1996), os espermatozoides dos galos e perus são semelhantes em forma, mas diferem dos espermatozoides dos mamíferos. Nestas espécies de aves, a cabeça do espermatozoide é longa e estreita (0,5 x 12,5 micrômetros) com um pequeno acrossoma revestindo a extremidade apical do núcleo. A peça intermediária e a principal da cauda têm em conjunto cerca de 94 micrômetros de comprimento, para um comprimento total do espermatozoide de aproximadamente 110 micrômetros. O diâmetro da camada tem cerca de 0,5 micrômetros ou ligeiramente menos, dando ao espermatozoide um aspecto geral filiforme.

A célula espermática madura é uma célula terminal, produto final de um complexo processo de desenvolvimento, e não pode sofrer nova divisão celular ou diferenciação (HAFEZ, 1995).

No galo, a cabeça do espermatozoide é curvada e mede de 12 a 13 micrômetros de comprimento e é recoberta pelo acrossoma com 2 micrômetros de comprimento. A peça intermediária da cauda mede cerca de 4 micrômetros e o restante do comprimento do espermatozoide de 100 micrômetros é composto da peça principal da cauda. Em sua parte mais larga, o espermatozoide mede cerca de 0,5 micrômetros. O espermatozoide é circundado pela membrana citoplasmática. O acrossoma é simples com uma espinha interna circundada por uma cobertura cônica. A cabeça contém o material nuclear do gameta. A peça intermediária contém o centríolo cilíndrico circundado por uma bainha de cerca de 30 mitocôndrias curvas semelhantes a pratos. Estas são diferentes dos cilindros curvos e alongados dos espermatozoides de mamíferos, além de se apresentarem em número menor (GILBERT, 1982).

As células de Sertoli, ou células de sustentação, são essenciais para o perfeito funcionamento do aparelho reprodutor de machos, principalmente quanto à produção de hormônios necessários na formação dos espermatozoides.

De acordo com Etches (1996), o número de células de Sertoli presentes nos testículos de galos é proporcional ao tamanho e peso dos mesmos e por isso a produção diária de sêmen varia de acordo com o tamanho testicular. Existe uma correlação direta entre o tamanho do testículo e produção de sêmen.

Ainda por Etches (1996), a produção diária de sêmen ocorre a níveis constantes, da mesma forma que o volume do ejaculado. Estes parâmetros são reduzidos quando o sêmen é coletado com maior frequência e com o decorrer da

idade.

Segundo Burke (1996), o sêmen é uma mistura de células espermáticas e líquidos de transporte. De acordo com a tabela 4, nas aves domésticas o ejaculado característico tem alta concentração e baixo volume.

Diversos fatores influenciam a produção de sêmen pelos reprodutores. Existem grandes diferenças no início da produção de sêmen e na sua qualidade entre as espécies, linhagens, dentro das espécies e individualmente dentro das linhagens (BAKST & BAHR, 1995).

Resende et al. (1983), revisando dados de diferentes autores, verificaram grande variação quanto ao que se afirma ser o volume de ejaculado para galos, os mesmos afirmaram que as variações encontradas ocorrem devido ao tipo, linhagem, idade do reprodutor, fatores climáticos, regime alimentar, freqüência e tecnologia de coleta.

Por Gilbert (1982), o ejaculado do galo varia de 0,2 a 0,5 ml e apresenta uma concentração de três bilhões de espermatozoides por ml. Bakst & Bahr (1995) afirmaram que galos ejaculam em média 0,25 ml, com cerca de cinco bilhões de espermatozoides por ml. E de acordo com Moraes (2002), o volume varia de 0,5 a 1,0 ml e a concentração é de 3,5 bilhões por ml.

Também deve se levar em consideração o fato de que o material seminal coletado, na maioria das vezes apresenta resíduos dos sistemas digestivo e urinário e as células espermáticas apresentam-se misturadas com líquidos secretados. Estes fatores não são facilmente controláveis e também em consequência disso, consideráveis variações no volume e na composição do sêmen de galos são verificadas.

Tabela 4 – Produção de sêmen e concentração de espermatozoides para diversos tipos de aves <sup>1</sup>

Reprodutor	Volume do Ejaculado (ml)		Concentração Espermática (10 <sup>9</sup> Células/ml)	
	Média	Variação	Média	Variação
Galo				
Pesado	0,35	0,10 a 0,9	5,7	3,0 a 8,0
Médio	0,20	0,80 a 0,5	5,0	3,5 a 6,0
Leve	0,15	0,05 a 0,30	5,0	5,0 a 7,5
Peru				
Leve	0,15	0,08 a 0,30	9,0	8,0 a 13,5
Pesado	0,20	0,10 a 0,30	9,5	4,0 a 8,0
Codorna	-	0,005 a 0,2	-	1,5 a 2,5
Galinha de Angola	-	0,01 a 0,2	-	1,5 a 2,5

Fonte: LAKE & STEWART, 1978; ROUVIER et al., 1984; ETCHEs, 1996; SURAI & WISHART, 1996.

### 3.6.2 Avaliações de fertilidade em galos

As anormalidades espermáticas são incompatíveis com a boa fertilidade, a despeito dos parâmetros físicos do sêmen. Qualquer alteração nas características morfológicas pode comprometer a motilidade e a sobrevivência do espermatozóide.

A motilidade espermática é tida como a avaliação do percentual de células vivas com movimentos progressivos em uma amostra de sêmen.

Verifica-se que trabalhos sobre motilidade e morfologia espermática em galos são bastante escassos e menos ainda são os que relacionam esses achados a problemas reprodutivos. Segundo Jaenisch (1998), variações no peso corporal de galos alteram a morfologia espermática do material seminal proveniente destes, sendo mais evidente em animais com excesso de peso. Correa & Arceo (1995), verificaram que a percentagem de defeitos espermáticos é maior no início da vida reprodutiva dos galos (16%) e diminui ao alcançar a maturidade sexual (11%).

Moss; Melrose; Reed (1978) afirmam que amostras de sêmen de diferentes espécies animais contêm uma proporção de células anormais. Essas anormalidades podem ser classificadas em anormalidades primárias – que são originadas durante o desenvolvimento dos espermatozóides; e secundárias - que são alterações que ocorrem após a formação completa do espermatozóide. Alkan et al. (2002) afirmam que as alterações morfológicas encontradas em espermatozóides de galos e perus são similares e que as mais freqüentes são aquelas relacionadas ao acrossoma e a peça intermediária.

Lake (1971 apud GARNER & HAFEZ, 2004), afirma que a proporção média de espermatozóides normais encontrada em galos é de 85% a 90%. Em perus, uma taxa de 80% de formas normais garante uma boa fertilização, enquanto que valores menores podem resultar em redução na fertilidade em até 8% (SURAI & WISHART, 1996).

A morfologia espermática pode variar entre raças ou linhagens. Alkan et al. (2002), verificaram maior número de alterações em galos New Hampshire em comparação com galos Leghorn.

Segundo Gomes (1970), a motilidade é um dos testes utilizados para a qualidade do sêmen e tem sido considerado um bom indicador da viabilidade espermática geral. Porém, deve ser reconhecido como apenas um dos fatores para a estimativa da fertilidade.

Froman & Feltman (1998), em estudo com galos selecionados para baixa e alta motilidade espermática, observaram que estes últimos produziram sêmen com maior capacidade fertilizante. Bowling et al. (2003), verificaram resultado semelhante, encontrando ainda menor percentagem de anomalias espermáticas em galos com maior motilidade espermática.

### 3.7 MILHO

Nas criações animais, principalmente as de alto grau de desenvolvimento tecnológico é importante prevenir-se de todos os fatores que afetam negativamente a produção, para impedir que ocorram prejuízos aos produtores, entre eles deve-se ressaltar o controle dos grãos destinados à alimentação dos animais.

Os grãos que apresentam baixa qualidade, principalmente os de milho, possuem grande quantidade de ardidos e altos níveis de umidade (acima de 13%), que associados a uma temperatura ambiente favorável, tornam-se atrativos para o desenvolvimento dos fungos e abrem portas de entrada para alguns dos maiores vilões da atualidade, as micotoxinas.

Segundo a Portaria nº 11, de 12 de abril de 1996 (anexo C), do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, temos como critério de classificação oficial do grão de milho, entre outros:

Ardido: considerar como ardido o grão fermentado em mais de  $\frac{1}{4}$  de sua área total, observando-se ainda os seguintes critérios:

- 1 - para mensuração visual da área atingida, considerar como mais de  $\frac{1}{4}$  do grão fermentado ou ardido, o grão alterado em sua cor ou visivelmente fermentado em toda área do germe e mais qualquer parte do endosperma.
- 2 - serão considerados como ardidos devido a semelhança de aspecto, os grãos "queimados" ou sejam, aqueles que apresentam alteração na coloração normal por ação de altas temperaturas dos secadores.

Observação:  $\frac{1}{4}$  de área do grão de milho corresponde aproximadamente a área do germe

Assim como outros grãos, o milho é constantemente exposto a possíveis contaminações fúngicas, as quais podem se iniciar ainda no campo, durante o seu desenvolvimento. Neste caso, a contaminação pode ocorrer pela presença de esporos e fragmentos de micélio presentes no solo, de restos de plantas e sementes, ou ainda serem transportados pelo vento, chuva ou insetos (MILLS, 1989).

Os efeitos do crescimento fúngico incluem diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais, perda de qualidade e produção de compostos tóxicos – as micotoxinas (POMERANZ, 1982). Esta contaminação pode fazer com que os grãos tornem-se impróprios para o consumo humano e animal, resultando em grandes perdas econômicas (PASTER & BULLERMAN, 1988).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Nesta seção está apresentado o material utilizado para a realização da pesquisa, bem como os métodos utilizados para que fossem apurados os resultados desejados.

### **4.1 LOCAL E PERÍODO**

O experimento foi realizado no Centro Tecnológico Agropecuário (CTA) da Perdigão Agroindustrial S/A, tendo duração de 96 dias, com temperaturas médias máxima e mínimas médias de 17,9 e 28,4°C (Ver apêndice A), respectivamente, durante o período de dezembro de 2006 a fevereiro de 2007.

#### **4.1.1 Centro Tecnológico Agropecuário (CTA)**

O CTA é uma unidade experimental pertencente à Perdigão Agroindustrial. Está localizada na Linha Aparecida, pertencente à cidade de Videira – Santa Catarina. Possui uma área total de 136.400 m<sup>2</sup> e é constituída por três aviários, uma pequena fábrica de ração, uma instalação de creche e uma de terminação para suínos, e uma construção de 150 m<sup>2</sup> destinada a escritório, depósitos, banheiro e refeitórios, conforme a ilustração 3.



Ilustração 3: Fotografia - vista aérea do Centro Tecnológico Agropecuário.

Fonte: Google Earth (coordenadas para localização: 27°02'55.02" S 51°07'06.46" W 805m-altitude - Dados primários (2007).

Para desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas as instalações do Aviário 1, o mesmo possui 64 boxes de 11,4 m<sup>2</sup> cada, com bebedouro do tipo nipple, ninhos e comedouros.

## 4.2 ANIMAIS

Como critérios de seleção dos machos foram utilizados: o peso corporal, a idade e o vigor do sêmen, visando buscar a uniformidade dos lotes a serem avaliados e descarte de machos subfêrteis, para melhor verificação dos resultados após administração dos diferentes tratamentos.

Com relação ao peso corporal e idade, buscou-se ter para cada tratamento, galos com as mesmas características físicas, buscando formar lotes com animais de mesma aparência/vigor físico. O peso médio dos machos selecionados foi de 4,1 kg.

Com relação ao vigor do sêmen, a análise foi realizada individualmente,

visando descartar os animais que mesmo apresentando boa vitalidade, não possuíam qualidade espermática satisfatória.

Para seleção das fêmeas foram utilizados como critério o peso corporal das matrizes, buscando também a uniformidade do lote a participar do experimento. O peso médio das fêmeas selecionadas foi de 3,5 kg.

Assim foram selecionados do plantel do Centro Tecnológico Agropecuário da Perdigão Agroindustrial S/A, 60 machos e 200 fêmeas de matrizes de corte da linhagem Cobb 500 para compor o plantel experimental na 42ª semana de vida dos machos e 73ª semana de vida das fêmeas.

#### 4.3 INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS

As aves foram alojadas no galpão experimental do Aviário 1, conforme ilustração 4. Foram utilizados para o experimento um total de 24 boxes.



Ilustração 4: Fotografia - instalações do Aviário 1 do Centro Tecnológico Agropecuário.  
Fonte: Dados primários (2007).

As avaliações de sêmen foram realizadas em sala de laboratório, dentro da barreira sanitária do Centro Tecnológico Agropecuário, próxima às instalações do galpão experimental.

Para incubação dos ovos foi utilizada uma mini-incubadora para avaliação do desenvolvimento do embrião, também em sala de laboratório, nas instalações do Centro Tecnológico Agropecuário.

#### 4.4 PARÂMETROS AVALIADOS

Os parâmetros mensurados durante o período experimental foram:

- a) Vigor espermático
- b) Morfologia espermática
- c) Índice de fertilidade de ovos
- d) Peso do testículo – absoluto e relativo

#### 4.5 TRATAMENTOS

Os tratamentos foram compostos por quatro dietas experimentais, possuindo diferentes níveis de Aflatoxina e Fumonisina, conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 – Dietas experimentais com diferentes níveis de Aflatoxina e Fumonisina utilizados no período experimental.

<b>Tratamento</b>	<b>Aflatoxina (µg/kg)</b>	<b>Fumonisina (mg/kg)</b>
1 (controle)	0,1	0,7
2	46,2	3,6
3	97,3	6,6
4	148,6	9,6

Fonte: Dados primários (2007).

Os níveis de micotoxinas utilizados para a realização do presente estudo,

basearam-se nos níveis de aflatoxina e fumonisina verificados no monitoramento do milho utilizado pela Perdigão Agroindustrial S/A durante o ano de 2006. Os teores foram trabalhados de forma a serem estimadas situações de superdosagem de micotoxinas para parte dos tratamentos estudados neste trabalho, mas buscando não fugir da realidade vivenciada a campo.

O Tratamento 01 foi chamado Tratamento Controle, por ter o menor nível de micotoxinas, neste tratamento buscou-se ter um resultado “controle”, a ser comparado com os resultados obtidos pelos outros tratamentos.

Para os tratamentos onde se buscou atingir teores mais elevados de contaminação por Aflatoxina e Fumonisina (Tratamento 02, 03 e 04), trabalhou-se com milho de qualidade previamente avaliada (Milho 2), os valores de análise seguem na tabela 6 e aparência conforme a ilustração 5.



Ilustração 5: Fotografia - aparência lote Milho 2.  
Fonte: Dados primários (2007).

Para o Tratamento controle (Tratamento 01), utilizou-se como matéria-prima, o milho (Milho 1) com aparência de acordo com a ilustração 6 e valores de análise conforme segue na tabela 6.



Ilustração 6: Fotografia - aparência lote Milho 1.  
Fonte: Dados primários (2007).

Tabela 6 – Análises bromatológicas e de classificação para os diferentes tipos de milho utilizados no experimento

<b>Parâmetro</b>	<b>Milho 1</b>	<b>Milho 2</b>
Umidade (%)	11,95	11,86
Impurezas (%)	0,20	4,20
Grãos Avariados (%)	1,50	3,90
Grãos Fungados (%)	1,08	3,00
Grãos Quebrados (%)	0,4	9,85
Quirera (%)	6,4	5,40
Aflatoxina (µg/kg)	0,16	3,50
Fumonisina (mg/kg)	1,04	5,67
Extrato Etéreo (%)	4,64	4,73
Proteína Bruta (%)	9,69	10,41

Fonte: Dados primários (2007).

As análises referentes a parâmetros bromatológicos e de classificação foram realizadas pelo Laboratório do CETEC - Centro de Tecnologia de Carnes da Perdigão Agroindustrial S/A, as análises para verificação do teor de micotoxinas foram realizadas pelo LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria.

Ainda visando atingir os teores de contaminação por Aflatoxina e Fumonisina conforme a tabela 5, além das condições do milho utilizado para as dietas já descritas, utilizou-se também do artifício de contaminação das rações produzidas através de “meios de cultivo”, como segue.

As Aflatoxinas e Fumonisinas fornecidas aos galos foram produzidas pelo LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, segundo metodologias publicadas por Shotwell et al. (1966) para aflatoxinas e Dilkin; Mallmann; Almeida (2002) para fumonisinas.

