



UFSM

Dissertação de Mestrado

**MICOTOXINAS EM MATRIZES DE MILHO E TRIGO:
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO
EM DIFERENTES PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA E COMERCIAL**

Darlina Mello Souza

PPGQ

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**MICOTOXINAS EM MATRIZES DE MILHO E TRIGO:
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO
EM DIFERENTES PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA E COMERCIAL**

por

Darlina Mello Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,
Área de Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria
(RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

Santa Maria, RS – Brasil

2014

Souza, Darliana Mello

Micotoxinas em matrizes de milho e trigo: Validação de método analítico por UPLC-MS/MS e monitoramento em diferentes pontos da cadeia produtiva e comercial / Darliana Mello Souza.-2014.

181 p.; 30cm

Orientadora: Ionara Regina Pizzutti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2014

1. Micotoxinas 2. Milho 3. Trigo 4. UPLC-MS/MS 5. QuEChERS modificado I. Pizzutti, Ionara Regina II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**MICOTOXINAS EM MATRIZES DE MILHO E TRIGO:
VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO
EM DIFERENTES PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA E COMERCIAL**

Elaborada por

Darlina Mello Souza

como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª Drª Ionara Regina Pizzutti (Orientadora)
Universidade Federal de Santa Maria

Drª Caroline Wesp Guterres
Cooperativa Central Gaúcha Ltda

Profª Drª Marina Venturini Copetti
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Ivalmir e Vera, por dedicarem as suas vidas a mim e por nunca medirem esforços para que minha vida tivesse vitórias como estas.

As minhas irmãs, Luciane e Carliana.

Ao meu namorado Rudinei, meu grande incentivador, incondicionalmente sempre ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço todos os dias por ter vocês em minha vida. Obrigada por todo apoio, incentivo, amor e ensinamentos. Essa vitória é de vocês e por vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação** em Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de execução deste trabalho.

À Prof. **Ionara Regina Pizzutti**, pela orientação neste trabalho e durante toda a minha iniciação científica. Obrigada por todo apoio e aprendizado durante todos estes anos. Obrigada pela confiança e por toda a infraestrutura proporcionada.

Aos **professores** e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química.

À **Caroline Wesp Guterres** e **Marina Venturini Copetti**, pela participação da banca examinadora, mas mais que isto, pelo apoio constante, paciência e compreensão, e assim como todas as contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **colegas do CEPARC**, aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, assim como a todos aqueles que passaram pelo grupo ao longo desta jornada, com os quais eu pude conviver e aprender.

A cada **empresa colaboradora**, as quais foram fundamentais para que o projeto pudesse ser executado e tomasse forma. Obrigada a todas as pessoas envolvidas de cada uma destas empresas, pela oportunidade de execução deste projeto, pelo apoio e por conceder as amostras e informações relevantes para este trabalho (Não irei citar o nome das empresas para que o sigilo das amostras seja mantido, a todos os meus sinceros agradecimentos).

Agradeço também à **Juliana Bruinsma, Ana Paula Valentini, Juliano Wagner, Felipe Zambonato, Cesar Pierezan, Marcelo Neves, Caroline Wesp, Rudinei Boss e Jaqueline Reichert**. Vocês foram fundamentais para que este projeto pudesse sair do papel e se concretizar. Sou imensamente grata por todo apoio, por toda a contribuição e pela confiança de vocês.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pelo apoio financeiro.

“Tenho a impressão de ter sido
uma criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedrinha
mais lisa ou um a concha mais bonita que
as outras, enquanto o imenso oceano da verdade
continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

"Só fazemos melhor aquilo
que repetidamente insistimos em melhorar.

A busca da excelência não deve ser um
objetivo, e sim um hábito.

(Aristóteles)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE APÊNDICES	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XX
RESUMO	XXIV
ABSTRACT	XXV
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.1.1 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 MICOTOXINAS	6
3.1.1 Produção de micotoxinas	8
3.1.2 Principais gêneros de fungos micotoxigênicos.....	10
3.1.2.1 Aspergillus	11
3.1.2.2 Penicillium	12
3.1.2.3 Fusarium.....	13
3.1.2.3.1 Principais patologias causadas por Fusarium em milho e trigo	14
3.1.3 Micotoxinas Seleccionadas	15
3.1.3.1 Aflatoxinas.....	15
3.1.3.2 Tricotecenos	16
3.1.3.2.1 Desoxinivalenol	18
3.1.3.3 Fumonisinias	19
3.1.3.4 Ocratoxina.....	20
3.1.3.5 Zearalenona	21
3.1.4 Co-ocorrência de micotoxinas: efeitos aditivos, sinérgicos	23
3.2 CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS FÚNGICAS	23
3.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MICOTOXINAS.....	26
3.4 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS.....	28

3.4.1 Amostragem	29
3.4.2 Preparo da amostra	30
3.4.3 Determinação instrumental	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAIS	36
4.1.1 Instrumentos e acessórios	36
4.1.2 Reagentes e soluções	37
4.1.3 Gases	37
4.1.4 Insumos	37
4.1.5 Micotoxinas selecionadas	38
4.2 MÉTODOS	38
4.2.1 Preparo das soluções analíticas	38
4.2.1.1 Preparo das soluções estoque	38
4.2.1.2 Preparo da solução mistura e das soluções analíticas de trabalho	41
4.2.2 Avaliação de amostras “branco”	44
4.2.3 Método analítico multirresíduo para determinação de micotoxinas	44
4.2.3.1 Preparo da amostra e procedimento de extração	45
4.2.3.2 Condições cromatográficas	46
4.2.3.3 Validação	47
4.2.3.3.1 Curva analítica e linearidade	48
4.2.3.3.2 Avaliação do efeito matriz	49
4.2.3.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação	50
4.2.3.3.4 Procedimento de fortificação e recuperação	51
4.2.4 Amostragem para aplicação do método em amostras reais	52
4.2.4.1 Ensaio a campo	52
4.2.4.1.1 Ensaio com genótipos de trigo em distintas localidades	53
4.2.4.1.2 Ensaio com genótipos de trigo com diferentes reações de resistência à giberela	54
4.2.4.1.3 Ensaio com diferentes fungicidas	54
4.2.4.2 Amostras de trigo importadas e para exportação	55
4.2.4.3 Amostras de trigo e seus subprodutos do processo de moagem	55
4.2.4.4 Amostras de farinha de trigo coletadas em supermercados	56
4.2.4.5 Amostras de milho para exportação	56
4.2.4.6 Amostras de farinha de milho coletadas em supermercados	56
4.2.4.7 Amostras destinadas à alimentação animal	57
4.2.5 Análises estatísticas	57