A adição dos meios de cultivo às rações, foi realizada em misturador horizontal, no momento da produção das mesmas. As rações, assim preparadas, foram homogeneizadas, sendo posteriormente armazenadas na área de estoque do galpão até o momento da utilização.

#### **4.5.1 Dietas Experimentais**

As formulações de rações desenvolvidas apresentaram valores nutricionais de acordo com a tabela 7.

Tabela 7 – Valores calculados do nível nutricional das dietas experimentais fornecidas às aves.

	<b>Tratamento 1(controle)</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>	<b>Tratamento 4</b>
Proteína bruta (%)	14,03	14,22	14,19	14,29
Extrato etéreo (%)	2,72	2,84	2,97	3,08
Fibra bruta (%)	4,50	4,55	4,57	3,92
Cálcio (%)	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo total (%)	0,54	0,55	0,56	0,58
Sódio (%)	0,18	0,18	0,18	0,18
Matéria mineral (%)	10,87	8,70	6,55	5,35
Cobre (mg/kg)	6,00	6,00	6,00	6,00
Ferro (mg/kg)	36,01	36,01	36,01	36,01
Manganês (mg/kg)	42,00	42,00	42,00	42,00
Zinco (mg/kg)	36,00	36,00	36,00	36,00
Iodo (mg/kg)	0,60	0,60	0,60	0,60
Selênio (mg/kg)	0,21	0,21	0,21	0,21
Vitamina A (UI/g)	5,86	5,86	5,86	5,86
Vitamina D3 (UI/g)	1,82	1,82	1,82	1,82
Vitamina E (mg/kg)	25,87	25,87	25,87	25,87
Vitamina K (mg/kg)	0,98	0,98	0,98	0,98
Vitamina B1 (Tiamina) (mg/kg)	1,30	1,30	1,30	1,30
Vitamina B2 (Riboflavina) (mg/kg)	3,92	3,92	3,92	3,92
Vitamina B6 (Piridoxina) (mg/kg)	2,62	2,62	2,62	2,62
Vitamina B12 (Cianocobalamina)(mg/kg)	0,01	0,01	0,01	0,01
Acido Fólico (mg/kg)	0,46	0,46	0,46	0,46
Acido Nicotínico (mg/kg)	22,88	22,88	22,88	22,88
Acido Pantotênico (mg/kg)	9,82	9,82	9,82	9,82
Biotina (mg/kg)	0,04	0,04	0,04	0,04
Cloreto de Colina (mg/kg)	44,40	44,40	44,40	44,40

Fonte: Dados primários (2007).

Para tanto, os ingredientes utilizados entraram na composição das rações, nos percentuais apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Composição centesimal das rações utilizadas nos Experimentos 01 e 02.

<b>Ingrediente</b>	<b>Tratamento 1 (controle)</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>	<b>Tratamento 4</b>
Farelo de soja (%)	17,10	17,20	16,70	16,50
Milho 1 (%)	66,59	45,88	24,00	0
Milho 2 (%)	0	22,70	47,12	73,38
Sal refinado (%)	0,40	0,40	0,40	0,40
Casca soja (%)	6,90	6,90	6,90	5,40
Fosfato bicálcico (%)	1,50	1,50	1,50	1,50
Calcário (%)	1,50	1,50	1,50	1,50
Caulim (%)	5,50	3,30	1,15	0
Cloreto de Colina (%)	0,10	0,10	0,10	0,10
*Antisalmonella (%)	0,20	0,20	0,20	0,20
Metionina (%)	0,06	0,06	0,06	0,54
Cultura de Aflatoxina (%)	0	0,01	0,02	0,03
Cultura de Fumonisina (%)	0	0,10	0,20	0,30
Premix Vitamínico Mineral (%)	0,15	0,15	0,15	0,15

\*Antisalmonella: ácido propiônico líquido (7%), formaldeído (30%) e solução amoniacal a 5% e água (63%).

Fonte: Dados primários (2007).

Em pré-avaliação, a ração produzida apresentou padrões bromatológicos como mostra a tabela 9:

Tabela 9 – Composição bromatológica das rações utilizadas nos Experimentos 01 e 02.

<b>Análise</b>	<b>Tratamento 01 (controle)</b>	<b>Tratamento 02</b>	<b>Tratamento 03</b>	<b>Tratamento 04</b>
Umidade (%)	10,34	10,54	11,08	10,94
Extrato Etéreo (%)	4,02	3,2	3,63	2,98
Cálcio (%)	1,04	1,04	1,0	1,1
Fósforo (%)	0,5	0,5	0,5	0,53
Sódio (%)	0,15	0,15	0,16	0,2

Fonte: Dados primários (2007).

Verifica-se uma linearidade entre os valores nutricionais referentes aos diferentes tratamentos, sendo que o objetivo principal nesta etapa é o de diferenciá-los quanto ao teor de micotoxinas.

#### 4.6 AMOSTRAGEM PARA RAÇÕES E MILHO

Visando obterem-se amostras representativas às quantidades e milho e rações utilizadas no experimento, procedeu-se com a coleta das amostras da seguinte forma:

- a) Para as quantidades de milho diferenciado por qualidade (Milho 1 e Milho 2) utilizadas, realizou-se a remistura dos materiais separadamente, em misturador horizontal de pás. Trabalhou-se primeiramente com a quantidade de Milho 1 (não contaminada), realizou-se o procedimento de limpeza do equipamento e logo após foi remisturada a quantidade de Milho 2. Após a mistura homogênea de cada uma das quantidades, foram coletadas amostras de 5kg de milho para cada análise a ser realizada.
- b) Para a amostragem das rações produzidas para os diferentes tratamentos, foram coletados 1 kg de cada ração, logo após o procedimento de mistura.

As amostras foram imediatamente encaminhadas aos laboratórios de análise.

#### 4.7 PERÍODO PRÉ-EXPERIMENTAL

Para a melhor avaliação dos parâmetros de vigor e morfologia espermática, é necessário que se possa trabalhar com uma coleta eficiente e que os animais estejam preparados e previamente treinados para tal.

A fase de treinamento para a colheita de sêmen visa minimizar o estresse na fase experimental. Durante este período os animais receberam o mesmo período de luminosidade diária que recebiam quando estavam nos galpões de origem (17 horas de luz e 7 horas de escuro). A ração oferecida durante esse período foi a mesma utilizada nos plantéis de origem, com o consumo fixado em 135g/ave/dia.

As coletas foram realizadas em intervalos de sete em sete dias, para que não houvesse interferência proveniente de estresse causado aos animais.

Durante esse período, a totalidade das aves recebeu alimentação e manejo convencionais, isenta de contaminação por Aflatoxina e Fumonisina; foram criadas sobre cama de maravalha e alojadas nas densidades recomendadas para a fase de criação. Os machos foram alojados separadamente das fêmeas.

A duração do período pré-experimental foi de 30 dias.

#### 4.8 PERÍODO EXPERIMENTAL

O período experimental teve duração de 46 dias.

O arraçamento foi realizado em programa diário controlado, onde os volumes de fornecimento foram de acordo com os índices produtivos do lote.

Período de exposição à luz: (17 horas de luz e 7 horas de escuro).

#### 4.9 ANÁLISE DE VIGOR ESPERMÁTICO

Para análise de vigor espermático, foram realizadas quatro coletas de sêmen, respeitando-se intervalos de sete dias entre elas.

Após a coleta de material para análise de vigor espermático, o mesmo foi conservado em banho-maria à temperatura de 37°C até a realização da análise, para que os espermatozóides mantivessem as condições do momento da coleta.

A análise foi realizada colocando-se uma gota do material entre lâmina e lamínula previamente aquecidas à temperatura próxima a 40°C, para observação em microscópio óptico (microscopia de campo claro) em aumento de 100 vezes.

O parâmetro de vigor espermático foi avaliado considerando-se força do movimento dos espermatozóides, o qual influencia a velocidade com que eles se movimentam.

Foi utilizada para esta avaliação, um escore de 0 a 5, onde 0 representa a ausência de movimento progressivo e 5 representa um movimento vigoroso e veloz dos espermatozóides, geralmente progressivo e com formação de ondas.

Foram realizadas 4 coletas de sêmen para análises de vigor espermático, seguindo-se intervalos de 7 em 7 dias, através do método de massagem dorsal, proposto por Burrows & Quinn (1937), conforme segue.

#### **4.9.1 Método de Massagem Dorsal**

A coleta de sêmen é uma operação simples, mas que exige cuidados com relação à manipulação dos animais de forma a evitar qualquer estresse que venha a inibir a obtenção momentânea do sêmen e/ou afetar sua produção subsequente.

Antes da realização das coletas, realizou-se o trabalho de toailete nos machos. Foram retiradas as penas da região pericloacal para que durante a execução das coletas se tivesse fácil acesso ao sêmen e para que o material retirado não estivesse contaminado por sujidades provenientes das penas ou por fezes. Durante a realização do presente trabalho, o toailete foi repetido um dia antes das coletas, a fim de que fosse garantida a qualidade do sêmen obtido.

Para que as coletas fossem realizadas de maneira mais eficiente, foi utilizado como apoio para os machos no momento da coleta, um “banco coletor”.

Para realização da massagem, o animal deve ser contido pelas pernas com um das mãos e apoiado ao banco coletor, com a outra mão é feita a massagem. Sendo necessário um segundo operador que coletará o sêmen enquanto o primeiro executa os movimentos de massagem.

Conforme demonstra a ilustração 7, a massagem dorsal é feita com os dedos polegar e indicador percorrendo o dorso da ave paralelamente a coluna vertebral, em suave pressão iniciada na base das asas, descendo pela inserção da cauda até pressionar a região lateral da cloaca. Em um animal treinado após poucos movimentos deve ocorrer a exposição do falo e a liberação de sêmen. As estruturas da cloaca não devem ser tocadas para não disseminar agentes patógenos.



Ilustração 7: Fotografia - coleta de sêmen pelo método de massagem dorsal.  
Fonte: Dados primários (2007).

O material coletado foi secretado em grandes gotas após cada movimento completo de estimulação e imediatamente coletado.

A avaliação do sêmen começa no momento da coleta. Sêmen de boa qualidade deve ser viscoso e branco-cremoso (BAKST; BAHR, 1995). Segundo Sturkie (1968), o sêmen do galo é, usualmente, branco e opaco, podendo ser claro a aquoso, particularmente quando a concentração de espermatozoides é baixa. Deve ser observada a contaminação por excretas que resultam na eliminação do ejaculado.

As coletas foram realizadas pela mesma pessoa para evitar variação de técnica.

#### 4.10 ANÁLISE DE MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Para análise de morfologia espermática, foram realizadas duas coletas de sêmen, com intervalo de 21 dias entre elas.

Para avaliação das anormalidades dos espermatozóides, adaptou-se técnica utilizada para mamíferos. A diluição do material foi feita da seguinte forma: 1 microlitro de sêmen foi adicionado à 4 ml de solução de formol citrato. Para avaliação das amostras em microscópio de contraste de fases, com aumento de 1000 vezes, utilizou-se para cada 1 microlitro de amostra analisada, 1 microlitro de corante Eosina. A contagem foi realizada para 100 células, expressando as alterações morfológicas em percentagem. As alterações observadas foram as de: acrossoma, cabeça, peça intermediária, cauda e a contagem total das anomalias.

#### 4.11 ANÁLISE DE FERTILIDADE EM OVOS

Diariamente durante vinte e seis dias, a partir do vigésimo dia do experimento, foram coletados os ovos produzidos pelo Experimento 02, para as cinco repetições aplicadas a cada tratamento.

Os ovos foram incubados durante 48 horas, em mini-incubadora provida de lâmpada incandescente a uma temperatura de 37°C.

Após o período acima citado, os ovos foram quebrados e foram verificadas as condições de fertilização dos mesmos.

As condições foram analisadas conforme parâmetros demonstrados nas fotos abaixo.

Um ovo estéril apresenta características conforme na ilustração 8.



Ilustração 8: Fotografia - a gema de um *ovo estéril* carrega um acúmulo de material branco em seu centro.

Fonte: Embryonic Development, Supplement carried in International Hatchery Practice, [20--].

Dependendo do tempo de incubação, um ovo fértil apresenta características conforme as ilustrações 9, 10 e 11. Cabe ressaltar que, na ilustração 10, que apresenta a aparência do primeiro crescimento no centro do blastoderme tempo de incubação dos ovos é de 48 horas, ao passo que, na ilustração 11, a qual demonstra a formação do sistema circulatório e identificação visual do desenvolvimento de tecido circulatório e nervoso, o tempo de incubação é de 72 horas.

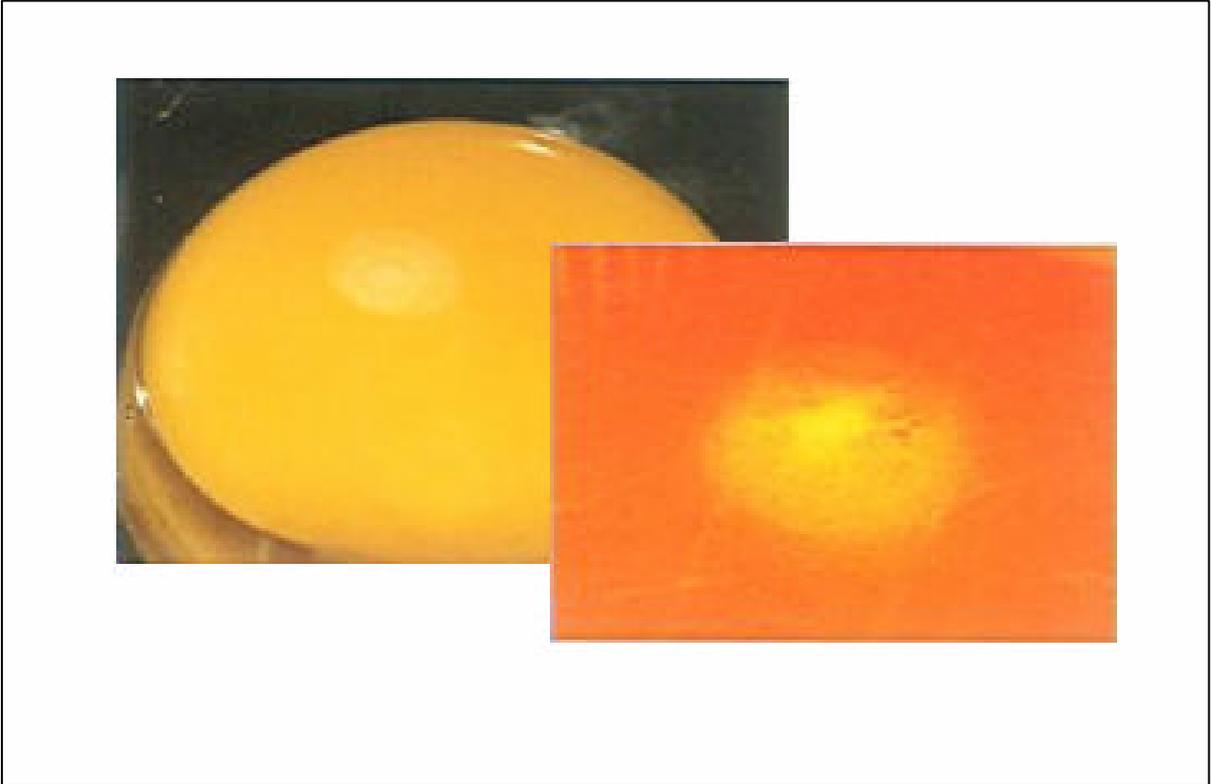


Ilustração 9: Fotografia - o disco embrionário fertilizado se parece com um anel, iluminado ao centro, é nesta área que se inicia o crescimento embrionário.

Fonte: Embryonic Development, Supplement carried in International Hatchery Practice, [20--].

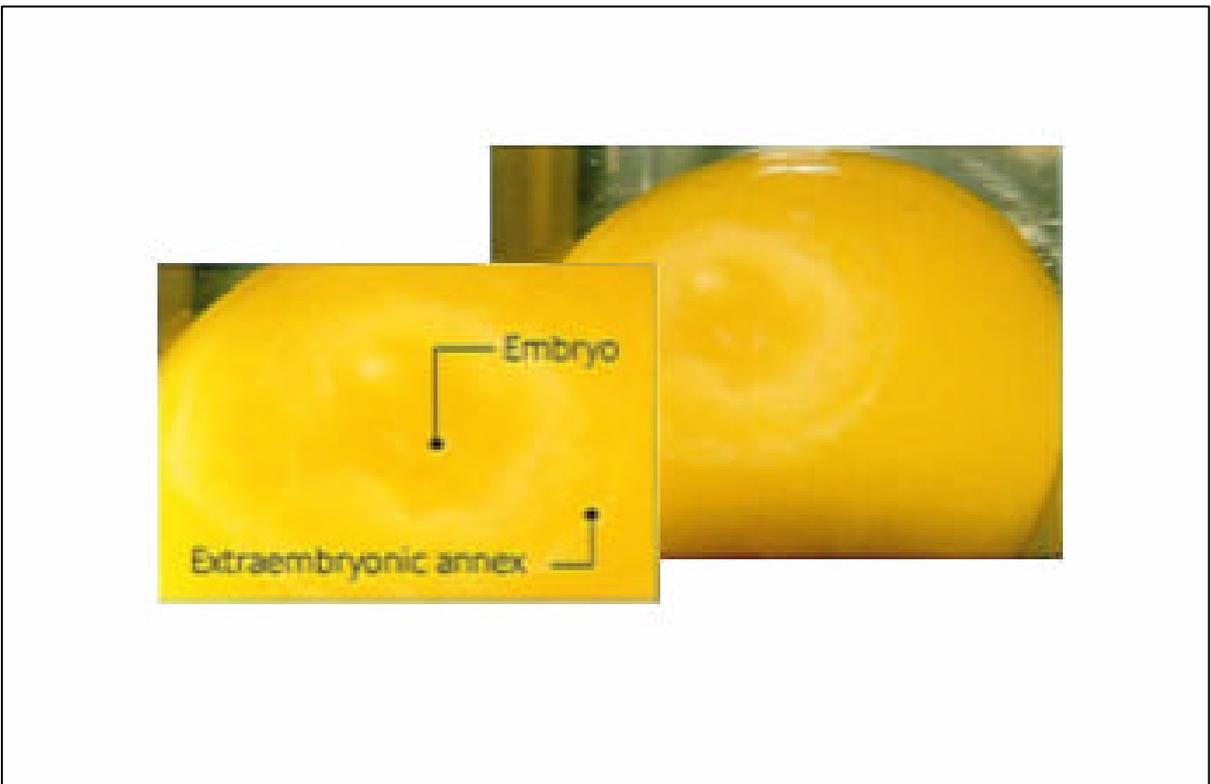


Ilustração 10: Fotografia - Aparência do primeiro crescimento no centro do blastoderme.

Fonte: Embryonic Development, Supplement carried in International Hatchery Practice, [20--].

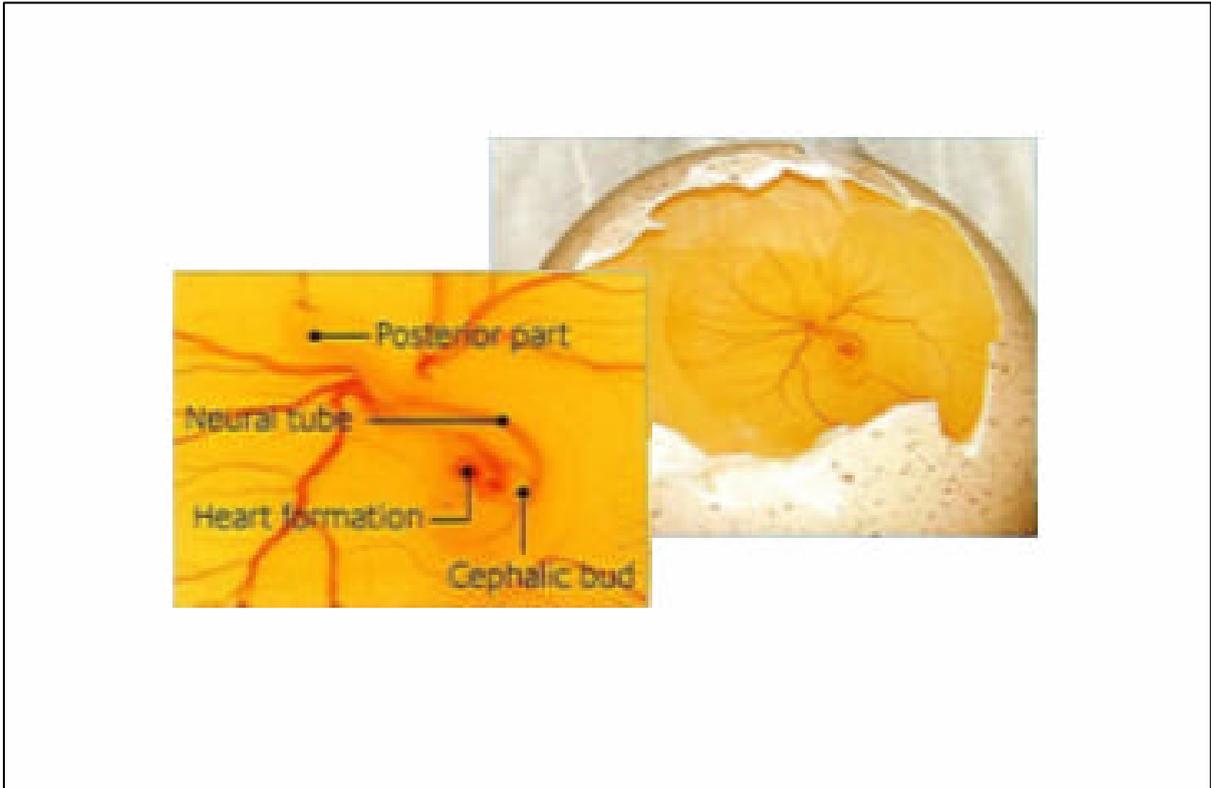


Ilustração 11: Fotografia - Formação do sistema circulatório e identificação visual do desenvolvimento de tecido circulatório e nervoso.

Fonte: Embryonic Development, Supplement carried in International Hatchery Practice, [20--].

#### 4.12 AVALIAÇÕES DE PESO DOS TESTÍCULOS

A avaliação do peso dos testículos foi realizada para 5 animais pertencentes a cada tratamento ao final do experimento.

Os animais foram abatidos e foram tomados os pesos de testículos e carcaça para avaliação de peso absoluto e relativo dos mesmos.

Segundo Albuquerque et al. (2006), o peso dos testículos é influenciado pelo peso corporal. Considerando tal fato, o peso dos testículos foi calculado considerando o peso absoluto sobre peso relativo da carcaça após a retirada dos testículos do animal.

## 4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento dos experimentos para melhor análise dos dados gerados, foi realizado como segue.

### 4.13.1 Experimento 01

Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, onde 40 machos Cobb 500 foram distribuídos em 4 boxes, contendo 10 machos cada um. Cada macho foi considerado como uma unidade experimental (1 repetição). Os quatro tratamentos foram distribuídos aleatoriamente, um tratamento para cada box.

Os galos deste experimento foram utilizados para avaliação espermática e de peso de testículos.

### 4.13.2 Experimento 02

Foram utilizadas 20 famílias de aves (família = 1 galo Cobb 500 + 10 galinhas Cobb 500), distribuídas em 20 boxes, constituindo um delineamento inteiramente ao acaso, com quatro tratamentos cada uma e com cinco repetições (1 repetição = 1 box).

Os ovos produzidos neste experimento foram utilizados para avaliação do % de ovos férteis.

Enquanto foi aplicado um tratamento para cada cinco machos, as fêmeas deste experimento continuaram a receber ração proveniente do plantel de origem, específica para a fase, isenta de contaminação por micotoxinas.

#### 4.14 Análise estatística

Para análise estatística dos parâmetros medidos no presente trabalho, foram utilizados os seguintes modelos matemáticos:

##### 4.14.1 Teste Qui Quadrado

Para avaliação estatística de Vigor espermático foi utilizado o Teste de Qui Quadrado (GOMES, 1985) que tem como modelo:

$$c^2 = \sum \frac{(f_0 - f_e)^2}{f_e}$$

Onde:

$f_0$  = freqüência observada

$f_e$  = freqüência esperada

Para os testes realizados no experimento, utilizou-se 3 graus de liberdade e nível de significância  $\alpha=5\%$ .

##### 4.14.2 Teste de Tukey

Para as avaliações estatísticas de Morfologia espermática, Fertilidade em ovos e Peso de Testículos, as diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo Teste de Tukey (GOMES, 1985), onde:

$$DMS_{Tukey} = q \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

em que:

$DMS_{Tukey}$  = diferença mínima significativa calculada por Tukey;

$q$  = amplitude total, considerando 5% de probabilidade - valor tabelado com o número de tratamentos e graus de liberdade do resíduo;

QMR = quadrado médio do resíduo;

$r$  = número de repetições

Para serem utilizados pelo teste de Tukey, os dados foram tratados pelo Teste F da Análise de Variância (ANOVA - *Analysis of Variance*) sendo utilizado o programa estatístico SAEG (EUCLIDES, 1983).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise e discussão dos resultados está estruturada de forma que sejam avaliados individualmente cada parâmetro estudado, respeitando as particularidades relacionadas e de acordo com análise estatística apropriada.

### 5.1 VIGOR ESPERMÁTICO

O vigor espermático foi avaliado pela realização de quatro coletas, utilizando-se o escore de 0 a 5.

Para melhor avaliação dos dados, as amostras de sêmen que obtiveram avaliação de escore 0, 1 e 2 foram consideradas amostras de BAIXO vigor espermático, bem como as amostras que obtiveram avaliação de escore 3, 4 e 5 foram consideradas amostras com BOM vigor espermático. Todos os dados coletados durante o experimento estão mostrados no apêndice B.

A tabela 10 apresenta as avaliações realizadas para os quatro tratamentos, em quatro coletas, caracterizando as amostras com BOM e BAIXO vigor espermático, bem como uma média de cada tratamento.

Tabela 10 – Vigor espermático avaliado como BOM e BAIXO de acordo com os diferentes tratamentos

Tratamento	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4		Média por tratamento	
	%vigor BOM	%vigor BAIXO	%vigor BOM	%vigor BAIXO						
1 (controle)	100	0	100	0	100	0	62,5	37,5	90,6	9,4
2	83,3	16,7	100	0	88,9	11,1	62,5	37,5	83,7	16,3
3	100	0	100	0	88,9	11,1	85,7	14,3	93,7	6,3
4	100	0	100	0	87,5	12,5	100	0	96,9	3,1
? <sup>2</sup> calculado	3,97	n.s.	-	n.s.	1,03	n.s.	4,25	n.s.	3,47	n.s.

\* ? <sup>2</sup> tabelado = 7,82

\*\* n.s. = não significativo com  $\alpha = 5\%$  de significância

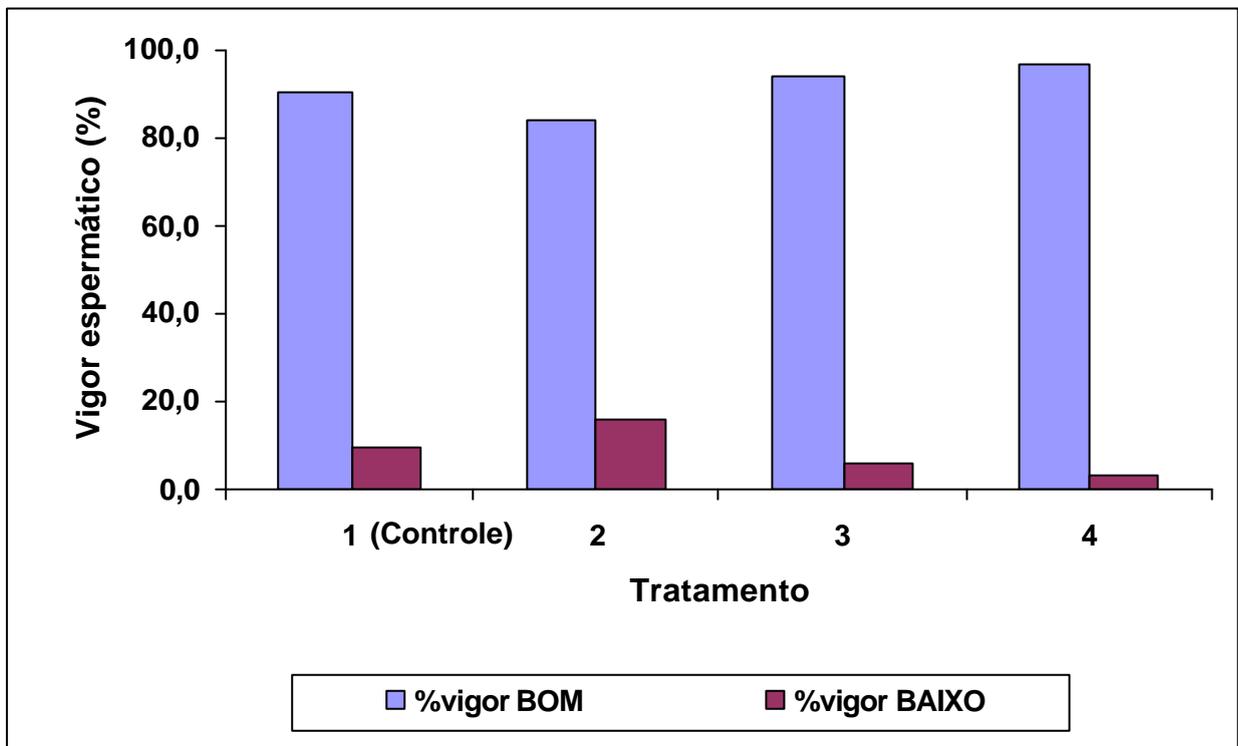
Fonte: Dados primários (2007).

Submetendo-se os dados ao Teste de Qui Quadrado ( $\alpha=5\%$ ), com correção de Yates, constatou-se que não foi encontrada diferença significativa entre os resultados de vigor espermático verificados para os diferentes tratamentos aplicados.

Em síntese, os resultados obtidos para análise de vigor espermático, não diferiram considerando-se os quatro tratamentos aplicados.

O gráfico 1 demonstra a análise das médias aritméticas, comparando-se os resultados classificados como BOM e BAIXO vigor espermático, em relação aos diferentes tratamentos administrados nas quatro coletas de sêmen realizadas.

Gráfico 1 – Vigor espermático de acordo com os diferentes tratamentos



Fonte: Dados primários (2007).

Na avaliação de Yegani et al. (2006), o efeito de fusariotoxinas (*Deoxynivalenol* - DON), em características seminais de galos, verificou que as características de: volume seminal, concentração, viabilidade e motilidade espermática não foram afetadas.

Assim como a motilidade espermática, o vigor também é um importante fator na avaliação do sêmen. Segundo Celeghini et al. (2000), existe correlação entre as medidas de motilidade e vigor espermáticos em amostras de sêmen de galos da linhagem AgRoss.

A literatura consultada não faz referência aos efeitos de alimentação contendo micotoxinas sobre vigor espermático de galos, não havendo, portanto, como comparar os resultados obtidos.

## 5.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Para a análise de morfologia espermática foram realizadas duas coletas. Foram avaliados defeitos de: acrossoma (%), cabeça (%), peça intermediária (%), cauda (%) e o total das anomalias (%), como evidenciam a tabela 11 e tabela 12. Os dados coletados para cada galo durante o experimento estão mostrados no apêndice C.

Tabela 11 – Morfologia espermática (% médio de anomalias) verificada de acordo com os diferentes tratamentos para a primeira coleta.

	<b>Tratamento 1 (controle)</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>	<b>Tratamento 4</b>	<b>Média</b>
<b>Acrossoma (%)</b>	0,13a	0,56 a	0,44 a	0,38 a	0,38 a
<b>Cabeça (%)</b>	1,63 a	1,22 a	1,44 a	1,00 a	1,32 a
<b>Peça Intermediária (%)</b>	1,00 a	1,00 a	0,22 a	1,00 a	0,81 a
<b>Cauda (%)</b>	8,50 a	8,89 a	8,44 a	8,75 a	8,65 a
<b>Total de anomalias (%)</b>	11,25 a	11,67 a	10,56 a	11,13 a	11,15 a

\* as médias de tratamentos na mesma linha, seguidas por letras iguais, não diferem entre si  $P > 0,05$  pelo Teste de Tukey

Fonte: Dados primários (2007).

Tabela 12 – Morfologia espermática (% médio de anomalias) verificada de acordo com os diferentes tratamentos para a segunda coleta.