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	58
5.1 MÉTODO ANALÍTICO	59
5.1.1 Validação de método analítico multirresíduo para determinação de micotoxinas em trigo	64
5.1.1.1 Avaliação da amostra “branco”.....	64
5.1.1.2 Curva analítica e linearidade	65
5.1.1.3 Efeito matriz	66
5.1.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação	72
5.1.1.5 Ensaio de fortificação e recuperação	73
5.1.2 Validação de método analítico multirresíduo para determinação de micotoxinas em milho	74
5.1.2.1 Avaliação da amostra “branco”.....	74
5.1.2.2 Curva analítica e linearidade	75
5.1.2.3 Efeito matriz	76
5.1.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação	79
5.1.2.5 Ensaio de fortificação e recuperação	79
5.2 MONITORAMENTO.....	80
5.2.1 Ensaio a campo	81
5.2.1.1 Ensaio com genótipos de trigo em distintas localidades	81
5.2.1.2 Ensaio com genótipos de trigo com diferentes reações de resistência a giberela	87
5.2.1.3 Ensaio com diferentes fungicidas.....	94
5.2.2 Amostras de trigo importado e destinado a exportação	99
5.2.2.1 Amostras de trigo importado	99
5.2.2.2 Amostras de trigo para exportação.....	101
5.2.3 Amostras de trigo e seus subprodutos do processo de moagem	105
5.2.4 Avaliação de farinhas de trigo coletadas em supermercados.....	109
5.2.5 Amostras de milho para exportação	112
5.2.6 Amostras destinadas à ração animal	116
5.2.7 Amostras de farinhas de milho coletadas em supermercados	120
6 CONCLUSÃO	125
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
8 APÊNDICES	158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de crescimento fúngico e localização da síntese de micotoxinas.	6
Figura 2. Condições de atividade de água e temperatura para desenvolvimento dos fungos.....	9
Figura 3. Diagrama esquemático da influência da combinação da atividade da água e do pH sobre o crescimento microbiano	10
Figura 4. Estruturas químicas das Aflatoxinas: (a) AFLA B ₁ e B ₂ ; (b) AFLA G ₁ e G ₂	16
Figura 5. Estrutura principal dos tricotecenos e estruturas gerais dos tricotecenos do Tipo A, B, C e D	17
Figura 6. Estrutura química geral e substituintes da principais fumonisinas.....	20
Figura 7. Estrutura química geral e principais substituintes das ocratoxinas.....	21
Figura 8. Estrutura química da zearalenona e seus compostos relacionados.....	22
Figura 9. (a) Anteras inclusas; (b) Anteras parcialmente exclusas ou presas; e (c) Anteras totalmente exclusas	25
Figura 10. Variabilidade associada com o procedimento para determinação de micotoxinas	29
Figura 11. Distribuição dos analitos em um lote. (a) Distribuição não homogênea (b) distribuição homogênea	30
Figura 12. Tendências na análise de micotoxinas a partir da perspectiva do tempo (1960–2010).....	32
Figura 13. Representação do método de extração utilizado para determinação de micotoxinas em milho e trigo.	45
Figura 14. Regiões homogêneas de adaptação de cultivares de trigo no Rio Grande do Sul, com destaque para as três localidades em estudo.	53

Figura 15. Cromatograma do padrão interno do procedimento Quinalfós, na concentração de 12, 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	60
Figura 16. Cromatograma do padrão interno do instrumento Propoxur, na concentração de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	60
Figura 17. Cromatograma das micotoxinas em estudo com o tempo de retenção de cada um dos analitos.	63
Figura 18. Cromatograma do extrato “branco” da matriz de trigo.....	64
Figura 19. Curva analítica preparada a partir das soluções analíticas da micotoxina Zearalenona em solvente orgânico e em extrato de matriz em 7 concentrações (5 – 2500 ng mL^{-1}).	67
Figura 20. Cromatograma obtido para Fumonisina B ₁ por UPLC-MS/MS, na concentração de 25 ng mL^{-1} , em solvente orgânico; (a) transição de quantificação e (b) transição de confirmação.	69
Figura 21. Cromatograma obtido para Fumonisina B ₁ por UPLC-MS/MS, na concentração de 25 ng mL^{-1} , em extrato de trigo; (a) transição de quantificação e (b) de confirmação.....	69
Figura 22. Cromatograma obtido para Toxina T-2 por UPLC-MS/MS, em solução analítica preparada na concentração de 50 ng mL^{-1} ; (a) transição de quantificação em extrato de trigo e (b) transição de confirmação em extrato de trigo; (c) transição de quantificação em solvente orgânico; (d) transição de confirmação em solvente orgânico.....	68
Figura 23. Curva analítica preparada a partir das soluções analíticas da micotoxina Desoxinivalenol, em solvente orgânico e em extrato de matriz (5 – 2500 ng mL^{-1}). .	70
Figura 24. Percentual do efeito matriz calculado a partir das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato de trigo.	71
Figura 25. Cromatograma do extrato “branco” de milho.....	74

- Figura 26.** Percentual de efeito matriz obtidos através do cálculo a partir das inclinações das curvas analíticas confeccionadas através das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato de milho.77
- Figura 27.** Comparação entre o efeito matriz exercido pela matriz milho e aquele apresentado pela matriz trigo, calculado a partir das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato de matriz (7 concentrações)78
- Figura 28.** Dados de precipitação, temperatura mínima e temperatura máxima de Cruz Alta, São Luiz Gonzada e Santa Rosa do período de 83 a 115 dias após a data de plantio. (Temperaturas mínima e máxima não disponíveis para a cidade de Santa Rosa para os dias 109 a 115). Figura elaborada a partir de dados do Instituto Nacional de Meteorologia.....83
- Figura 29.** Comparação de médias pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro para presença da micotoxina DON em treze linhagens de trigo cultivado em três ambientes. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre locais para um mesmo cultivar, enquanto que letras minúsculas indicam diferença estatística entre linhagens para um determinado local. A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as repetições.84
- Figura 30.** Dispersão gráfica dos valores de correlação de Pearson entre São Luiz Gonzaga e Cruz Alta, São Luiz Gonzaga e Santa Rosa e Cruz Alta e Santa Rosa para a micotoxina DON em amostras de treze linhagens de trigo. *Valores não significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste *t*. **Valores significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste *t*.86
- Figura 31.** Concentração de DON em cada cultivar, quando tratados com uma aplicação de fungicida (25-50% de floração), duas aplicações de fungicidas (25-50% de floração e a segunda 10 dias após a aplicação anterior) e a testemunha não tratada. Médias com letras minúsculas iguais não diferem quanto ao número de aplicações para um mesmo cultivar pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as repetições.....88

- Figura 32.** Dispersão gráfica dos valores de correlação de Pearson entre as concentrações de DON e a reação de resistência à giberela quando há uma aplicação de fungicida, duas aplicações de fungicidas e nenhuma aplicação (testemunha não tratada). *Valores não significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste *t*. **Valores significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste *t*.89
- Figura 33.** Índice de giberela em cada cultivar, quando tratados com uma aplicação de fungicida, duas aplicações de fungicidas e a testemunha não tratada comparada às concentrações de DON. Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença estatística no índice de giberela quanto ao número de aplicações para um mesmo cultivar pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).92
- Figura 34.** Rendimento de cada cultivar com uma, duas ou sem aplicações de fungicidas. Médias com letras minúsculas iguais para uma mesma cultivar não diferem em rendimento pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).93
- Figura 35.** Concentração de DON para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada. Médias com letras minúsculas iguais não diferem quanto ao fungicida aplicado pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). A barra de erro representa o desvio padrão médio entre as repetições.95
- Figura 36.** Índice de giberela e concentrações de DON para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada.97
- Figura 37.** Rendimento de grãos e concentrações DON para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada.98
- Figura 38.** Rendimento de grãos e índice de giberela para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada.98
- Figura 39.** Contaminação por DON em amostras de grãos de trigo, importadas da Argentina através do Porto de Bahia Blanca, coletadas no ano de 2013.99
- Figura 40.** Contaminação por micotoxinas em 30 amostras de trigo para exportação no sul do Brasil. 102

- Figura 41.** Desoxinivalenol em grãos de trigo antes e após etapa de limpeza e remoção de impurezas. 105
- Figura 42.** Micotoxinas em grãos de trigo após a etapa de limpeza e antes da moagem. 106
- Figura 43.** Concentração de DON nas frações obtidas dos grãos de trigo após a moagem: farinha branca e farelo..... 106
- Figura 44.** Porcentagem da concentração de DON na fração farelo e na fração farinha comparado a contaminação inicial do grão. 108
- Figura 45.** Comparação de médias pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro para presença da micotoxina DON em amostras de farinha de trigo. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre locais de coleta, enquanto que letras minúsculas indicam diferença estatística amostras oriundas do mesmo local. A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as repetições..... 110
- Figura 46.** Ocorrência de micotoxinas em amostras de grãos de milho destinadas a exportação, coletadas no ano de 2013. 113
- Figura 47.** Concentração de micotoxinas presentes em amostras de grãos de milho utilizadas como matéria prima para fabricação de ração animal..... 116
- Figura 48.** Concentração de micotoxinas presentes em amostras de quirera de milho utilizadas como matéria prima para fabricação de ração animal..... 117
- Figura 47.** Co-ocorrência de micotoxinas em amostras de farinha de milho coletadas na cidade de Cruz Alta – RS. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os meses de coleta para ocorrência de determinada micotoxina. A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as coletas realizadas no mês. . 121
- Figura 48.** Co-ocorrência de micotoxinas em amostras de farinha de milho coletadas na cidade de Santa Maria – RS. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os meses de coleta para ocorrência de determinada micotoxina. A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as coletas realizadas no mês. 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais micotoxinas produzidas por <i>Aspergillus</i> ssp.	11
Tabela 2. Principais micotoxinas produzidas por <i>Penicillium</i> ssp.	12
Tabela 3. Principais micotoxinas produzidas por <i>Fusarium</i> ssp.	13
Tabela 4. Limites máximos tolerados para micotoxinas em cada produto alimentar e os prazos estabelecidos para aplicação da legislação brasileira.	26
Tabela 5. Resumo de métodos multimicotoxinas publicados em 2013 para análise de cereais e derivados por LC-MS/MS.	34
Tabela 6. Preparo das soluções estoque das 12 micotoxinas em estudo.	39
Tabela 7. Informações para correção da concentração de soluções analíticas de micotoxinas por espectrofotometria UV-Vis.	41
Tabela 8. Fornecedores dos materiais de referência, solventes utilizados no preparo das soluções analíticas estoque e concentrações das micotoxinas nas soluções estoques e na solução mistura.	42
Tabela 9. Concentração final das micotoxinas nas soluções das curvas analíticas.	43
Tabela 10. Condições instrumentais para determinação de micotoxinas empregando UPLC-MS/MS, com ionização por ESI no modo positivo, em amostras de milho e trigo.	47
Tabela 11. Níveis de fortificação aplicados para o estudo de recuperação.	52
Tabela 12. Tratamentos fungicidas aplicados na cultivar de trigo selecionada para o controle de giberela.	55
Tabela 13. Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho obtidos pela análise cromatográfica das soluções analíticas preparadas em solvente e no extrato de trigo, para cada uma das micotoxinas.	65

Tabela 14. Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada nas curvas analíticas para cada nível de concentração.	66
Tabela 15. Estimativa dos limites de detecção e de quantificação calculados e limite de quantificação real do método.	72
Tabela 16. Média dos percentuais de recuperação e RSD% dos extratos das amostras de trigo fortificadas nos 3 níveis de concentração estudado.	73
Tabela 17. Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho obtidos, para cada micotoxina, pela análise por UPLC-MS/MS das soluções analíticas preparadas em solvente e no extrato de milho.....	75
Tabela 18. Percentual de efeito matriz observado para cada concentração das soluções analíticas no estudo de linearidade das curvas analíticas.....	77
Tabela 19. Estimativas dos limites de detecção e de quantificação calculados, para o instrumento e para o método, e limite de quantificação real do método.	79
Tabela 20. Média dos percentuais de recuperação e dos valores de RSD% obtidos através do estudo de fortificação e recuperação em milho, nas 3 concentrações de fortificação estudadas.	80
Tabela 21. Efeitos significativos ($p < 0,01$) para os fatores ambientes, cultivares e interação cultivares x ambientes.	82
Tabela 23. Concentração de micotoxinas determinadas na fração farelo.	107

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Cálculo do fator de correção do espectrofotômetro UV-Vis	159
Apêndice 2. Cálculo para correção da concentração da solução analítica de Aflatoxina B ₁	160
Apêndice 3. Preparo das soluções analíticas de micotoxina utilizadas para confecção da curva analítica.....	161
Apêndice 4. Concentrações de DON em linhagens cultivadas nas cidades de Cruz Alta, Santa Rosa e São Luiz Gonzaga.....	162
Apêndice 5. Concentrações da micotoxina DON em genótipos de trigo sem e com diferentes manejos de fungicida no florescimento de grãos.....	164
Apêndice 6. Rendimento de grãos e índice de giberela em genótipos de trigo sem e com diferentes manejos de fungicida no florescimento de grãos.....	167
Apêndice 7. Tratamentos fungicida aplicados na cultivar de trigo selecionada para o controle de giberela e concentrações de DON.....	168
Apêndice 8. Concentrações de DON em amostras de trigo importadas da Argentina através do Porto de Bahia Blanca.....	170
Apêndice 9. Contaminação por micotoxinas em 30 amostras de trigo tipo exportação oriundas do sul do Brasil.	171
Apêndice 10. Concentrações de DON em grãos de trigo antes de uma etapa de limpeza, após a etapa de limpeza e em seus sub-produtos da moagem (farelo e farinha)	172
Apêndice 11. Concentrações de DON em farinhas de trigo coletadas em supermercados na cidade de Cruz Alta – RS, no ano de 2013.....	173
Apêndice 12. Concentrações de DON em farinhas de trigo coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria – RS, no ano de 2013.	174

Apêndice 13. Concentração de micotoxinas em milho tipo exportação.	175
Apêndice 14. Concentração de micotoxinas em grãos de milho utilizados para fabricação de ração animal.	176
Apêndice 15. Concentração de micotoxinas em quirera de milho utilizada para fabricação de ração animal.	177
Apêndice 16. Concentração de micotoxinas em farinha de milho coletadas em supermercados na cidade de Cruz Alta – RS, no ano de 2013.....	178
Apêndice 17. Concentração de micotoxinas em farinha de milho coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria – RS, no ano de 2013.	180

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3-ADON – 3-acetildesoxinivalenol

15-ADON – 15-acetildesoxinivalenol

ϵ – Absortividade molar

a – coeficiente angular

A – Absorbância

AFLA – Aflatoxina

AFLA B₁ – Aflatoxina B₁

AFLA B₂ – Aflatoxina B₂

AFLA G₁ – Aflatoxina G₁

AFLA G₂ – Aflatoxina G₂

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – do idioma inglês, *Association of Official Agricultural Chemists*

AP – aminopentol

A_w – Atividade de água, do inglês *Water activity*

b – coeficiente linear

C – Concentração

CEPARC – Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes

DAS – Diacetoxiscirpenol

DL₅₀ – Dose letal mediana

DON – Desoxinivalenol

ESI – Ionização por eletronebulização, do idioma inglês *Electrospray Ionization*

EUA – Estados Unidos da América

FB₁ – Fumonisina B₁

FB₂ – Fumonisina B₂

FB₃ – Fumonisina B₃

FC – Fator de correção do equipamento

FD – Fator de diluição da solução contendo o analito

GC – Cromatografia gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do idioma inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HT-2 – Toxina HT-2

I – Incidência da doença (giberela)

IARC – Agência Internacional para pesquisa sobre o câncer, do idioma inglês *International Agency for Research on Cancer*

IEC – Comissão Eletrotécnica Internacional, do idioma inglês *International Electrotechnical Commission*

IG – Índice de giberela

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO – Organização Internacional para Padronização, do idioma inglês *International Organization for Standardization*

LC – Cromatografia Líquida, do idioma inglês *Liquid Chromatography*

LC-MS – Cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massas

LMT – Limite máximo tolerável

LOD – Limite de detecção, do idioma inglês *Limit of Detection*

LOD_m – Limite de detecção do método

LOD_i – Limite de detecção do instrumento

LOQ – Limite de quantificação, do idioma inglês *Limit of Quantitation*

LOQ_m – Limite de quantificação do método

LOQ_i – Limite de quantificação do instrumento

MRC – Material de referência certificado

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do idioma inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de massas, do idioma inglês *Mass Spectrometry*

MS/MS – Espectrometria de massas em série, do idioma inglês *Tandem Mass Spectrometry*

m/z – Razão massa/carga, do idioma inglês *Mass to Charge Ratio*

NBR – Norma Brasileira

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do idioma inglês *National Institute of Standards and Technology*

n.d. – Não detectado

NEO – Neosolaniol

NIV – Nivalenol

OTA – Ocratoxina A

PCB – Bifenilas policloradas, do idioma inglês *Polychlorinated Biphenyls*

pH – Potencial hidrogeniônico

P.I.I. – Padrão interno do instrumento

P.I.P. – Padrão interno do procedimento

PM – Peso molecular

PSA – Amina primária e secundária, do idioma inglês *Primary and Secondary Amine*

QuEChERS – do idioma inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*.
Em português: Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.

r – Coeficiente de correlação linear de Pearson

r² – Coeficiente de determinação

RSD – Desvio padrão relativo, do idioma inglês *Relative Standard Deviation*

rpm – Rotações por minuto

S – Severidade da doença (giberela)

SANCO – Saúde dos consumidores (Direção Geral de Saúde dos Consumidores da Comissão Europeia), do idioma francês *Santé et Consommateur*.