	<b>Tratamento 1 (controle)</b>	<b>Tratamento 2</b>	<b>Tratamento 3</b>	<b>Tratamento 4</b>	<b>Média</b>
<b>Acrossoma (%)</b>	0,00 a	0,29 a	0,50 a	0,43 a	0,00 a
<b>Cabeça (%)</b>	1,75 a	1,29 a	0,63 a	1,86 a	1,75 a
<b>Peça Intermediária (%)</b>	1,75 a	0,86 a	0,63 a	2,14 a	1,75 a
<b>Cauda (%)</b>	8,75 a	6,14 a	7,38 a	9,43 a	8,75 a
<b>Total de anomalias (%)</b>	12,25 a	8,57 a	9,13 a	13,86 a	12,25 a

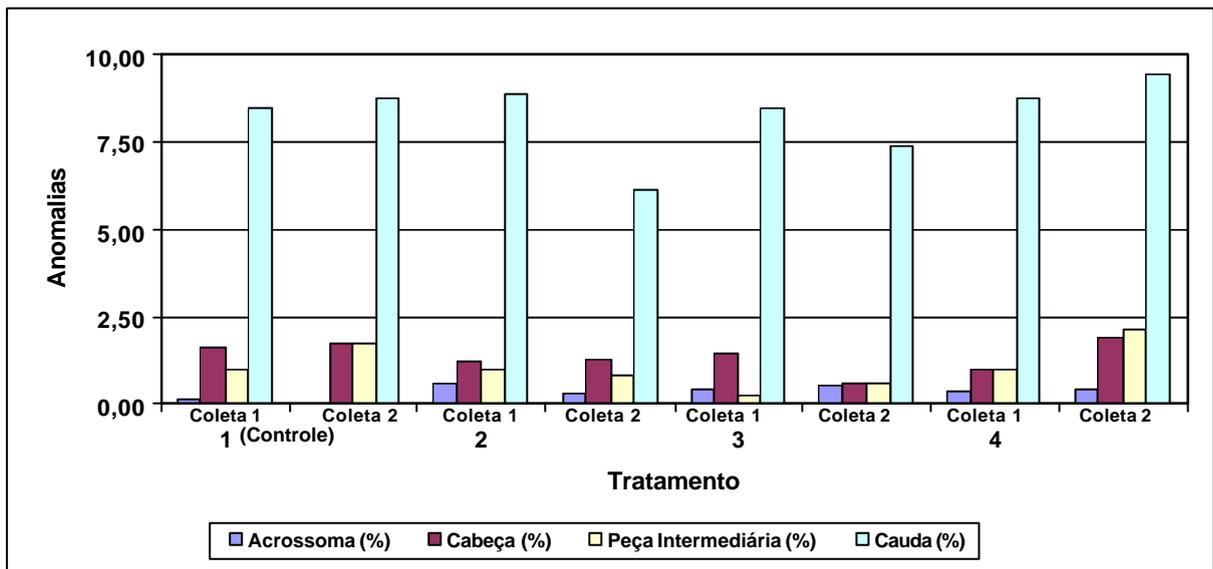
\* as médias de tratamentos na mesma linha, seguidas por letras iguais, não diferem entre si  $P > 0,05$  pelo Teste de Tukey

Fonte: Dados primários (2007).

Nos resultados das análises da primeira e segunda coletas, não foram encontradas diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) entre os diferentes tratamentos em relação a alterações morfológicas de: acrossoma (%), cabeça (%), peça intermediária (%), cauda (%) e total das anomalias (%).

O gráfico 2 apresenta o percentual de cada anomalia estudada com relação aos tratamentos, para a primeira e segunda coletas, respectivamente. Pode-se verificar que o número de anomalias encontradas foi bastante similar em todos os tratamentos para ambas as coletas realizadas durante o experimento.

Gráfico 2 – Morfologia espermática avaliada durante a primeira e segunda coletas com relação aos diferentes tratamentos

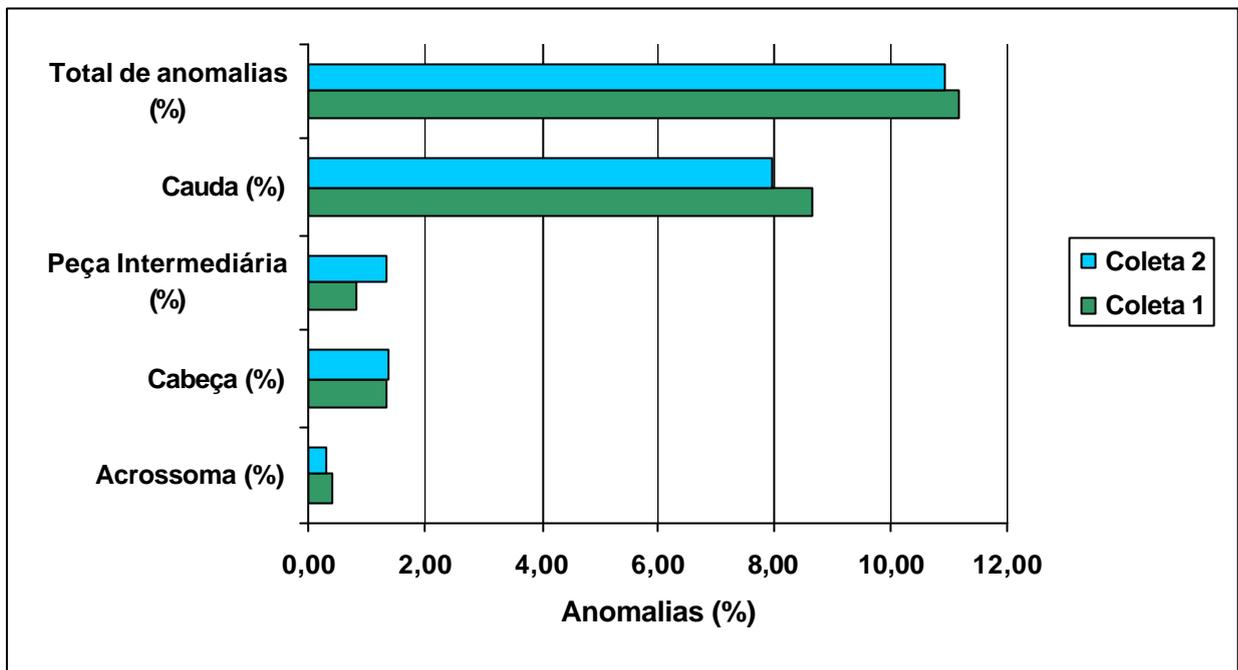


Fonte: Dados primários (2007).

Outro fator que se buscou avaliar foi a diferença no número de anomalias morfológicas verificadas entre a primeira e a segunda coletas realizadas no experimento, já que a primeira coleta foi realizada após os primeiros 14 dias do experimento e a segunda coleta após 46 dias. O objetivo foi avaliar se após os 32 dias passados entre as coletas, o número de patologias espermáticas poderia ter aumentado.

O gráfico 3, demonstra a média de anomalias verificadas para cada coleta, comparando-se a coleta 1 com a coleta 2:

Gráfico 3 – Dados comparativos de morfologia espermática entre primeira e segunda coletas realizadas



Fonte: Dados primários (2007).

Numericamente, verificou-se que na segunda coleta, o número de anomalias encontradas para Cabeça (%) e Peça Intermediária (%) foi maior, enquanto que anomalias de Acrossoma (%) e Cauda (%), bem como o Total de anomalias (%), foram verificadas em maior número para a primeira coleta. Os dados foram levados à análise estatística comparando-se a primeira e a segunda coleta para cada tratamento estudado. Em análise de variância, não foram encontradas diferenças significativas para as diferentes coletas em nenhum dos 4 tratamentos.

A seguir apresenta-se a ilustração 12, com as características dos espermatozóides estudados. A fotografia mostra espermatozóides sem anomalias morfológicas evidentes:



Ilustração 12: Fotografia - característica de amostra de sêmen analisadas em microscópio de contraste de fases, com aumento de 1000 vezes.  
Fonte: Dados primários (2007).

Para todos os tratamentos administrados, e em ambas as coletas realizadas, verificou-se maior incidência de anomalias referentes à cauda curva e cauda enrolada.

A ilustração 13 apresenta o defeito caracterizado como “cabeça enrolada”:



Ilustração 13: Fotografia - Espermatozóide com defeito de “cabeça enrolada”, visualizado em microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000 vezes.  
 Fonte: Dados primários (2007).

As alterações espermáticas podem ser influenciadas pela idade do animal (CORREA & ARCEO, 1995), pelo peso corporal (JAENISCH, 1998), pela genética (ALKAN et al., 2002), pela temperatura ambiente (SAEID & AL-SOUDI, 1975) e pelas técnicas e procedimento de coleta e conservação (MIES FILHO, 1987), assim como pelo fotoperíodo ao qual a ave está sendo submetida (MACIEL, 2006).

Os dados de avaliações de morfologia espermática realizados durante o período experimental constam no apêndice C.

A tabela 13 demonstra as médias de espermatozóides normais para cada tratamento, calculadas pelo programa estatístico SAEG.

Tabela 13 - Média de espermatozóides normais levantadas para cada tratamento, considerando-se as duas coletas.

<b>Tratamento</b>	<b>1(controle)</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Média de espermatozóides normais (%)	88,25	89,69	90,12	87,60

Fonte: Dados primários (2007).

Para obtenção das médias acima foram desconsideradas as amostras de sêmen que não puderam ser avaliadas, por impossibilidade da coleta ou volume insuficiente de sêmen coletado (identificadas como NA), ver apêndice C.

De acordo com Lake (1971 apud GARNER & HAFEZ, 2004), a percentagem máxima de alterações totais espermáticas observadas em galos é de 15%. Isto indica que os resultados médios de espermatozóides normais verificados para todos os tratamentos estão dentro da faixa considerada suficiente para boa fertilização (85-90%).

Bilgili, Renden e Sexton (1985) avaliaram o sêmen de 53 galos White Leghorn com 53 semanas de idade. Encontraram médias de patologias espermáticas de 6,69% e 7,58% em galos com baixo e alto ganho de peso. Já no grupo controle, a média de anormalidades espermáticas foi 5,48%.

Em galos jovens e velhos com baixo ganho de peso, Marini e Goodman (1969) encontraram médias de patologias espermáticas de 3,14% e 4,88%, respectivamente. Em galos com alto ganho de peso, as médias foram 5,76% e 8,63% nos jovens e velhos, respectivamente.

Considerando-se as médias de anomalias verificadas, pode-se afirmar que nenhum dos tratamentos aplicados exerceu efeito prejudicial à morfologia espermática dos animais avaliados.

### 5.3 ANÁLISE DE FERTILIDADE EM OVOS

Os dados gerados pela coleta de dados (ver apêndice D) foram analisados pelo Teste de Tukey.

As médias e as comparações entre os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram avaliados de acordo com a tabela 14.

Tabela 14 – Dados gerados pelo Teste de Tukey com relação à Fertilidade em ovos.

Tratamento	Média de ovos férteis	Comparações ( $\alpha=5\%$ )
1	86,54	B
2	90,02	AB
3	86,18	B
4	93,73	A

Fonte: Dados primários (2007).

Para avaliação estatística dos resultados, eliminou-se a contagem de resultados de fertilidade em ovos obtidos por um animal pertencente ao Tratamento 1. Pois, finalizada a coleta de dados, constatou-se que os resultados provenientes deste galo diferiam drasticamente do comportamento verificado para os demais galos avaliados dentro do Tratamento 1, atribuindo-se a este desempenho, fatores alheios à dieta administrada, como por exemplo: perda de peso em alguma fase durante o experimento que afetou a fisiologia testicular, infertilidade inata, etc.

Conforme análise estatística fornecida pelo Teste de Tukey, a fertilidade foi influenciada pelos diferentes tratamentos. Os Tratamentos 1 (controle) 2 e 3, apresentaram resultados estatisticamente iguais. Os Tratamentos 2 e 4 também foram avaliados como estatisticamente semelhantes entre si quanto à fertilidade em ovos. Entretanto o tratamento 4 apresentou uma melhor fertilidade em relação aos tratamentos 1 e 3.

Este foi um comportamento inverso ao esperado, uma vez que quando são aplicados tratamentos em níveis crescentes de micotoxinas, espera-se que o parâmetro de fertilidade em ovos, decresça de acordo com o aumento de micotoxinas nas dietas.

A melhor fertilidade observada para o tratamento 4 em relação aos tratamentos 1 e 3, possivelmente se deve a influência das fêmeas neste parâmetro. Uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas nos caracteres reprodutivos analisados para o galo (peso de testículos, morfologia e vigor espermáticos) entre os tratamentos.

Brake; Hamilton e Kittrell (1999), demonstraram que dietas contaminadas com 10 e 20 mg/kg de *Diacetoxyscirpenol* (DAS) incorreram em decréscimo da fertilidade em galos embora não tenham sido verificadas diferenças com relação ao volume de sêmen produzido.

## 5.4 PESO DOS TESTÍCULOS

Foram gerados vinte dados referentes a 5 galos de cada tratamento, conforme apêndice E.

Verificou-se como médias para cada tratamento os dados constantes na tabela 15, conforme segue.

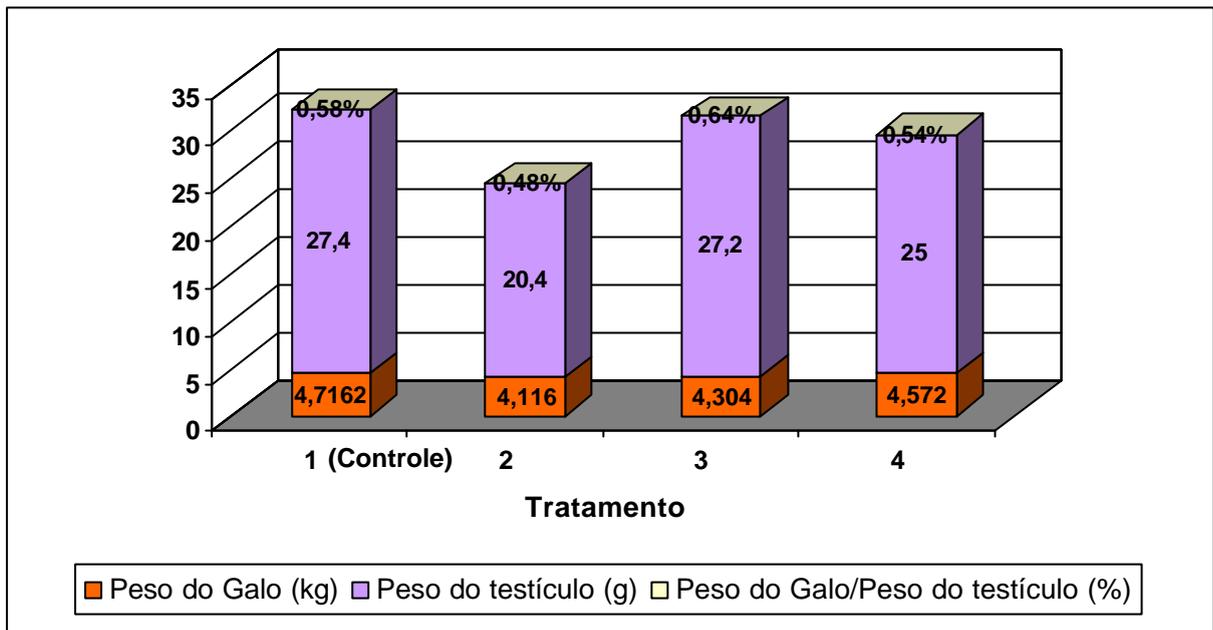
Tabela 15 – Médias dos pesos absoluto e relativo dos testículos para cada tratamento.

<b>Tratamento</b>	<b>MÉDIA Peso do Galo (g)</b>	<b>MÉDIA Peso do testículo (g)</b>	<b>MÉDIA Peso do testículo / Peso do Galo</b>
1	4716,20	27,40	0,58%
2	4116,00	20,40	0,48%
3	4304,00	27,20	0,64%
4	4572,00	25,00	0,54%

Fonte: Dados primários (2007).

O gráfico 4 ilustra as médias tabeladas acima para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4.

Gráfico 4 – Dados comparativos de peso de testículos absoluto e relativo entre os diferentes tratamentos



Fonte: Dados primários (2007).

Verificou-se uma similaridade nos dados relativos a peso absoluto e relativo dos testículos em relação a todos os tratamentos, demonstrando comportamento similar para todos os tratamentos com relação à análise de peso de testículos.