SPE – Extração em fase sólida, do idioma inglês *Solid Phase Extraction*

T-2 – Toxina T-2

TCA – Ácido tricarbóxico, do idioma inglês *Tricarballic Acid*

TIC – Cromatograma de íons totais, do idioma inglês *Total Ion Chromatogram*

TLC – Cromatografia de camada delgada, do idioma inglês *Thin-layer chromatography*

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência, do idioma inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UPLC-MS – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas, do idioma inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*

UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série.

UE – União Européia

UV - Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta/visível

ZEN – Zearalenona

RESUMO

MICOTOXINAS EM MATRIZES DE MILHO E TRIGO: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC-MS/MS E MONITORAMENTO EM DIFERENTES PONTOS DA CADEIA PRODUTIVA E COMERCIAL

Autora: Darliana Mello Souza

O trabalho teve por finalidade validar um método analítico multimicotoxinas empregando UPLC-MS/MS para determinação simultânea de 12 micotoxinas em matrizes de trigo e milho. Os parâmetros avaliados para validação do método foram: curva analítica e linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão (recuperação%), precisão (RSD%) e efeito matriz. A extração das micotoxinas foi realizada empregando o método QuEChERS modificado, no qual foram utilizados 12,5 g de *slurry* (suspensão entre amostra e água), 4,5 g MgSO₄ anidro e 10 mL de acetonitrila acidificada a 1% com ácido acético. Após a validação do método, o mesmo foi empregado para pesquisar, quantitativamente, a ocorrência de micotoxinas em 646 amostras, sendo 476 amostras de trigo (ensaios a campo, grãos tipo exportação e importação, grãos para processamento e respectivas frações (farinha e farelo) e farinhas comercializados em supermercados) e 170 amostras de milho (grãos tipo exportação, farinhas coletadas em supermercados, grãos e quireira destinados à fabricação de ração animal). Os resultados obtidos foram satisfatórios para todos os parâmetros avaliados, mostrando desta forma, que o método validado para as matrizes de trigo e milho, é eficaz para determinar as 12 micotoxinas em estudo. O efeito matriz, para algumas micotoxinas ficou fora da faixa de -20 a +20%. Esse efeito pronunciado para alguns analitos foi compensado pela calibração por superposição da matriz. Este método pode então ser utilizado para avaliação das amostras, em que todas apresentaram contaminação por pelo menos uma das 12 micotoxinas estudadas, independente da origem. A micotoxina DON foi predominantemente encontrada em amostras de trigo, enquanto fumonisinas foram as micotoxinas predominante determinadas em milho. Nos ensaios a campo, fatores como genótipo, ambiente e tratamento fungicidas tiveram influência sobre as concentrações de DON. Grãos de trigo tipo exportação e importados da Argentina apresentaram contaminação por DON em todas as amostras. Em trigo tipo exportação, também foi determinado contaminação por FB₁, FB₂, ZEN e OTA. Há evidências de que este seja o primeiro trabalho a relatar a presença de fumonisinas em trigo brasileiro, visto que não foi encontrado outros relatos na literatura. Nos subprodutos derivados da moagem foi verificado redistribuição de DON, com redução das concentrações na farinha branca e incremento na fração farelo, quando comparados a concentração inicial no grão, evidenciando que tal processo não é eficaz para eliminação de micotoxinas. Foram determinadas as micotoxinas DON e ZEN em amostras de farinhas adquiridas tanto na cidade de Cruz Alta quanto de Santa Maria. Nas amostras de milho tipo exportação foi evidenciada contaminação concomitante por DON, ZEN, FB₁ e FB₂ e AFLA B₁. Nas amostras de farinha de milho coletadas em supermercados todas estavam contaminadas por fumonisinas. Além de fumonisinas foi evidenciado a presença de DON, ZEN e AFLA B₁ em algumas amostras. Em amostras destinadas a fabricação de ração animal foi determinada aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), fumonisinas (B₁ e B₂), DON e ZEN, sendo que em alguns casos, as concentrações foram superiores aos limites tolerados pela legislação brasileira. O método de extração, aliado com a técnica cromatográfica para determinação dos analitos mostraram-se eficientes para a análise de micotoxinas em trigo e milho. Mesmo em concentrações abaixo dos limites legais, a exposição humana a micotoxinas pode ocorrer constantemente. O monitoramento de micotoxinas em alimentos é de extrema importância para a saúde pública, visando a disponibilização de produtos de qualidade em todos os pontos da cadeia produtiva e comercial.

ABSTRACT

MYCOTOXINS IN MATRICES OF MAIZE AND WHEAT: VALIDATION AN ANALYTICAL METHOD BY UPLC-MS/MS AND MONITORING AT DIFFERENT POINTS OF SUPPLY AND COMMERCIAL CHAIN

Author: Darliana Mello Souza

This study aims to validate an analytical multi-mycotoxin method using UPLC-MS/MS for 12 mycotoxins determination in wheat and maize matrices. The parameters evaluated for the validation were: calibration curve and linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy (recovery%), precision (RSD %) and matrix effect. The extraction of mycotoxins was performed using the modified QuEChERS method, whereby were used 12.5 g of slurry (suspension between sample and water), 4.5 g MgSO₄ anhydrous and 10 ml of acidified acetonitrile at 1% acetic acid. After method validation, it was used to search, quantitatively, the occurrence of mycotoxins in 646 samples, 476 samples of wheat (the field trials, exported and imported grain type, grain processing and their fractions (flour and bran) and flour collected in supermarkets) and 170 samples of maize (grain exported type, flour collected in supermarkets, grains and brewer for the manufacture of animal feed). The results were satisfactory for all evaluated parameters, thus showing that the method validated for the matrices of wheat and maize, it is effective to determine these 12 mycotoxins studied. The matrix effect for some mycotoxins was outside the range -20 to +20%. These results for some analytes were compensated by matrix-matched calibration. All were contaminated by at least one of 12 mycotoxins in the study, regardless of origin. The mycotoxin DON was predominantly found in wheat samples, while fumonisin were determined in maize. In the field trials, factors such as genotype, environment and fungicide treatment had influence on DON concentration. Wheat grain for exportation and imported from Argentina had DON contamination in all samples. In wheat for exportation, also been determined contamination for FB₁, FB₂, ZEN and OTA. There is evidence that this is the first study to report the presence of fumonisins in Brazilian wheat, since it was not found other reports in the literature. In the sub-products of milling was observed redistribution of DON, a decreased concentration in white flour and increased in bran fraction when compared to the initial concentration in the grain, showing that this process is not effective for mycotoxins removal. It was determined DON and ZEN mycotoxins in flour samples purchased either in the city of Cruz Alta as Santa Maria as well. In maize samples for exportation was observed concomitant contamination by DON, ZEN, FB₁ and FB₂ and AFLA B₁. In maize flour samples collected from supermarkets all samples were contaminated with fumonisins. Besides fumonisins evidenced the presence of DON, ZEN and AFLA B₁ in some samples. Samples destined for the production of animal feed were determined with aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂), fumonisins (B₁ and B₂), DON and ZEN, and in some samples, the concentrations were higher than Brazilian MRL. The extraction method combined with modern chromatographic technique for the determination of analytes, were effective for the analysis of mycotoxins in wheat and maize. Even in concentrations below the legal limits, human been exposure to mycotoxins can occur constantly. Monitoring of mycotoxins in foods is extremely important for public health, seeking quality to make healthy products available at all points of the supply and commercial chain.