Em verificação estatística dos resultados, a análise de variância para modelos lineares não verificou diferença estatística com relação ao Peso de Testículo para nenhum dos tratamentos estudados.

Cecil & Backst (1984), afirmam que o peso dos testículos é indicativo da produção espermática.

## 6 SUGESTÕES

Tendo em vista os resultados observados neste trabalho, são sugeridos alguns pontos que foram podem ser utilizados como melhorias para próximos estudos:

Para avaliação de vigor espermático, sugere-se a utilização de metodologia mais avançada de análise, que compreende uso de equipamento medidor automático – já existem opções no mercado para utilização de sêmen de aves. Seria assim eliminada a atual subjetividade da análise por conta do analista. Neste experimento, buscou-se minimizar o efeito da subjetividade da análise, designando apenas um analista para essas avaliações.

Análises paralelas de motilidade espermática, volume e concentração de sêmen também podem ser sugeridas.

Com relação ao estudo da fertilidade em ovos, verificou-se que alguns resultados de infertilidade poderiam provir apenas da galinha e não do galo em estudo.

Portanto, para o estudo da fertilidade em ovos, sugere-se trabalhar com a inseminação artificial das fêmeas, engaioladas, a fim de se poder avaliar individualmente cada galo. Entretanto, neste tipo de teste, torna-se impossível avaliar a capacidade de cópula do galo. Pode ser utilizada também a metodologia de “ninhos alçapão” que permitem identificação do ovo e da galinha que fez a sua postura. Dessa forma é possível eliminar os dados referentes à galinhas com problemas de fertilidade.

Para a todas as análises sugere-se trabalhar com gaiolas individuais para galo. Isto eliminaria problemas relacionados à competição natural existente entre os animais (animais maiores comem mais), e o estresse - o que neste trabalho pode ter ocorrido dentro de cada lote, quando os mesmos foram alojados 10 a 10.

É importante ressaltar que todos estes pontos são condições experimentais diferentes das que se trabalha em campo, impossibilitando a avaliação objetivada por este trabalho.

## 7 CONCLUSÕES

Não foram encontradas taxas crescentes ou mesmo valores pontuais nos parâmetros estudados que implicassem no decréscimo da fertilidade dos animais em estudo, quando aumentados os teores de micotoxinas utilizadas nas dietas.

Quando avaliado o parâmetro de vigor espermático, os resultados não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos aplicados, sendo os dados de vigor espermático muito similares em todos os tratamentos e entre as quatro coletas realizadas.

Em avaliação à morfologia espermática dos animais utilizados para o experimento, também não foram verificadas diferenças significativas avaliadas estatisticamente quando considerados os diferentes tratamentos. Em avaliação a um possível aumento no número de anomalias espermáticas com o tempo e sendo considerados 32 dias de administração de micotoxinas entre as coletas, também não foram constatadas diferenças significativas entre os dados analisados.

A análise de fertilidade dos ovos gerados no presente trabalho apresentou comportamento oposto ao esperado. Os resultados foram considerados semelhantes para os Tratamentos 1, 2 e 3 e também semelhantes para os Tratamentos 2 e 4, sendo que as médias geradas para estes dois últimos foi superior às verificadas para os demais tratamentos. Concluiu-se que esses resultados não podem ser atribuídos aos efeitos das micotoxinas administradas, mas sim à contribuição negativa das fêmeas utilizadas no experimento.

Em estudo ao peso de testículos dos animais, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos quando comparados com o grupo controle, observando-se pesos absoluto e relativo de testículos ao final do experimento.

Tendo as condições experimentais do presente estudo conclui-se que, os teores de aflatoxina e fumonisina utilizados neste experimento, em avaliação individual ou combinada, não afetaram os parâmetros reprodutivos como índices de fertilidade (fertilidade em ovos e peso de testículos) e características do sêmen (vigor e morfologia espermática) de Galos Cobb 500.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, H.T., OCAMB, C.M. First report of fumonisin B<sub>1</sub> *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobes*. **Plant Dis**, [S.l.], v. 79, p. 642-645, 1995.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação**. [dezembro 2001]. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 10 jul. 2007.

AH SEO, J., WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Appl Environm Microbiol**, [S.l.], v.65, p.1331-1334, 1999.

ALBUQUERQUE, R. et al. **Correlações entre as características seminais, parâmetros testiculares (peso e histologia) e peso corporal em galos**. *Avicultura Industrial*, São Paulo, p. 16-17, 01 set. 2006.

ALKAN, S. et al. **Morphological defects in turkey semen**. 2002. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-02-26-05/vet-26-5-16-0107-40.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2007.

ALLCROFT, P., CARNAGHAN, R.B.A. Groundnut toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary Communication. **Vet Rec**, [S.l.], v. 74, p. 863-864, 1962.

AMADO, M. A.. **Aflatoxinas**: um problema mundial. *Terra Fértil*, [S.l.], n. 4, fev. 1999.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**: teoria e prática. UFV: Viçosa, 1995.

ASEVEDO, I.G., GAMBALE, W., CORRÊA, B. Mycoflora and aflatoxicogenic species of *Aspergillus spp* isolated from stored maize. **Microbiol**, [S.l.], v. 25, p. 46-50, 1994.

BAÊTA, F. C. Acondicionamento térmico natural de galpões avícolas. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 3., 1998, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 1998. p. 29-34.

BAKST, M. R.; BAHR, J. M. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. p.390-407.

BEZUIDENHOUT, S.C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemical Society**, Chemical Communications 11, [S.I.], 743–745, 1988.

BILGILI, S. F.; RENDEN, J. A.; SEXTON, K. J. The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. **Poultry Science**, Champaign, v. 64, p. 2358-2361, 1985.

BONGALHARDO, D. C. et al. Parâmetros genéticos para caracteres de sêmen de aves White Leghorn. 2. Correlações com caracteres de postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, mar./ abr., 2000.

BORDIN, R. A. et al., Características comportamentais das aves em relação à fertilidade. *Inst. Ciênc. Saúde*; [S.I.], 20(2):129-131, jul./ dez., 2002.

BOWLING, E.R. et al. Attributes of broiler breeder males characterized by low and high sperm mobility. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 1796-1801, 2003.

BRAKE, J.T. Nutrición de broiler, reproductoras pesadas y abuelas. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 16., 1999. Lima. **Anais...** Lima: [s.n.], 1999.

BRAKE, J., P. B. HAMILTON, R. S. KITTRELL. Effect of the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on fertility and hatchability of broiler breeders. **Poultry Science**, Champaign, 78:1690–1694, 1999.

BRANHAM, B.E., PLATTNER, R.D. Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. **J Nat Prod**, [S.I.], v. 56, p.1630-1633, 1993.

BRASIL. **Portaria MAARA Nº.183 de 21 de março de 1996**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 mar. 1996. Seção I, p. 4929.

BRIGGS, D. M., R. D. WYATT, AND P. B. HAMILTON. The effect of dietary aflatoxin on semen characteristics of mature broiler breeder males. **Poultry Science**, Champaign, 53:2115-2119, 1974.

BRILLARD, J.P., McDANIEL, G.R. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. **Poultry Science**, Champaign, v. 64, p.155-158, 1985.

- BROWN, H.B.; MCCARTNEY, M.G. Effects of dietary restriction on reproductive performance of broiler breeder males. **Poultry Science**, Champaign, v. 62, p 1885-1888, 1983.
- BUCKNER, R.E.; SAVAGE, T.F. The effects of feeding 5, 7 an 9 percent crude protein diets to caged broiler breeder males. **Nutrition reports International**, Los Altos, Calif. US, v. 34, p. 967-975, 1986.
- BURKE, W. H. Reprodução das aves. In: DUKES, H. H. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996. cap. 38, p. 660-680.
- BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. The Collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, Amsterdam, v. 16, p. 19-24, 1937.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988.
- CAWOOD, M.E., GELDERBLOM, W.C.A., VLEGGAR, R. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **J Agric Food Chem**, [S.l.], v. 39, p. 1958-1962, 1991.
- CECIL, H.C.; BAKST, M.R.; **Testicular weights, ductus deferences semen volumes and sperm concentration of tuckey with high and low ejaculate volumes**, Poultry Science, Champaign, v. 63, p. 1432-1437, 1984.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Correlações entre as características seminais, parâmetros testiculares (peso e histologia) e peso corporal em galos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, n. 2, p. 57, 2000.
- \_\_\_\_\_ Avaliação das características seminais de galos selecionados para reprodução pelo desenvolvimento da crista. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 177-183, 2001.
- CHEN, J. et al. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by ***Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici***. **Appl. Environ. Microbiol.**, [S.l.], v. 58, p. 3928-3931, 1992.

CIRILLO, T., et al. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. **Food Add. Contam.**, [S.I.] , 20(6), 566-571, 2003.

CORREA, J. C. S.; ARCEO, A. M. A. Edad a la pubertad y características seminales de gallos Rhode Island y Criollos Cuello 42 Desnudo bajo condiciones tropicales. **Veterinária México**, Mexico, v. 26, n. 4, p. 375-379, 1995.

COTTA, J.T.B., **Galinha: produção de ovos**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002.

COULOMBE, R.M.A; et al. Acute effect of aflatoxin B1 on different inbred mouse strains II. **Mycopathologia**, [S.I.], v.133, p.23-29, 1991.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa, USA. Task Force Report n. 139, Jan. 2003, 199 p.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A., ALMEIDA, C.A.A.; et al. Produção de fumonisinas por cepas de *Fusarium moniliforme* de acordo com a temperatura, umidade e tempo de cultura. **Braz. J. Microbiol.**, [S.I.] abr./jun. 2002, v. 33, n. 2, p. 111-118.

ETCHES, R.J.; **Reproducción Aviar**. Zaragoza, Acribia, 1996.

EUCLIDES, R.F. **Manual de utilização do SAEG (Sistema para Análise estatística e Genética)**. UFV: Viçosa, MG, 1983.

FERNANDES, A.. J. **Desempenho produtivo e reprodutivo de matrizes de corte alimentadas com dietas contendo doses crescentes de Aflatoxinas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, 2004, p. 15-16.

FROMAN, D.P.; FELTMANN, A.J. Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, p. 379-384, 1998.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2003. cap. 7, p. 167-189.

GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl Environ Microbiol**, [S.l.], v. 54, p.1806-1811, 1988.

GILBERT, A. B. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1982. p. 488-515.

GOMES, F.P. **Curso de Estatística Experimental**. Nobel: Piracicaba, 11. ed., 1985.

GOMES, W.R. Artificial Insemination. In: THE TESTES. New York: Academic, 1970. p. 257-279.

GOULART, A.C.P.; FIALHO, W.F.B. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho. **Informativo ABRATES**, v. 9, p. 110, 1999.

HAFEZ, E. S. E. **Avaliação de sêmen**. In: REPRODUÇÃO ANIMAL. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. cap. 19, p. 411- 430.

\_\_\_\_\_. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1982.

HEATHCOTE, J. G. **Aflatoxins and related toxins**. In BETINA. Mycotoxins: production, isolation, separation and purification. 5 ed. Elsevier, Amsterdam, p. 89-130, 1984.

HENRY, M.H., WYATT, R.D. A review of fumonisin production by *Fusarium moniliforme* and fumonisin toxicoses in animals. **Appl Poult Sci**, [S.l.], v. 2, p. 188-192, 1994.

HERRERA, T; ULLOA, M. Hongos tóxicos. **El reino de los hongos-micología básica e aplicada**. México: Universidade Nacional Autónoma de México, p.422-425, 1990.

HIROOKA, E.Y., YAMAGUCHI, M.M., AOYAMA, S. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. **Food Addit Contam**, [S.l.], v. 13, p. 173-183, 1996.

HOLCOMB, M., SUTHERLAND, J.B., CHIARELLI, M.D. HPLC and FAB mass spectrometry analysis of fumonisin B1 and B2 produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. **J Agric Food Chem**, [S.l.], v. 41, p. 357-360, 1993.

HUSSEIN, S.H. & BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

JAENISCH, F.R.F. Morfologia espermática em galos com diferentes pesos corporais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1998. p. 401-403.

JELINEK, C. F. **Distribution of mycotoxins na analysis of world wide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCOTOXINS, Bangkok, [s.n.], 1988. 49 p.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADITIVES [JECFA]. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Aflatoxins**. Geneva: World Health Organization, 1998.

LAKE, P.E.; STEWART, J.M. Comparative physiology of turkey and fowl semen, In: CUNNIGHAN, F.J.; LAKE, P.E.; HEWITT, D., **Reproductive biology of poultry**. Harlow: British Poultry Science, London, 1978. p. 151-160.

LAZZARI, F.A. **A redução da qualidade pela atividade fúngica**. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1993, Passo Fundo, RS. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993c, p. 70-78.

\_\_\_\_\_. **Contaminação fúngica de sementes, grãos e rações**. In: SIMPÓSIO DE PROTEÇÃO DE GRÃOS ARMAZENADOS, 1993, Passo Fundo, RS. **Anais**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993b, p. 59-69.

\_\_\_\_\_. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: do Autor, 1993a.

LEDOUX, D.R., BROWN, T.P., WEIBKING, T.S. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **J Vet Diagn Invest**, [S.I.], v. 4, p. 330-333, 1992.

LEESON, S., DIAZ, G. J. and SUMMERS, J. D. **Poultry Metabolic Disorders and Mytoxins**. University Books, Guelph, Ontario. p. 249-280, 1995.

LORINI, I., MIIKE, L. H., SCUSSEL, V. M., Fungos em Grãos Armazenados. **Armazenagem de Grãos**, Instituto Bio Gênesis, Campinas, p 677-679, 2002.

MACIEL, Mônica Patrícia. **Características reprodutivas de galos leves e semi-pesados submetidos a diferentes fotoperíodos**. 2006. Tese (Doutorado) – Lavras : UFLA, 2006. 126 p. : il. Orientador: Judas Tadeu de Barros Cotta.

MALLMANN, C., SANTURIO, J.M., DILKIN, P. Incidência de fumonisina B1 em milho e rações no Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 7., 1997, Maracay, Venezuela. **Anais...** Maracay : Sociedad Latinoamericana de Micotoxicologia, 1997. p.73.

MARINI, P. J.; GOODMAN, B. L. Semen characteristics as influenced by selection for divergent growth rate in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 48, p. 859-865, 1969.

MCDANIEL. **Alpharma Breakfast Meeting**. Jan., 2001.

MERRILL, A.H., VAN ECHTEN, G., WANG, E., et al. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neuron in situ. **J Biol Chem**, v. 268, p. 2299-2306, 1993.

MERRILL, et al. **Fumonisin and other inhibitors of the novo sphingolipid biosynthesis**. In: ADVANCES IN LIPID RESEARCH: SPHINGOLIPID AND THEIR METABOLITES, (R.M. Bell, Y.A. Hannun and A.H. Merrill, Jr., Eds.), 1993, p. 215-234.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, [S.I.] v. 52, , n. 10, p. 737-742, 1989.

MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins -recent incidence in the United States. **Anim Sci**, [S.I.], v. 27, p. 3941- 3949, 1991.

MOSS, T.A.; MELROSE, D.R; REED, H.C. Spermatogenesis, semen and artificial insemination. In: COLE, D.J.A. **Fertility in domestic animals**, 1978. p. 59-106.

MUSSER, S.M.; PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*, **J Agri Food Chem**, v. 45, p. 1169-1173, 1997.

NELSON, P.E. **Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme***. Mycopathol, v.117, p.29-36, 1992.

NORRED, W.P. Fumonisins: mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health*, [S.l.], v. 38, p. 309-328, 1993.

ONO, E.Y.S., ONO, M.A., FUNO, F.Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin -co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Addit Contam**, [S.l.], v. 18, n. 8., p. 719-729, 2001.

OPAS. **Cr terios de salud ambiental 11: Micotoxinas**. Washington, p. 131, 1983.

ORGANISACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Cr terios de salud ambiental 11: Micotoxinas**. O.P.S., Cidade do México.1983.

ORSI, R.B., CORRÊA, B., POZZI, C.R., et al. **Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize**. *J Stored Prod Res*, v.36, p. 75-87, 2000.

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Vet.Med.**, [S.l.], v. 85, p. 89-94, 1990.

PARKHURST, C. R.; MOUNTNEY, G. J. **Poultry meat and egg production**. New York: Avi Book, 1988.

PASTER, N.; BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 7, n. 3, p. 257-265, 1988.

PEIXOTO, A.R.; TORRES, S.B.; KARASAWA, N. Qualidade sanitária de sementes de milho produzidas no subm dio São Francisco. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, p. 12-15, 1998.

PIER, A.C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **J. Anim. Sci.**, [S.l.], v. 70, p. 3964-3967, 1992.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. (ed). **Storage of cereal grains and their products**, p. 145-217, 1982.

POZZI, C.R., CORRÊA, B., GAMBALE, W. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interation, abiotic factors and mycotoxins occurence. **Food Addit Contam**, [S.I.], v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

QURESHI, et al. Dietary Exposure of Broiler Breeders to Aflatoxin Results in Immune Dysfunction in Progeny Chicks. **Poultry Science**, [S.I.], 77:812-819, 1998.

QUEZADA, T. et al. Effects of aflatoxin B1 on the liver and kidney of broiler chickens during development comparative biochemistry and physiology. **Parc 125**, [S.I.], n.3, p. 265-272, 2000.

RAMASAMY, S., et al. Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 133: 343-348, 1995.

REIS, A.C., et al. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção contra *Pythium* sp. presente no solo pelo tratamento com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, [S.I.], v. 20, p. 585-590, 1995.

RESENDE, O. A., et al. **Inseminação artificial em galinhas**. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Niterói, maio, 1983, 28 p. (Boletim Técnico, 6).

ROSENSTRAUCH, A., EGEN, A.A., FRIEDLÄNDER, M. Spermatozoa retention by Sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. **Biol. Reprod.**, [S.I.], v.v50, p.129-136, 1994.

ROSS, P.F., NELSON, P.E., RICHARD, I.D. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolate associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Appl Environm Microbiol.**, [S.I.], v. 56, p. 3225-3226, 1990.

ROTTINGHAUS, G.E., COATEY, C.G. MINOR, H.C. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2. **J Vet Diagn Invest**, [S.I.], v. 4, p. 326-330, 1992.

ROUVIER, R., et al., Insemination artificielle des canes communes pour la production de mulards a Taiwan. La situation actuelle. In: INSEMINATION ARTIFICIELLE ET AMELIORATION GENETIQUE: BILAN ET PERSPECTIVES CRITIQUES. **Versailles. Institut National de la Recherche Agronomique**, [S.I.], 1984, p. 359-368.

RUSTOM, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SAEID, J.M.; AL-SOUDI, K.A. Seasonal variation in semen characteristics of White Leghorn, New Hampshire and Indigenous Chickens in Iraq. **British Poultry Science**, London, v. 16, p.97-102, 1975.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [S.I.], vol. 2, n.1, 2000.

SARGEANT, K.C.R.B.A.A.R. Chemistry and origin of aflatoxins. **Chemical Ind London**, p. 53-55, 1963.

SARGEANT, K., A. SHERIDAN & J. OKELLY. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, London, 192 (480): 1096, 1961.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **Inst. J Microbiol**, [S.I.], v. 18, p. 257-270, 1993.

SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Introduction to mycotoxins. In: SHARMA, R.P. et al. **Mycotoxins and Phytoalexins**. London : CRC, 1991. p. 3-12.

SHEPHARD, G.S.;THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B1 in rats. **Food Chem.Toxicol.**, [S.I.], v. 30, p. 277-279, 1992.

SHEPHARD, G.S., et al. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and cornbased products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 79, 671–687, 1996.

SHOTWELL, O.L., et al. Production of Aflatoxin on Rice. **Applied Microbiology**, may. 14(3):25-428, 1966.

SILVA, J.B., POZZI, C.R., MALLOZZI, M.A.B. Mycroflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin b1 during storage of brazilian sorghum. **J Agri Food Chem**, [S.I.], v. 48, p. 4352-4356, 2001.

SMITH, J.E.; ROSS, K.; The toxigenic Aspergilli. In: SMITH J.E. & HENDERSON, R.S. (eds) **Mycotoxins and Animal Foods**. Boca Raton, CRC Press, 1991, p. 101-118.

SOARES, J.M.; BELETTI, M.E. **Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades**. Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2003.

STEINHART C.E.; DOYLE M.E.; COCHRANE B.A. **Food Safety 1996**. New York : Marcel Dekker, 1996. p. 376-394.

STURKIE, P. D. Reproducción en el macho, fertilización y desarrollo embrionario inicial. In: **Fisiología aviar**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1968. p. 411-424.

SURAI, P.F.; WISHART, G.J. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, New York, v. 52, p. 27-43, 1996.

SYDENHAM, E.W., GELDERBLOM, W.C.A., THIEL, P.G. Evidence for the natural occurrence of Fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **J Agric Food Chem**, [S.I.], v. 38, p. 285-290, 1990.

\_\_\_\_\_. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **J Agric Food Chem**, [S.I.], v. 39, p. 2014-2018, 1991.

TERAO, K. & UENO, Y. Morphological and Functional damage to cells and tissues. In: URAGUCHI, K.; YAMAZAKI, M. **Toxicology, biochemistry and phatology of mycotoxins**, New York, Wiley, p. 189-210, 1978.

THIEL, P.G., SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W. Levels of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **J Agric Food Chem**, [S.I.], v. 39, p. 109-111, 1991.

\_\_\_\_\_. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn human and animal health. **Mycopathol**, [S.l.], v. 117, p. 3-9, 1992.

TOLEDO, M. E. P., H. FONSECA & M. OETTERER. Contaminação e distribuição de aflatoxinas nos produtos e subprodutos do processamento via seca e via úmida do milho. **SBCTA**, [S.l.], 31 (1): 77-86, 1997.

TYCZKOWSKI, J.K. AND P.B HAMILTON. Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicosis in young chickens. **Poultry Science**, [S.l.], 66:1184-1188, 1987.

WYATT, R D. POULTRY. IN: SMITH, J.E. & HENDERSON, R.S. **Mycotoxins and Animal Foods**. p. 553-605, 1991.

WANG, E., NORRED, W.P., BACON, C.W., et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J Biol Chem**, [S.l.], v. 266, p. 1486-1490, 1991.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 260-275.

YAMAGUCHI, M.M., HIROOKA, E.Y., SHIBATA, T.M.M. Fumonisin em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS 7, São Paulo, 1992. **Anais...** São Paulo : Instituto Adolfo Lutz, 1992. p.27.

YEGANI M. T. K. Smith, S. Leeson, and H. J. Boermans. Effects of Feeding Grains Naturally Contaminated with *Fusarium* Mycotoxins on Performance and Metabolism of Broiler Breeders. **Poultry Science**, [S.l.], 85:1541–1549, 2006.

APÊNDICE A – Tabela de temperaturas (°C) máximas e mínimas registradas durante os dias em que correram os experimentos

Tabela: Temperaturas (°C) Máximas e Mínimas registradas durante os dias em que correram os experimentos:

Data	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Data	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)
30/12/2006	27,3	17	29/1/2007	25,2	19
29/12/2006	24,7	17	28/1/2007	29,6	20
28/12/2006	28,4	17,3	27/1/2007	30,6	20
27/12/2006	28,2	16,4	26/1/2007	27,6	18,2
26/12/2006	27,8	17	25/1/2007	32,2	17,2
25/12/2006	28,3	17,2	24/1/2007	31,8	18,4
24/12/2006	25,4	19,4	23/1/2007	29	18,4
23/12/2006	27	22,4	22/1/2007	26,4	18,4
22/12/2006	28,4	20,2	21/1/2007	29,8	16
21/12/2006	26,2	19,6	20/1/2007	27,2	17
20/12/2006	23,4	18,6	19/1/2007	31,8	17,4
19/12/2006	27,6	19,6	18/1/2007	29,2	17,2
18/12/2006	32,2	20	17/1/2007	28,2	19,2
17/12/2006	34,4	18,6	16/1/2007	27,2	16
16/12/2006	34,6	17,2	15/1/2007	29,6	16,6
15/12/2006	33,4	19,2	14/1/2007	29,6	13
14/12/2006	32,4	20	13/1/2007	29,8	18,2
13/12/2006	28,2	14,6	12/1/2007	28,6	20,2
12/12/2006	28,2	18,4	11/1/2007	29,4	19,8
11/12/2006	28,4	17,6	10/1/2007	33,4	18,8
10/12/2006	28,4	16,8	9/1/2007	31,2	18,8
9/12/2006	29,6	19,2	8/1/2007	24,6	18,8
8/12/2006	27,6	17,4	7/1/2007	23,9	16,8
7/12/2006	29,4	18	6/1/2007	26,6	17,4
6/12/2006	24,4	19,4	5/1/2007	23	17,4
5/12/2006	32,2	17,8	4/1/2007	26,5	17,4
4/12/2006	30,6	20	3/1/2007	21,8	15,9
3/12/2006	31,2	18,2	2/1/2007	25,2	17
2/12/2006	29,2	16	1/1/2007	25,8	17,1
1/12/2006	27,4	15,2	31/12/2006	27,9	17,3
<b>Média Temperatura máxima</b>			28,4		
<b>Média Temperatura mínima</b>			17,5		
<b>Desvio Padrão das Temperaturas máximas</b>			2,82		
<b>Desvio Padrão das Temperaturas mínimas</b>			1,60		

Fonte: Copyright dos dados: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.(EPAGRI)

APÊNDICE B – Dados coletados para análise de Vigor Espermático

**Primeira coleta:**

Tratamento	Vigor BOM	Vigor BAIXO	TOTAL
1	8	0	8
2	5	1	6
3	8	0	8
4	7	0	7

**Segunda coleta:**

Tratamento	Vigor BOM	Vigor BAIXO	TOTAL
1	7	0	7
2	7	0	7
3	7	0	7
4	7	0	7

**Terceira coleta:**

Tratamento	Vigor BOM	Vigor BAIXO	TOTAL
1	8	0	8
2	8	1	9
3	8	1	9
4	7	1	8

**Quarta coleta:**

Tratamento	Vigor BOM	Vigor BAIXO	TOTAL
1	5	3	8
2	5	3	8
3	6	1	7
4	7	0	7

## APÊNDICE C – Dados coletados para análise de Morfologia Espermática

### Primeira coleta:

#### Tratamento 1:

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
18	1	1	0	2	0	13	15	85
26	1	1	1	1	1	8	11	89
28	1	1	0	0	2	13	15	85
30	1	1	0	5	2	4	11	89
33	1	1	0	0	0	5	5	95
37	1	1	0	2	2	7	11	89
64	1	1	0	0	1	16	17	83

#### Tratamento 2:

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
6	2	1	0	0	2	10	12	88
7	2	1	0	0	3	4	7	93
12	2	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	2	1	1	3	2	7	13	87
27	2	1	4	3	0	17	24	76
36	2	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41	2	1	0	2	0	10	12	88
55	2	1	0	2	0	7	9	91
57	2	1	0	0	2	11	13	87
58	2	1	0	1	0	14	15	85

\* onde NA: Amostra de sêmen que não pode ser avaliada, por impossibilidade da coleta ou volume insuficiente de sêmen coletado

#### Tratamento 3:

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
17	3	1	0	2	0	1	3	97
19	3	1	0	2	0	7	9	91
20	3	1	1	1	1	19	22	78
38	3	1	0	2	1	8	11	89
50	3	1	1	2	0	8	11	89
51	3	1	1	2	0	12	15	85
52	3	1	0	0	0	6	6	94
53	3	1	1	2	0	9	12	88
54	3	1	0	0	0	6	6	94

**Tratamento 4:**

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
23	4	1	0	0	0	9	9	91
25	4	1	1	1	1	7	10	90
31	4	1	0	0	1	4	5	95
34	4	1	0	1	1	7	9	91
46	4	1	0	0	1	11	12	88
48	4	1	2	5	3	17	27	73
49	4	1	0	0	0	4	4	96
65	4	1	0	1	1	11	13	87

**Segunda Coleta:****Tratamento 1:**

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
18	1	2	0	3	2	7	12	88
26	1	2	0	0	3	10	13	87
28	1	2	0	3	4	3	10	90
30	1	2	0	1	1	6	8	92
33	1	2	0	1	1	25	27	73
37	1	2	0	0	1	7	8	92
64	1	2	0	2	1	4	7	93

**Tratamento 2:**

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
6	2	2	0	0	0	7	7	93
7	2	2	1	5	2	7	15	85
12	2	2	0	0	0	5	5	95
13	2	2	0	2	0	2	4	96
27	2	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
36	2	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
41	2	2	0	2	1	4	7	93
55	2	2	0	0	3	12	15	85
57	2	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
58	2	2	1	0	0	6	7	93

\* onde NA: Amostra de sêmen que não pode ser avaliada, por impossibilidade da coleta ou volume insuficiente de sêmen coletado

**Tratamento 3:**

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
17	3	2	1	0	1	6	8	92
19	3	2	1	0	0	6	7	93
20	3	2	1	0	2	11	14	86
38	3	2	0	1	1	8	10	90
50	3	2	0	2	1	11	14	86
51	3	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
52	3	2	0	0	0	6	6	94
53	3	2	1	0	0	2	3	97
54	3	2	0	2	0	9	11	89

\* onde NA: Amostra de sêmen que não pode ser avaliada, por impossibilidade da coleta ou volume insuficiente de sêmen coletado

**Tratamento 4:**

Galo nro.	Trat.	Coleta	Across.	Cabeça	PI	Cauda	Total	% Normais
23	4	2	0	2	6	9	17	83
25	4	2	0	2	1	7	10	90
31	4	2	1	0	5	6	12	88
34	4	2	0	1	1	27	29	71
46	4	2	2	1	1	8	12	88
48	4	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
49	4	2	0	5	0	3	8	92
65	4	2	0	2	1	6	9	91

\* onde NA: Amostra de sêmen que não pode ser avaliada, por impossibilidade da coleta ou volume insuficiente de sêmen coletado