1 INTRODUÇÃO

Os cereais são considerados alimento básico de aproximadamente um terço da população mundial, em virtude da sua diversidade de utilização, suas características nutricionais e sua facilidade de armazenamento.¹ São fonte de nutrientes e fibras e, tecnologicamente, possuem múltiplas formas de consumo.^{1,2} Seus subprodutos constituem uma parte importante da dieta diária de humanos e animais,³ sendo as mais importantes fontes de alimentos.^{4,5}

Cerca de dois bilhões de toneladas de cereais são produzidos anualmente.⁶ Dentre os cereais, o trigo é um dos mais consumidos, juntamente com o milho e o arroz.⁷ O trigo contribui com aproximadamente 30% da produção global de grãos.⁸ É o segundo alimento mais produzido,¹ superado apenas pelo milho.⁹ Na safra de 2012/2013, a produção mundial de trigo e milho foram de 655,110 e 862,845 milhões de toneladas, respectivamente.¹⁰

Os produtos agrícolas estão constantemente sujeitos à contaminação fúngica.¹¹ A infecção por fungos pode ocorrer em diversos estágios da cadeia alimentar: inicia nas lavouras e continua durante a maturação, colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento, inclusive na armazenagem do produto já transformado, isto é, industrializado e em nível doméstico.¹²

A infecção da cultura/alimento por fungos toxigênicos pode acarretar na formação de micotoxinas, que são substâncias tóxicas produzidas por certas espécies de fungos.^{13,14} Em grãos, a presença destes contaminantes é imperceptível visualmente no produto final, tornando-se um grande desafio para produção de alimentos seguros.¹⁵

Anualmente, no mundo inteiro, grandes quantidades de grãos são perdidas. A necessidade crescente de produtos para suprir a demanda mundial de alimentos, tendo em vista o crescimento populacional, exige que a qualidade do grão colhido na lavoura seja mantida com o mínimo de perdas até o consumidor final.¹⁶

A garantia da segurança dos alimentos para que os mesmos estejam isentos, ou com concentrações permitidas de contaminantes biológicos, físicos e químicos no momento do consumo humano ou animal, é questão central em todas as cadeias produtivas.¹⁵ A contaminação de alimentos pelo uso intencional de substâncias químicas, como pesticidas, bifenilas policloradas (PCB) e medicamentos veterinários, é uma preocupação de saúde pública mundial, bem como a contaminação, devido a substâncias tóxicas naturais, como as micotoxinas.¹⁷

Como essas substâncias tóxicas são contaminantes naturais e não podem ser completamente removidas dos alimentos, muitos países têm imposto limites máximos de tolerância.¹⁸ A segurança do alimento se tornou um importante atributo de qualidade. Isto implica em que todos os aspectos da produção de alimentos e, portanto, da cadeia de abastecimento alimentar devem ser considerados para garantir a segurança da alimentação.⁴

No Brasil, no ano de 2011, uma legislação mais abrangente e rígida foi implantada em função da ocorrência destes compostos. No entanto, têm-se poucos dados sobre a extensão da contaminação em alimentos por micotoxinas. O controle de resíduos e contaminantes exerce papel fundamental para garantir a qualidade e segurança das matérias-primas destinadas ao consumo direto ou processos industriais.

O fato da maioria das micotoxinas serem tóxicas em concentrações muito baixas, requerem métodos sensíveis e confiáveis para a sua determinação.¹⁹ A determinação de micotoxinas é sempre um desafio,^{17,20} devido à diversidade de matrizes e da variedade de espécies moleculares que precisam ser determinados.²⁰

Assim, é de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos que possam fornecer dados confiáveis quanto à presença de micotoxinas em milho e trigo, provenientes de vários pontos da cadeia produtiva, desde a lavoura, passando pela etapa de processamento até a comercialização (importação e exportação) e a exposição direta dos consumidores, a partir dos produtos comercializados em supermercados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral validar *in house* (intralaboratorial) um método analítico multirresíduo por cromatografia líquida hifenada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), para determinação simultânea de doze micotoxinas em trigo, milho e produtos derivados destes, a fim de avaliar o grau de contaminação por micotoxinas nestas matrizes alimentares em vários pontos da cadeia produtiva e comercial, obtendo-se desta forma dados que possam dimensionar a contaminação desde o cultivo até a chegada do produto final na mesa do consumidor.

2.1.1 Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência de doze micotoxinas: Aflatoxina B₁ (AFLA B₁), Aflatoxina B₂ (AFLA B₂), Aflatoxina G₁ (AFLA G₁), Aflatoxina G₂ (AFLA G₂), Desoxinivalenol (DON), Diacetoxiscirpenol (DAS), Toxina T-2 (T-2), Toxina HT-2 (HT-2), Ocratoxina A (OTA), Zearalenona (ZEN), Fumonisina B₁ (FB₁) e Fumonisina B₂ (FB₂).
- Realizar ensaios a campo no Rio Grande do Sul, em localidades distintas de semeadura (Santa Rosa, Cruz Alta e São Luiz Gonzaga), para caracterização de diferentes genótipos de trigo em relação ao acúmulo de micotoxinas nos grãos nos distintos locais.

Avaliar:

- A resposta de diferentes genótipos de trigo, com e sem tratamento fúngico, em relação aos níveis de micotoxinas nos grãos e o efeito de uma ou duas aplicações de fungicidas no florescimento da cultura.

-
- A resposta de um único genótipo de trigo frente a diferentes fungicidas, comparado com uma testemunha não tratada.
 - O grau de contaminação por micotoxinas em trigo e milho destinados à exportação, oriundos das diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul, assim como, os grãos que são importados e chegam ao Brasil através do porto de Rio Grande.
 - O grau de contaminação por micotoxinas em grão de trigo de distintos lotes destinados aos moinhos.
 - A distribuição das micotoxinas em diferentes frações do grão de trigo (grão, farelo e farinha).
 - A qualidade micotoxicológica de grãos e quirera de milho destinados a ração animal.
 - A qualidade micotoxicológica em farinhas de milho e trigo disponíveis em prateleiras de supermercados da cidade de Santa Maria (região central do estado), assim como naquelas adquiridas em supermercados da cidade de Cruz Alta (região noroeste do RS).

3 REVISÃO DA LITERATURA

Abordar-se-á inicialmente o conceito de micotoxinas, os fungos produtores de micotoxinas e os problemas acarretados por estas, assim como aspectos gerais das 12 micotoxinas em estudo e a legislação brasileira vigente. Sucintamente, serão descritas algumas patologias causadas pelo desenvolvimento de determinados fungos em cereais, assim como a utilização de fungicidas para o controle destas. Por fim, uma breve revisão acerca da determinação de micotoxinas e das técnicas cromatográficas empregadas para este propósito.