APÊNDICE D – Dados coletados para análise de Fertilidade em Ovos

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
1	10	56	14	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	3	3	6	50,0%
	5	1	6	83,3%
	3	1	4	75,0%
	7		7	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	4	2	6	66,7%
	5		5	100,0%
	8	1	9	88,9%
	4	1	5	80,0%
	1	1	2	50,0%
	5		5	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5	2	7	71,4%
	3	3	6	50,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
	6		6	100,0%
	1	1	2	50,0%
	3	1	4	75,0%
	4	2	6	66,7%
	2	3	5	40,0%
<b>MÉDIA</b>	<b>4,35</b>	<b>1,56</b>	<b>5,31</b>	<b>80,40%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,65</b>	<b>0,81</b>	<b>1,44</b>	<b>19,77%</b>
<b>CV</b>	<b>37,91%</b>	<b>52,09%</b>	<b>27,05%</b>	<b>24,60%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
1	10	60	9	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	3	4	7	42,9%
	5	2	7	71,4%
	3	2	5	60,0%
	4		4	100,0%
	5	2	7	71,4%
	4	1	5	80,0%
	5	1	6	83,3%
	4	2	6	66,7%
	3	1	4	75,0%
	5	2	7	71,4%
	4	1	5	80,0%
	3	1	4	75,0%
	4	3	7	57,1%
	6		6	100,0%
	5	1	6	83,3%
	3	2	5	60,0%
	5		5	100,0%
	4	2	6	66,7%
	5	1	6	83,3%
	3		3	100,0%
	4	2	6	66,7%
	4	3	7	57,1%
	2	2	4	50,0%
	3	2	5	60,0%
	2	2	4	50,0%
	4	2	6	66,7%
<b>MÉDIA</b>	<b>3,92</b>	<b>1,86</b>	<b>5,50</b>	<b>72,23%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,02</b>	<b>0,77</b>	<b>1,17</b>	<b>16,09%</b>
<b>CV</b>	<b>25,92%</b>	<b>41,55%</b>	<b>21,36%</b>	<b>22,27%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
1	10	63	62	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	2	5	7	28,6%
	4	2	6	66,7%
	6	1	7	85,7%
	6		6	100,0%
	2	1	3	66,7%
	8	1	9	88,9%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
	5		5	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5		5	100,0%
	7	1	8	87,5%
	2		2	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5	1	6	83,3%
	4	2	6	66,7%
	3	1	4	75,0%
	6	2	8	75,0%
		2	2	0,0%
	2	3	5	40,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,72</b>	<b>1,67</b>	<b>5,50</b>	<b>81,05%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,67</b>	<b>1,11</b>	<b>1,70</b>	<b>25,13%</b>
<b>CV</b>	<b>35,41%</b>	<b>66,76%</b>	<b>30,96%</b>	<b>31,01%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
1	10	8	4	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	3	2	5	60,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	2		2	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	4	3	7	57,1%
	3		3	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	5	1	6	83,3%
	3	1	4	75,0%
	4	1	5	80,0%
	3		3	100,0%
	3	3	6	50,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,35</b>	<b>1,71</b>	<b>4,81</b>	<b>91,75%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,26</b>	<b>0,95</b>	<b>1,30</b>	<b>15,32%</b>
<b>CV</b>	<b>29,06%</b>	<b>55,49%</b>	<b>26,97%</b>	<b>16,70%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
1	10	1	1	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	5	2	7	71,4%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	8		8	100,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	8		8	100,0%
	2		2	100,0%
	8		8	100,0%
	5		5	100,0%
	3	3	6	50,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	5	3	8	62,5%
	3	1	4	75,0%
	7		7	100,0%
	6		6	100,0%
	5	1	6	83,3%
	2	1	3	66,7%
	6	3	9	66,7%
	4	3	7	57,1%
	3	1	4	75,0%
	3	3	6	50,0%
<b>MEDIA</b>	<b>5,00</b>	<b>2,10</b>	<b>5,81</b>	<b>86,84%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,77</b>	<b>0,99</b>	<b>1,74</b>	<b>18,23%</b>
<b>CV</b>	<b>35,33%</b>	<b>47,35%</b>	<b>30,03%</b>	<b>20,99%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
2	10	57	16	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
	6	1	7	85,7%
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	8		8	100,0%
	7		7	100,0%
	2		2	100,0%
	7		7	100,0%
	8		8	100,0%
		2	2	0,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	1	1	2	50,0%
	7	1	8	87,5%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	8	1	9	88,9%
	5	1	6	83,3%
	5		5	100,0%
<b>MEDIA</b>	<b>5,44</b>	<b>1,14</b>	<b>5,54</b>	<b>91,49%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,76</b>	<b>0,38</b>	<b>1,90</b>	<b>21,59%</b>
<b>CV</b>	<b>32,31%</b>	<b>33,07%</b>	<b>34,35%</b>	<b>23,60%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
2	10	62	11	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	6	2	8	75,0%
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	3	1	4	75,0%
	8		8	100,0%
	4		4	100,0%
	7		7	100,0%
	4		4	100,0%
	7		7	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	9		9	100,0%
	3		3	100,0%
	7		7	100,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	2		2	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
<b>MEDIA</b>	<b>5,27</b>	<b>1,33</b>	<b>5,42</b>	<b>97,31%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,66</b>	<b>0,58</b>	<b>1,68</b>	<b>7,65%</b>
<b>CV</b>	<b>31,56%</b>	<b>43,30%</b>	<b>30,93%</b>	<b>7,86%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
2	10	5	69	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	4	2	6	66,7%
	5	1	6	83,3%
	6		6	100,0%
	4	2	6	66,7%
	5	1	6	83,3%
	6	1	7	85,7%
	2		2	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	4	1	5	80,0%
	3	1	4	75,0%
	5		5	100,0%
	4	3	7	57,1%
	5	3	8	62,5%
	5		5	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5	2	7	71,4%
	4	2	6	66,7%
	3	1	4	75,0%
	2	4	6	33,3%
	2	7	9	22,2%
	3	3	6	50,0%
	2	2	4	50,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,23</b>	<b>2,18</b>	<b>5,65</b>	<b>77,27%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,31</b>	<b>1,55</b>	<b>1,38</b>	<b>22,15%</b>
<b>CV</b>	<b>30,86%</b>	<b>71,24%</b>	<b>24,48%</b>	<b>28,66%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
2	10	2	2	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	5	1	6	83,3%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	7		7	100,0%
	6		6	100,0%
	8		8	100,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	7		7	100,0%
	7		7	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	8		8	100,0%
	3		3	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	7	2	9	77,8%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
	8		8	100,0%
	5	1	6	83,3%
	4	2	6	66,7%
<b>MEDIA</b>	<b>5,85</b>	<b>1,40</b>	<b>6,12</b>	<b>95,94%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,41</b>	<b>0,55</b>	<b>1,42</b>	<b>8,97%</b>
<b>CV</b>	<b>24,04%</b>	<b>39,12%</b>	<b>23,28%</b>	<b>9,35%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
2	10	10	15	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	7	1	8	87,5%
	4	2	6	66,7%
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
	7		7	100,0%
	3	1	4	75,0%
	7		7	100,0%
	7	1	8	87,5%
	3		3	100,0%
	6	1	7	85,7%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	1		1	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	4		4	100,0%
	4	1	5	80,0%
	3		3	100,0%
	5	1	6	83,3%
	3		3	100,0%
	2	1	3	66,7%
	3	1	4	75,0%
	1	2	3	33,3%
	2	2	4	50,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,27</b>	<b>1,27</b>	<b>4,81</b>	<b>88,10%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,82</b>	<b>0,47</b>	<b>1,77</b>	<b>17,81%</b>
<b>CV</b>	<b>42,71%</b>	<b>36,70%</b>	<b>36,75%</b>	<b>20,22%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
3	10	55	54	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	6	1	7	85,7%
	1	1	2	50,0%
	3	2	5	60,0%
	4		4	100,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	3	1	4	75,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	5	1	6	83,3%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	3	2	5	60,0%
	5		5	100,0%
	3	1	4	75,0%
	3	2	5	60,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,12</b>	<b>1,38</b>	<b>4,54</b>	<b>90,35%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,24</b>	<b>0,52</b>	<b>1,14</b>	<b>16,26%</b>
<b>CV</b>	<b>30,21%</b>	<b>37,64%</b>	<b>25,11%</b>	<b>18,00%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
3	10	58	56	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	5	1	6	83,3%
	3	1	4	75,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	4	1	5	80,0%
	7		7	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	8		8	100,0%
	2		2	100,0%
	7		7	100,0%
	7		7	100,0%
	2		2	100,0%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	3	2	5	60,0%
	1	2	3	33,3%
	5		5	100,0%
	4	2	6	66,7%
	3	1	4	75,0%
	4	1	5	80,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,65</b>	<b>1,38</b>	<b>5,08</b>	<b>90,51%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,79</b>	<b>0,52</b>	<b>1,55</b>	<b>16,90%</b>
<b>CV</b>	<b>38,41%</b>	<b>37,64%</b>	<b>30,48%</b>	<b>18,68%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
3	10	61	10	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	5	1	6	83,3%
	6	1	7	85,7%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	6	1	7	85,7%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	2	2	4	50,0%
	7	1	8	87,5%
	4		4	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	8		8	100,0%
	3	3	6	50,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	5	1	6	83,3%
	4	2	6	66,7%
	3	2	5	60,0%
	4	2	6	66,7%
	2	3	5	40,0%
		4	4	0,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,76</b>	<b>1,92</b>	<b>5,46</b>	<b>83,04%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,67</b>	<b>1,00</b>	<b>1,45</b>	<b>25,35%</b>
<b>CV</b>	<b>34,99%</b>	<b>51,98%</b>	<b>26,52%</b>	<b>30,52%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
2	10	6	5	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	5	4	9	55,6%
	2	1	3	66,7%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	3		3	100,0%
	8		8	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	5	2	7	71,4%
	5	1	6	83,3%
	4	2	6	66,7%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	3	3	6	50,0%
	3	2	5	60,0%
	5	1	6	83,3%
	2	3	5	40,0%
	2		2	100,0%
	3	3	6	50,0%
	6	1	7	85,7%
	1	1	2	50,0%
	6	2	8	75,0%
	3	3	6	50,0%
		2	2	0,0%
	3	4	7	42,9%
<b>MEDIA</b>	<b>4,04</b>	<b>2,19</b>	<b>5,23</b>	<b>74,25%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,59</b>	<b>1,05</b>	<b>1,90</b>	<b>26,55%</b>
<b>CV</b>	<b>39,45%</b>	<b>47,85%</b>	<b>36,40%</b>	<b>35,76%</b>

<b>Tratamento</b>	<b>n. galinhas</b>	<b>box</b>	<b>galo</b>	
<b>3</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>63</b>	
	<b>ovos férteis</b>	<b>ovos inférteis</b>	<b>ovos totais</b>	<b>% fertilidade</b>
	4	1	5	80,0%
	7	1	8	87,5%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	4	1	5	80,0%
	7		7	100,0%
	4		4	100,0%
	7		7	100,0%
	4	1	5	80,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	6	1	7	85,7%
	5		5	100,0%
	3	2	5	60,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	3		3	100,0%
	4	2	6	66,7%
	3		3	100,0%
	5	2	7	71,4%
	3		3	100,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,65</b>	<b>1,38</b>	<b>5,08</b>	<b>92,74%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,41</b>	<b>0,52</b>	<b>1,52</b>	<b>12,20%</b>
<b>CV</b>	<b>30,35%</b>	<b>37,64%</b>	<b>29,96%</b>	<b>13,15%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	Galo	
4	10	59	8	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	8	1	9	88,9%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	7		7	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	8		8	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
	4		4	100,0%
	7		7	100,0%
	2	1	3	66,7%
	6	1	7	85,7%
	2	1	3	66,7%
<b>MEDIA</b>	<b>5,08</b>	<b>1,00</b>	<b>5,31</b>	<b>95,05%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,65</b>	<b>0,00</b>	<b>1,62</b>	<b>10,18%</b>
<b>CV</b>	<b>32,45%</b>	<b>0,00%</b>	<b>30,51%</b>	<b>10,71%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
4	10	64	68	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	3	2	5	60,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	5	3	8	62,5%
	4	2	6	66,7%
	4		4	100,0%
	2	1	3	66,7%
	7	1	8	87,5%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	4	1	5	80,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	3		3	100,0%
	4	2	6	66,7%
	4		4	100,0%
	4		4	100,0%
	5	1	6	83,3%
	2	1	3	66,7%
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
	3		3	100,0%
<b>MEDIA</b>	<b>4,42</b>	<b>1,50</b>	<b>5,00</b>	<b>89,36%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,30</b>	<b>0,71</b>	<b>1,44</b>	<b>14,99%</b>
<b>CV</b>	<b>29,42%</b>	<b>47,14%</b>	<b>28,84%</b>	<b>16,78%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
4	10	9	61	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
	2		2	100,0%
	6		6	100,0%
	3	1	4	75,0%
	5		5	100,0%
	3	2	5	60,0%
	5	1	6	83,3%
	7		7	100,0%
	3		3	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	2	1	3	66,7%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	4		4	100,0%
	8		8	100,0%
	5		5	100,0%
	3		3	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	5	1	6	83,3%
	4	3	7	57,1%
<b>MEDIA</b>	<b>4,73</b>	<b>1,43</b>	<b>5,12</b>	<b>92,65%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,54</b>	<b>0,79</b>	<b>1,48</b>	<b>13,57%</b>
<b>CV</b>	<b>32,50%</b>	<b>55,08%</b>	<b>28,90%</b>	<b>14,64%</b>

Tratamento	n. galinhas	box	galo	
4	10	7	3	
	ovos férteis	ovos inférteis	ovos totais	% fertilidade
	8		8	100,0%
	4		4	100,0%
	4		4	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	2		2	100,0%
	5	1	6	83,3%
	7		7	100,0%
	5	1	6	83,3%
	3	1	4	75,0%
	5		5	100,0%
	4		4	100,0%
	3		3	100,0%
	5		5	100,0%
<b>MEDIA</b>	<b>5,00</b>	<b>1,00</b>	<b>5,12</b>	<b>97,76%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,33</b>	<b>0,00</b>	<b>1,31</b>	<b>6,48%</b>
<b>CV</b>	<b>26,53%</b>	<b>0,00%</b>	<b>25,53%</b>	<b>6,63%</b>

<b>Tratamento</b>	<b>n. galinhas</b>	<b>box</b>	<b>galo</b>	
<b>4</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>60</b>	
	<b>ovos férteis</b>	<b>ovos inférteis</b>	<b>ovos totais</b>	<b>% fertilidade</b>
	7	1	8	87,5%
	6		6	100,0%
	4	1	5	80,0%
	5		5	100,0%
	8		8	100,0%
	5		5	100,0%
	7		7	100,0%
	7		7	100,0%
	6		6	100,0%
	4		4	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	8		8	100,0%
	6		6	100,0%
	7		7	100,0%
	5		5	100,0%
	8		8	100,0%
	4		4	100,0%
	5		5	100,0%
	6		6	100,0%
	6		6	100,0%
	3		3	100,0%
	8	1	9	88,9%
	5		5	100,0%
	5	1	6	83,3%
		3	3	0,0%
<b>MÉDIA</b>	<b>5,76</b>	<b>1,40</b>	<b>5,81</b>	<b>93,84%</b>
<b>Desvpad</b>	<b>1,45</b>	<b>0,89</b>	<b>1,60</b>	<b>19,97%</b>
<b>CV</b>	<b>25,20%</b>	<b>63,89%</b>	<b>27,56%</b>	<b>21,28%</b>

## APÊNDICE E – Dados coletados para análise de Peso de testículo

**Tratamento 1:**

Galo nro.	Peso do Galo (g)	Peso do testículo (g)	Peso do Galo/ Peso do testículo
18	4681	26	0,56%
64	4100	19	0,46%
26	5020	29	0,58%
28	4600	38	0,83%
33	5180	25	0,48%
<b>Média</b>			<b>0,58%</b>

**Tratamento 2:**

Galo nro.	Peso do Galo (g)	Peso do testículo (g)	Peso do Galo/ Peso do testículo
55	3380	11	0,33%
57	4120	24	0,58%
6	4880	38	0,78%
58	4280	19	0,44%
7	3920	10	0,26%
<b>Média</b>			<b>0,48%</b>

**Tratamento 3:**

Galo nro.	Peso do Galo (g)	Peso do testículo (g)	Peso do Galo/ Peso do testículo
20	4280	22	0,51%
52	4280	36	0,84%
17	4440	22	0,50%
51	4080	37	0,91%
50	4440	19	0,43%
<b>Média</b>			<b>0,64%</b>

**Tratamento 4:**

Galo nro.	Peso do Galo (g)	Peso do testículo (g)	Peso do Galo/ Peso do testículo
46	4820	43	0,89%
23	4860	19	0,39%
31	4720	20	0,42%
65	4440	25	0,56%
34	4020	18	0,45%
<b>Média</b>			<b>0,54%</b>

## ANEXO A – Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002

### RESOLUÇÃO - RDC Nº 274, DE 15 DE OUTUBRO DE 2002

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária no uso da 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, c/c o § 1º do art. 111 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 9 de outubro de 2002, considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando à saúde da população, considerando a necessidade de proteger a saúde da população e prevenir risco para a saúde humana, considerando que é indispensável o estabelecimento de regulamentos técnicos sobre contaminantes em alimentos com vistas a minimizar os riscos à saúde humana, considerando que é necessário aprovar os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim, milho, considerando a importância de compatibilizar a legislação nacional, com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul relacionados a limites máximos de aflatoxinas em alimentos (Resolução GMC nº 25/02), adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho", constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º O descumprimento desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Revogam-se as disposições em contrário, especialmente a Resolução CNNPA nº 34, de 1976, publicada no D.O.U. de 19/01/1977, para os seguintes alimentos: leite fluído, no leite em pó, no amendoim, na pasta de amendoim, no milho em grão, na farinha ou sêmola de milho para consumo humano.

Art. 4º Esta Resolução de Diretoria Colegiada entrará em vigor na data de sua publicação.

GONZALO VECINA NETO

#### ANEXO

#### REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL SOBRE LIMITES MÁXIMOS DE AFLATOXINAS ADMISSÍVEIS NO LEITE, NO AMENDOIM, NO MILHO

##### 1. ALCANCE

###### 1.1. Objetivo

O presente Regulamento estabelece os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite fluído, no leite em pó, no amendoim, na pasta de amendoim, no milho em grão, na farinha ou sêmola de milho para consumo humano, bem como os planos de amostragem e métodos de análise correspondentes.

###### 1.2. Âmbito de Aplicação

O presente Regulamento se aplica ao leite fluído, ao leite em pó, ao amendoim, à pasta de amendoim, ao milho em grão, à farinha ou sêmola de milho.

##### 2. REFERÊNCIAS

2.1 Planos de Amostragem para Análise de Aflatoxinas em Milho e Amendoim. FAO Alimento e Nutrição, Boletim 55, 1993.

2.2. Associação de Analistas Químicos Oficiais - AOAC, 1990. Métodos Oficiais de Análise AOAC, 15ª Edição.

2.3. Norma FIL - IDF 50 B, 1985. Métodos de Amostragem para Leite e Produtos Lácteos.

2.4. Norma ISO 950, 1979. Amostragem de Cereais em Grãos.

2.5. Waltking, A. E, 1980. Amostragem e Preparação de Amostras de Manteiga de Amendoim para Análise de Aflatoxinas, Jornal AOAC 63:103-106.

##### 3. REQUISITOS

## LIMITES MÁXIMOS ADMISSÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS

ALIMENTO	AFLATOXINA	LIMITE
1. Leite 1.1. Leite fluido 1.2. Leite em pó	M 1 M 1	0,5 µg/L 5,0 µg/kg
2. Milho 2.1. Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído). 2.2. Farinhas ou sêmolas de milho	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 µg/kg
3. Amendoim 3.1. Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), 3.2. Pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim)	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 µg/kg

## 4. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

## 4.1. Leite

Para a coleta de amostras de leite em pó e leite fluido, utilizar a Norma FIL - IDF 50 B, 1985, Métodos de Amostragem para Leite e Produtos Lácteos e/ou suas atualizações. As amostras de leite fluido ou em pó serão subdivididas no mínimo em três subamostras. As subamostras de leite fluido se conservarão congeladas; as subamostras de leite em pó serão armazenados em embalagens impermeáveis, em umidade relativa máxima de 60% à temperatura máxima de 25° C. A alíquota do leite em pó para análise será de 25 g (em vez dos 5 gramas indicados no procedimento AOAC 980.21, 1990), que serão dissolvidos em 250 ml e homogeneizados, tomando-se desta suspensão uma alíquota de 50 ml e daí seguindo como indicado no procedimento citado.

## 4.2. Milho e Amendoim

Os planos de amostragem de milho e de amendoim serão executados tomando como base as recomendações dos Planos de Amostragem para Análise de Aflatoxinas em Milho e Amendoim - FAO Food and Nutrition Paper 55, 1993, devendo ser utilizada a Norma de Amostragem ISO 950, 1979 - Amostragem de Cereais em Grãos. A amostra de milho para laboratório (de 5 kg) será moída em malha 20, em sua totalidade, homogeneizada e posteriormente, subamostrada, no mínimo, em três partes. Poderá ser tomada uma quarta subamostra para análise de rotina. A amostra de amendoim para laboratório (de 5 kg) será transformada em pasta homogênea ou moída em malha 14, em sua totalidade, homogeneizada e posteriormente, dividida no mínimo em três partes, podendo ser tomada uma quarta amostra para análise de rotina. As amostras e subamostras de milho e de amendoim serão armazenadas em embalagem de papel, algodão ou outro material apropriado em umidade relativa máxima de 60% à temperatura máxima de 25°C.

## 4.3. Farinha de Milho

No produto embalado: Será considerado um lote de 50 toneladas ou menor. Será coletado, aleatoriamente, um número de unidades igual a raiz quadrada do número de componentes do lote ou 1% (um por cento) dos mesmos, optando-se pelo menor deles. Quando o número de unidades calculado for fracionário, será tomado o número inteiro superior. De cada uma das unidades será extraído um mínimo de 50 g. Estas alíquotas serão homogeneizadas e pelo menor de 300 g serão divididas em três subamostras. Podendo ser tomada uma quarta subamostra para análise de rotina.

Para o produto a granel: Proceder como indicado no ponto 4.2 para milho a granel.

Pasta de Amendoim (pasta ou manteiga de amendoim)

Adotar o procedimento de amostragem descrito na Referência 2.5.

## 5. MÉTODOS DE ANÁLISE

## 5.1. Métodos de Análise de Referência

5.1.1. Leite - Na determinação da Aflatoxina M 1 no leite fluido e no leite em pó, utilizar o procedimento AOAC 980.21, citado na Referência (2.2), e/ou suas respectivas atualizações. O controle das soluções padrões deverá observar os procedimentos AOAC 970.44 e 971.22, integrantes da referência supramencionada.

5.1.2. Milho - Na determinação de aflatoxinas totais (B1 + B2 + G1 + G2) no Milho, na Farinha ou Sêmola de Milho, utilizar o procedimento AOAC 968.22, citado na referência (2.2), e/ou suas respectivas atualizações. O

controle das soluções padrões deverá observar os procedimentos AOAC 970.44 e 971.22, integrantes da referência supramencionada.

5.1.3 Amendoim - Na determinação de Aflatoxinas Totais (B1 + B2 + G1 + G2) no amendoim e pasta de amendoim, utilizar o procedimento AOAC 970.45, citado na Referência (2.2), e/ou suas respectivas atualizações. O controle das soluções padrões deverá observar os procedimentos AOAC 970.44 e 971.22, integrantes da referência supramencionada.

5.2. Métodos de Análise de Rotina - Para a determinação de aflatoxinas no leite líquido, no leite em pó, no milho, na farinha de milho, no amendoim, na pasta de amendoim, deverão ser observados os procedimentos analíticos de rotina utilizados normalmente no país, desde que estejam validados internacionalmente.

#### 6. CRITÉRIOS PARA ACEITAÇÃO E REJEIÇÃO DO LOTE

6.1. Se na análise da primeira subamostra de milho, farinha de milho, amendoim, ou pasta de amendoim, o resultado for igual ou menor que 20 µg/kg de aflatoxinas totais, o lote será aceito. Se o resultado da análise for superior a 20 µg/kg de aflatoxinas totais, o lote será rejeitado.

6.2. Se na análise da primeira subamostra de leite, o resultado for igual ou menor que 0,5 µg/L de aflatoxina M1 para leite líquido, ou igual ou menor que 5,0 µg/kg de aflatoxina M1 para leite em pó, o lote será aceito. Se o resultado da análise for superior aos valores supramencionados, o lote será rejeitado.

6.3. No caso do lote rejeitado na primeira análise, a requerimento da parte interessada, o laboratório que realizou a primeira análise, efetuará a análise da segunda subamostra, na presença dos peritos técnicos indicados pelas partes envolvidas.

6.4. No caso de haver discordância entre os resultados analíticos da primeira e da segunda subamostra, poderá ser realizada pelo mesmo laboratório, a análise da terceira subamostra, sendo o seu resultado inapelável.

6.5. Na análise da segunda e terceira subamostras, serão adotados os mesmos critérios de aceitação ou rejeição para os lotes, estabelecidos nos itens 6.1 e 6.2 desta Resolução.

#### atos relacionados:

- [Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977](#)

## ANEXO B – Portaria nº 183, de 21 de março de 1996

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA.  
GABINETE DO MINISTRO.

PORTARIA Nº 183, DE 21 DE MARÇO DE 1996.

Adota Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho.

O Ministro de Estado da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, no uso da atribuição que lhe confere o artigo 87, li, da Constituição da República, e nos termos do disposto nos Capítulos I e II do Regulamento da Defesa Sanitária Vegetal, aprovado pelo Decreto nº. 24.114, de abril de 1934, e

Considerando que, os Estados-Parte do Mercado Comum do Sul – MERCOSUL concordaram em estabelecer limites máximos admissíveis para aflatoxinas no leite "in natura", em pó, amendoim em massa, milho em grão, farinha ou farinha de milho;

Considerando que a Resolução nº 56/94, de 1º de janeiro de 1995 do Grupo Mercado Comum no Sul, aprovou o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, Amendoim e Milho;

Considerando que a necessidade de fixar-se limites máximos de resíduos de praguicidas no alho, cebola, morango, arroz, maçã, pêra, batata e tomate;

Considerando que as Resoluções ns. 23/94, de 1º de janeiro de 1995 e 74/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, aprovaram os Regulamentos Técnicos MERCOSUL sobre limites máximos de resíduos de praguicidas em alho, arroz, cebola, morango, maçã, batata, pêra e tomate, "in natura";

Considerando que a conveniência de atribui-se categorias funcionais correspondentes aos aditivos alimentares aprovados e incluídos na lista harmonizada do MERCOSUL, e que tal atribuição será útil, para estabelecer as categorias funcionais em que serão classificados os distintos aditivos alimentares;

Considerando que a Resolução nº 101/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, aprovou as categorias funcionais atribuídas aos aditivos alimentares;

Considerando que a conveniência de estabelecer-se limites máximos de tolerância de contaminantes inorgânicos em alimentos e que os Estados-Parte do MERCOSUL concordam em estabelecer, inicialmente, limites máximos de tolerância para determinados alimentos;

Considerando que a Resolução nº 102/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, aprovou limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos em determinados alimentos;

Considerando que os Estados-Parte do MERCOSUL acordaram estabelecer Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos, que serão aplicáveis a micotoxinas, contaminantes inorgânicos, praguicidas, drogas veterinárias e migrantes provenientes de embalagens e equipamentos em contato com alimento;

Considerando que a Resolução nº 103/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, aprovou em caráter recomendatório os Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos; Considerando que a necessidade de estabelecer-se uma Lista Geral Harmonizada para o MERCOSUL de Aditivos Alimentares;

Considerando que a Resolução nº 19/93, de 1º de janeiro de 1994, do Grupo Mercado Comum do Sul, aprovou a Lista Geral Harmonizada de Aditivos MERCOSUL e que a Resolução nº 104/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, aprovou inclusão de novos aditivos à Lista Geral;

Considerando que a necessidade de definir-se o marco regulatório para a transferência de aditivos alimentares;

Considerando que a Resolução nº 105/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, aprovou os Princípios de Transferência de Aditivos Alimentares;

Considerando que a necessidade de estabelecer-se as características que devem cumprir os amidos a serem utilizados na indústria alimentícia, no que concerne ao intercâmbio comercial do MERCOSUL;

Considerando que a Resolução nº 106/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, estabelece as características que devem cumprir os amidos a serem utilizados na indústria alimentícia;

Considerando que a necessidade de estabelecer-se funções correspondentes aos aditivos alimentares incluídos na Lista Harmonizada do MERCOSUL;

Considerando que a Resolução nº 91/93, de 12 de janeiro de 1994, do Grupo Mercado Comum do Sul, define as funções correspondentes aos aditivos alimentares e que a Resolução nº 107/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul, introduz uma nova função e sua correspondente definição;

Considerando que a harmonização dos regulamentos técnicos e dos limites máximos de resíduos de praguicidas e de contaminantes inorgânicos em alimentos, das categorias funcionais de aditivos alimentares, dos princípios gerais para estabelecimento de níveis máximos de contaminantes em alimentos tenderá a eliminar os obstáculos que geram as diferenças dos regulamentos técnicos nacionais;

Considerando que a necessidade de atender-se às normas da Organização Mundial do Comércio - OMC, que estabelecem prazo de 60 dias para entrada em vigor de dispositivos que afetem ou regulem o comércio internacional de vegetais e suas partes, resolve:

**Art. 1º Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, Amendoim e Milho, aprovado pela Resolução nº 56/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.**

Art. 2º Permitir a plena comercialização intra-regional dos alimentos mencionados que cumpram com o estabelecido no Regulamento Técnico citado no artigo 1º.

Art. 3º Adotar os Regulamentos Técnicos MERCOSUL sobre limites máximos de praguicidas para os produtos agrícolas alimentícios "in natura": alho, cebola, morango, maçã, pêra, batata e tomate, aprovados pelas Resoluções ns. 23/94 e 74/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 4º Adotar as categorias funcionais atribuídas aos aditivos alimentares aprovadas pela Resolução nº 101/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 5º Adotar os limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos aprovados pela Resolução nº. 102/94, de 12 de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 6º Adotar os Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos, aprovados pela Resolução nº 103/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 7º Adotar a Lista Geral Harmonizada de Aditivos MERCOSUL aprovada pela Resolução nº 19/93, de 1º de janeiro de 1994, do Grupo Mercado Comum do Sul, e os

novos aditivos incorporados, aprovados pela Resolução nº 104/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 8º Adotar os Princípios de Transferência de Aditivos Alimentares aprovados pela Resolução nº 105/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 9º Adotar as características que devem possuir os amidos a serem utilizados na indústria alimentícia estabelecidas pela Resolução nº 106/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 10. Adotar as funções correspondentes aos aditivos alimentares definidas pela Resolução nº 91/93, de 1º de janeiro de 1994, do Grupo Mercado Comum do Sul, e a nova função e sua correspondente definição, aprovada pela Resolução nº 107/94, de 1º de janeiro de 1995, do Grupo Mercado Comum do Sul.

Art. 11. Os Regulamentos Técnicos, Categorias Funcionais, Limites Máximos de Aflatoxinas, Princípios Gerais, Lista Geral Harmonizada de Aditivos, Princípios de Transferência de Aditivos, Característica dos Amidos e Funções dos Aditivos, citados nesta Portaria estão publicados na íntegra, em Suplemento Especial do "Diário Oficial" do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária.

Art. 12. Conceder o prazo de 60 dias para manifestação pública com objetivo de adequação das Normas propostas.

Art. 13. Esta Portaria entra em vigor no dia 2 de junho de 1996, revogadas as disposições em contrário.

José Eduardo de Andrade Vieira  
Ministro da Agricultura, do Abastecimento e da  
Reforma Agrária.

ANEXOS INTEGRANTES À RESOLUÇÃO MERCOSUL/GMC n° 56/94  
Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Aflatoxinas.

Tendo em vista, o Artigo 13 do Tratado de Assunção, o Artigo 10 da Decisão n° 4/91 do Conselho do Mercado Comum, a Resolução n° 91/93 do Grupo Mercado Comum, e a Recomendação n° 38/94 do SGT n° 3 - Normas Técnicas;

Considerando que os Estados-Parte concordaram em estabelecer limites máximos admissíveis para aflatoxinas no leite, leite em pó, amendoim em massa, milho em grão e farinha ou farinha de milho;

Considerando que a harmonização dos regulamentos técnicos visará a eliminar os obstáculos que geram as diferenças dos regulamentos técnicos nacionais, o Grupo Mercado Comum, resolve:

Art. 1° Aprovar o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, Amendoim e Milho que consta como anexo da presente Resolução.

Art. 2° Os Estados-Parte não poderão proibir nem restringir a comercialização dos alimentos mencionados no Artigo 1° que cumpram com o estabelecido no anexo da presente Resolução.

Art. 3° Os Estados-Parte colocarão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente Resolução através dos seguintes órgãos.

**Argentina:**

Ministerio de Salud y Acción Social,  
Ministerio de Economía Obras y Servicios Públicos,  
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SENASA)  
(Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal).

**Brasil:**

Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária.

**Paraguay:**

Ministerio da Salud Pública e Bienestar Social,  
Ministerio de Agrcultura y Ganadería.

**Uruguay:**

Ministerio de Salud Pública,  
Ministerio de Industria, Energía y Minería (Laboratorio Tecnológico del Uruguay),  
Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Art. 4° (Omissão).

Art. 5° A presente Resolução entrará em vigor no dia 1° de janeiro de 1995.

**ANEXO C – Portaria nº 11, de 12 de abril de 1996**

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA.  
SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO RURAL.

**PORTARIA Nº 11, DE 12 DE ABRIL DE 1996.**

O SECRETÁRIO DE DESENVOLVIMENTO RURAL. DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA, no uso das atribuições que lhe confere o Artigo 42, item VII, do Regimento Interno, aprovado pela Portaria Ministerial nº 787, de 15 de dezembro de 1993, tendo em vista o disposto na Lei nº 6.305, de 15 de dezembro de 1975, e no Decreto nº 82.110, de 14 de agosto de 1978, e

Considerando a importância da atualização e adequação da Portaria nº 845, de 08 de novembro de 1976, no que se refere a conceitos e critérios para a classificação do MILHO:

Considerando a necessidade premente de uniformização dos procedimentos para a classificação do produto em âmbito nacional.

Art. 1º - Definir os conceitos relativos ao grão de milho que seja considerado como mofado, fermentado até  $\frac{1}{4}$ , fragmento e prejudicado por diferentes causas, omitidos na Portaria nº 845/76 e de especial importância na determinação da qualidade do produto.

Art. 2º - Aprovar os critérios e os procedimentos em anexo para a classificação do Milho.

Art. 3º - Estabelecer que para efeito de classificação oficial deverão ser exclusivamente observados os parâmetros, critérios e procedimentos previstos na Norma de Identidade e Qualidade do produto e nesta Portaria complementar.  
Parágrafo único: Os critérios e procedimentos estabelecidos nesta Portaria deverão ser utilizados em caráter temporário, até a conclusão dos trabalhos de reformulação do padrão vigente.

Art. 4º - Os casos omissos serão resolvidos pelo Secretário de Desenvolvimento Rural.

Art. 5º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

MURILO XAVIER FLORES

**ANEXO - CRITÉRIOS E OS PROCEDIMENTOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DO MILHO.**