3.1 MICOTOXINAS

O reino dos fungos compreende um grupo de organismos que podem se classificar em leveduras e fungos filamentosos ou bolores, sendo os fungos filamentosos os produtores de micotoxinas. Os fungos utilizam para seu crescimento uma série de substâncias químicas denominadas metabólitos primários, como por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios. O uso de metabólitos primários está associado com a fase de crescimento rápido. Já, os metabólitos secundários, são uma série de compostos que não são essenciais para o crescimento vegetativo em cultivo puro.^{21,22}

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos,^{5,21,23,24} ou seja, metabólitos não essenciais para o funcionamento normal das células, tóxicos para humanos, animais e plantas.²⁵ O termo micotoxinas deriva da palavra grega *Mykes*, que significa fungo, e da palavra latina *Toxicum*, que significa veneno, portanto, micotoxinas são toxinas produzidas por fungos,^{5,23,26,27} sendo que todas são produtos naturais de baixo peso molecular.²⁸

Aparentemente, as micotoxinas não têm significado bioquímico sobre o crescimento de fungos, e podem ser produzidas para proporcionar um sistema de defesa contra os insetos, micro-organismos, animais e seres humanos.²⁴ São tipicamente formadas no final da fase exponencial e no princípio da fase estacionária do crescimento dos fungos, estando associadas a fase de diferenciação e esporulação (Figura 1).^{21,29}

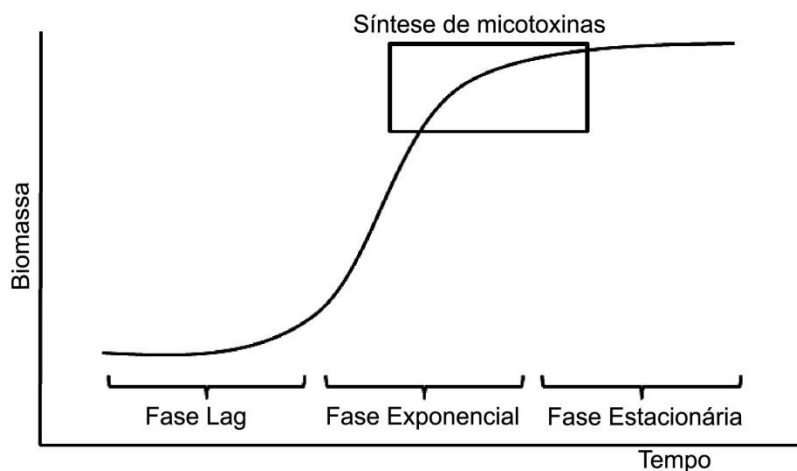


Figura 1. Fases de crescimento fúngico e localização da síntese de micotoxinas. (Fonte: Castillo, 2007)²¹

Os fungos são ubíquos e são um problema mundial na produção de cereais.³⁰ Os efeitos do crescimento fúngico incluem diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, formação de odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais, perda de qualidade e produção de micotoxinas.^{31,32} Esta contaminação pode fazer com que os grãos se tornem impróprios para o consumo humano e animal, resultando em grandes perdas econômicas.¹⁶

As micotoxinas são compreendidas dentro do grupo dos contaminantes mais importantes em alimentos devido ao seu impacto negativo sobre a saúde pública, segurança alimentar e economia de muitos países, particularmente os países em desenvolvimento. Afetam uma ampla gama de produtos agrícolas, incluindo cereais, frutas secas e oleaginosas.³³

A presença destas toxinas nos alimentos tem uma enorme importância para a saúde pública, devido aos efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos, teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos. Também podem estar associadas a disfunções hormonais graves, além do aumento da suscetibilidade a doenças e a redução da expectativa de vida. São capazes de provocar efeitos tanto agudos quanto crônicos no homem e nos animais, assim como desordem dos sistemas nervoso central, cardiovascular, pulmonar e trato intestinal, podendo causar a morte.^{26,34}

A preocupação com a segurança na produção de alimentos também tem aumentado.³⁵ Minimizar a contaminação por micotoxinas começa com a qualidade da matéria-prima. A produção primária está no início da cadeia sendo a base de qualquer programa para reduzir o risco de contaminação por micotoxinas.³⁶

As condições climáticas de um país determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que poderão produzir. No Brasil, existem condições propícias para o crescimento de diversos fungos produtores de micotoxinas.³⁷

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do cultivo, colheita ou estocagem dos alimentos, podendo permanecer no grão mesmo depois que os fungos responsáveis pela produção não estejam mais presentes. Contudo, o crescimento de fungos e a produção de toxinas não são sinônimos, porque nem sempre as melhores condições de crescimento fúngico coincidem com as condições para síntese de toxinas.³⁸

Desta forma, pode haver flutuações nos níveis de micotoxinas nos alimentos de ano para ano, dependendo de muitos fatores, tais como condições adversas de clima, que favorecem invasão de fungos e seu desenvolvimento. Embora existam diferenças geográficas e climáticas na produção e ocorrência de micotoxinas, a exposição a estas toxinas é mundial, com grande parte da oferta de alimentos contaminados de alguma forma.¹⁸ A maioria das micotoxinas são quimicamente estáveis, não sendo degradadas durante o armazenamento e processamento, tais como cozimento e panificação, permanecendo assim no alimento.³⁹⁻⁴²

É um desafio garantir produtividade e biossegurança do produto, sem prejudicar a segurança do alimento. Alimento seguro significa saúde e qualidade de vida. A garantia de alimento livre de contaminantes é essencial para prevenção de doenças, principalmente num país como o Brasil, onde parte considerável da população enfrenta sérios problemas de carência nutricional e de acesso ao sistema público de saúde.¹⁶

3.1.1 Produção de micotoxinas

A produção de micotoxinas é altamente suscetível a umidade, atividade de água (A_w), pH e concentração de oxigênio no substrato. Umidade e temperatura são dois fatores ambientais que exercem efeito decisivo sobre a proliferação de fungos e biossíntese de toxina. A incidência e o nível de contaminação por micotoxinas estão intimamente relacionados à posição geográfica e de fatores sazonais, bem como às condições de cultivo, colheita, estocagem e transporte.^{17,24,43} Além destes, fatores como disponibilidade de nutrientes, danos mecânicos, interação microbiana e a presença de compostos antimicrobianos devem ser considerados.⁴⁴

O parâmetro mais importante quando se considera a umidade em relação ao crescimento de fungos não é o conteúdo de água de um substrato, mas a A_w deste. A atividade da água é a quantidade de água livre presente, isto é, não está ligada química ou fisicamente à substância, e é, portanto, imediatamente disponível para o metabolismo do fungo. Assim, o crescimento de fungos está diretamente relacionado com a A_w de um alimento. O limite de crescimento para os fungos que são mais resistentes as condições de seca é de cerca de 0,7 de A_w .¹⁸ As condições de A_w e de

temperatura para o desenvolvimento de certas espécies de fungos estão apresentadas de maneira simplificada na Figura 2.

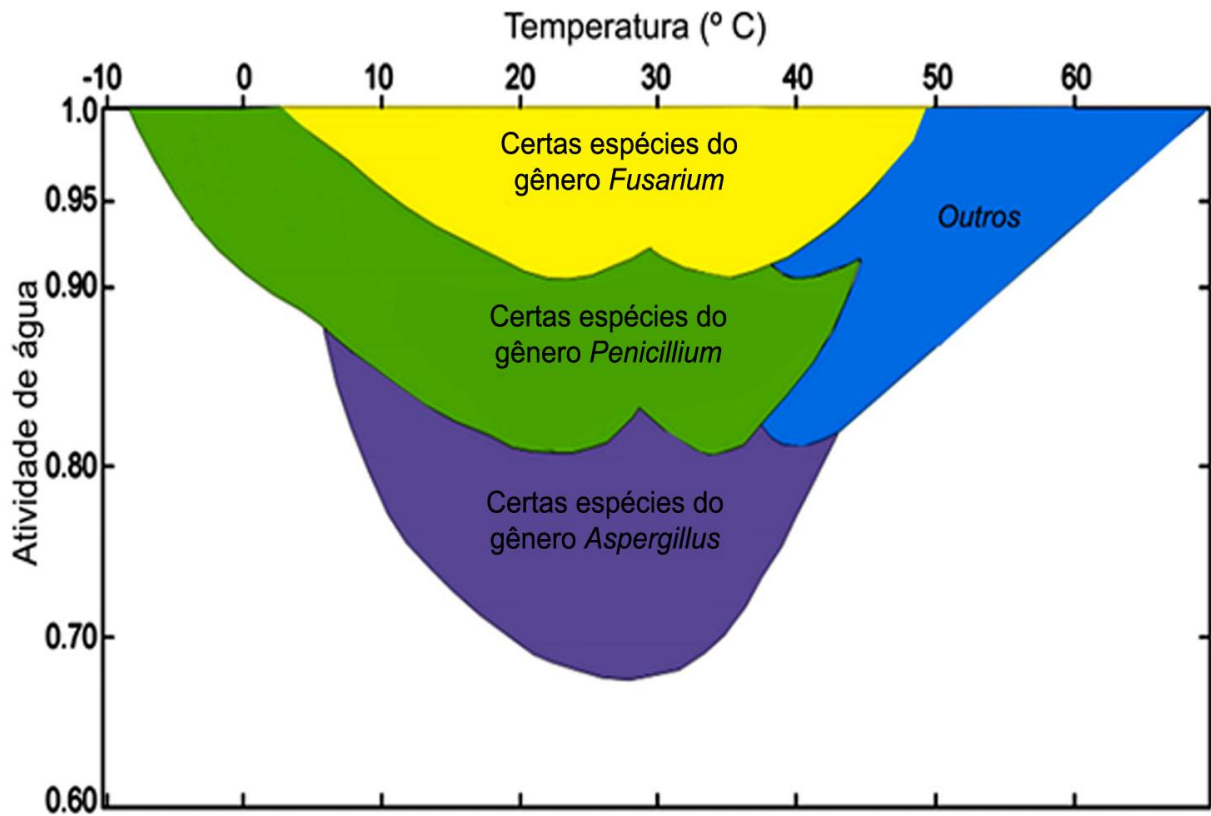


Figura 2. Condições de atividade de água e temperatura para desenvolvimento dos fungos. (Fonte: Machado, 2006)⁴⁵

A maioria dos fungos são pouco afetados pelo pH na faixa entre 3-8. No entanto, quando o pH se afasta desta faixa ideal, alguns fatores limitantes podem se tornar evidentes se sobrepondo ao pH. A Figura 3 ilustra a influência do pH e A_w sobre o crescimento microbiano.⁴⁶

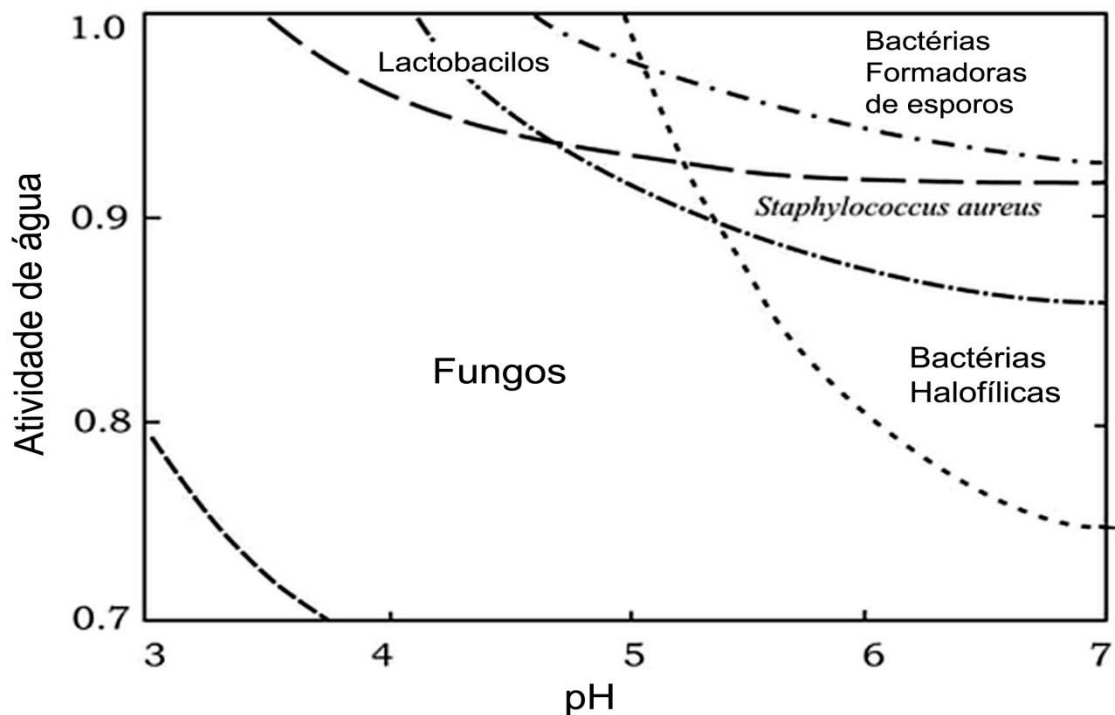


Figura 3. Diagrama esquemático da influência da combinação da atividade de água e do pH sobre o crescimento microbiano. (Fonte: Pitt & Hocking, 2009)⁴⁶

3.1.2 Principais gêneros de fungos micotoxigênicos

As micotoxinas podem ser formadas no campo, após a infecção por qualquer fungo micotoxigênico dentre uma grande variedade de espécies, com destaque para os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, os mais importantes em climas tropicais e subtropicais.^{27,47} Os cereais também são suscetíveis ao ataque de fungos após a colheita, durante o transporte ou quando armazenadas, os principais gêneros micotoxigênicos são dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.^{17,27,48,49}

A relação entre a micotoxina e o fungo produtor não é única. Uma dada micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos, e um dado fungo pode produzir mais de uma micotoxina.²⁷

A presença de um fungo produtor de toxina não significa necessariamente que a toxina associada também esteja presente, pois muitos fatores estão envolvidos na sua formação. Da mesma maneira, a ausência de qualquer evidência visível do fungo filamentoso não garante que o alimento esteja isento de toxinas,

pois o fungo pode ter sido eliminado, porém a toxina uma vez formada, poderá permanecer no alimento.¹⁹

3.1.2.1 *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem a flora de armazenamento. Geralmente, temperaturas acima de 10 a 12 °C e A_w mínima de 0,75 – 0,83 são necessárias para sua multiplicação e produção de micotoxinas.²⁹

Durante o seu ciclo de vida, várias espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir uma vasta gama de micotoxinas nocivas para os seres humanos e animais.⁵⁰ Os produtos que podem ser colonizados por *Aspergillus* incluem milho, trigo, arroz, amendoim, nozes e semente de algodão. Esta colonização pode ocorrer antes ou depois da colheita, dependendo das condições ambientais ou de armazenamento. Fungos do gênero *Aspergillus*, como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. fumigatus* produzem micotoxinas de grande preocupação econômica e sanitária (Tabela 1).⁵¹

Tabela 1. Principais micotoxinas produzidas por *Aspergillus* ssp.

Espécie fúngica	Micotoxina Produzida
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas, esterigmatocistina, ácido ciclopiazônico
<i>A. niger</i>	Ocratoxina A, fumonisina B ₂ , B ₄
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A, ácido penicílico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , ácido aspergílico
<i>A. terreus</i>	Citreoveridina
<i>A. clavatus</i>	Ascladiol, patulina, clavatul
<i>A. carbonarius</i>	Ocratoxina A
<i>A. nomius</i>	Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂

(Fonte: Samson et al., 2010)⁵²

Solos secos e quentes favorecem a ocorrência de *Aspergillus*. Em termos de localização geográfica, a incidência de *A. flavus* está relacionada com as temperaturas mínimas elevadas e inversamente correlacionada com a latitude. Além

do clima quente e seco, o nível de atividade de insetos e roedores em uma área também pode favorecer substancialmente a colonização e a produção de micotoxinas. Fertilidade de plantas, densidade e ocorrência de doenças também influem no nível de contaminação por micotoxinas.⁵¹

3.1.2.2 *Penicillium*

Penicillium é um gênero amplo, com mais de 150 espécies reconhecidas, das quais, aproximadamente 50 são de ocorrência comum. Espécies de *Penicillium* são frequentemente associadas com a deterioração de alimentos e rações, e, portanto, de grande importância econômica. Podem ser facilmente isoladas a partir do solo, onde participam na decomposição de matérias orgânicas. Mas também estão entre os fungos mais comuns aerotransportados, capazes de induzir reações alérgicas em pessoas sensíveis. Várias espécies de *Penicillium* estão entre os agentes mais comuns de doenças pós-colheita em vegetais e podem produzir uma variedade de micotoxinas (Tabela 2).⁵⁰

Tabela 2. Principais micotoxinas produzidas por *Penicillium* ssp.

Espécie fúngica	Micotoxina Produzida
<i>P. aurantiogriseum</i>	Ácido penicílico, verrucosidina
<i>P. carneum</i>	Patulina, roquefortina
<i>P. expansum</i>	Patulina
<i>P. chrysogenum</i>	Toxina PR
<i>P. griseofulvum</i>	Griseofulvina, patulina, roquefortina, ác. ciclopiazônico
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. freii</i>	Viomeleina
<i>P. glandicola</i>	Patulina, roquefortina C
<i>P. hordei</i>	Roquefortina C
<i>P. paneum</i>	Patulina
<i>P. roqueforti</i>	Toxina PR, roquefortina
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A, citrinina, verrucosidina
<i>P. viridicatum</i>	Ácido penicílico

(Fonte: Samson et al., 2010)⁵²

3.1.2.3 *Fusarium*

Fusarium é um dos gêneros de fungos com maior capacidade genética para a produção de micotoxinas quando as condições físicas, químicas e biológicas são adequadas. Faz parte da flora de campo (substratos fitopatogênicos, plantas vivas) e da flora intermédia (substratos recém-colhidos, cereais ainda úmidos). Estes fungos crescem em temperaturas entre 6 e 40 °C. A temperatura ótima de crescimento se situa entre 18 e 30 °C.²⁹ Contudo, a produção de algumas de suas toxinas é estimulada em baixas temperaturas. Isto significa que *Fusarium* produz as micotoxinas sob o efeito de choque térmico, principalmente com alternância das temperaturas, principalmente a diurna e a noturna.⁵³

Fungos do gênero *Fusarium* são aeróbios e geralmente necessitam de A_w superior a 0,88, a fim de crescer e proliferar, e atividade de água de 0,91, para produção de micotoxinas. São fungos que contaminam cereais no campo. O fungo morre, uma vez que o cereal contaminado é seco ou processado, mas a micotoxina permanece no cereal.²⁹

As condições climáticas de alta umidade atmosférica e elevada precipitação do sul do Brasil favorecem o desenvolvimento do fungo *Fusarium graminearum*. Esse patógeno é o principal responsável pela produção da micotoxina DON. Na Tabela 3 é listado algumas micotoxinas produzidas por *Fusarium*.⁵⁴

Tabela 3. Principais micotoxinas produzidas por *Fusarium* ssp.

Espécie fúngica	Micotoxina Produzida
<i>F. culmorum</i>	Desoxinivalenol, 3-acetildesoxinivalenol, 15-acetildesoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fusarenona X
<i>F. graminearum</i>	Desoxinivalenol, 15-acetildesoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fusarenona X
<i>F. sporotrichioides</i>	Toxina T-2, Toxina HT-2, neosolaniol, diacetoxiscirpenol, zearalenona, fusarenona X
<i>F. poae</i>	Toxina T-2, Toxina HT-2, neosolaniol, diacetoxiscirpenol, zearalenona, fusarenona X
<i>F. verticilloides</i>	Fumonisinias, moniliformin, fusarina C
<i>F. langsethiae</i>	Toxina T-2, Toxina HT-2, diacetoxiscirpenol
<i>F. proliferatum</i>	Fumonisinias, ácido fusárico
<i>F. subglutinans</i>	Fumonisinias, ácido fusárico

(Fonte: Magan et al., 2002)⁵⁴

3.1.2.3.1 Principais patologias causadas por *Fusarium* em milho e trigo

Fungos do gênero *Fusarium* estão entre os patógenos mais destrutivos de cereais em todo o mundo, sendo que mais de uma espécie é frequentemente encontrada em uma única safra. Várias espécies deste gênero são agentes infecciosos, conhecidos por causar uma série de doenças em cereais, como infecções da raiz, caule e espiga, que resultam em perdas significativas para a indústria de cereais.^{36,55}

Uma das doenças mais importantes em trigo, aveia, cevada e outros cereais, produzidas por *Fusarium* spp. é a giberela (do inglês *Fusarium head blight* – FHB).⁵⁶ É causada por várias espécies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schweinitz) Petch].⁵⁷ Outras espécies como *Fusarium avenaceum* (teleomorfo, *Gibberella avenacea*), *F. culmorum* (teleomorfo, *G. zeae*), *F. poae* e *Microdochium nivale* (teleomorfo, *Monographella nivalis*) também estão associadas a doença.^{58,59} Destas, apenas *M. nivale* é descrito como um não-típico produtor de micotoxina.⁶⁰

Na última década, a giberela se tornou uma das mais graves doenças fúngicas devido as mudanças climáticas e adoção de práticas agrícolas modernas (plantio direto), causando perdas econômicas enormes em todo o mundo.⁵⁶ Isto resulta em diminuição da produtividade e redução da qualidade de grãos.⁶¹ Pelo efeito da doença, os grãos passam a ter tamanho reduzido, cor normalmente rosada, aspecto danificado e chocho.⁶² No entanto, o principal problema envolvendo a giberela está nos danos indiretos, oriundos do acúmulo de micotoxinas, que não só desvalorizam o grão junto ao mercado, mas os tornam impróprios para o consumo, por colocarem em risco a saúde humana e animal.^{51,62,63} Dentre as micotoxinas produzidas, DON é a de maior relevância, por ser amplamente distribuída e encontrada em altos níveis.⁶²

Fusarium verticillioides (também conhecido como *F. moniliforme*) está associado com a ocorrência de doenças em todas as fases de desenvolvimento da planta de milho, infectando as raízes, caule e sementes.⁶⁴ Esse patógeno é o principal responsável pela produção de micotoxinas em grãos de milho e nos subprodutos oriundos desse cereal, com destaque para aquelas do grupo das fumonisinas.⁶⁵ Os fatores que contribuem para a ocorrência são temperatura,

estresse hídrico, danos causados por insetos, outras doenças fúngicas e genótipo de milho.⁵¹

Para o controle de doenças em cereais são indicadas três estratégias, que devem ser empregadas de maneira integrada: resistência genética, uso de cultivares com maior número de genes que conferem resistência à doença; manejo cultural, por meio de práticas como rotação de culturas, época e escalonamento da semeadura; e controle químico, pela aplicação de fungicidas.⁶⁶ A aplicação de fungicidas é uma medida que visa a redução do risco, no entanto, os resultados não têm sido 100% eficazes ou consistentes, já que há dificuldade de se atingir as anteras (sítios de infecção).⁵⁷

Porém, na região sul do Brasil, a rotação de culturas é uma medida de controle ineficiente para *Fusarium/Gibberella* em virtude da grande abundância de inóculo no ambiente, além da ampla gama de hospedeiros desse patógeno. Contudo, a rotação de culturas se tornou muito importante para controlar outras doenças na cultura do trigo, como podridões radiculares e manchas foliares.⁶⁷

3.1.3 Micotoxinas Seleccionadas

3.1.3.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram descobertas na década de 1960, após desencadearem a morte de cerca de 100 mil perus no Reino Unido em função da até então desconhecida “Doença X”. Cuidadasas investigações revelaram que a doença estava ligada à ingestão de farelo de amendoim, contaminado por *Aspergillus flavus*, um fungo produtor de aflatoxina.^{5,25,51,68} Outras espécies de ocorrência frequente de *Aspergillus* conhecidas por produzir aflatoxinas são *A. parasiticus* e *A. nomius*.⁵¹ O nome aflatoxina deriva da primeira letra em *Aspergillus*, e as primeiras três letras em *flavus*.²⁴

As aflatoxinas são compostos altamente oxigenados, heterocíclicos, com estrutura química muito semelhante.⁶⁸ Atualmente, são conhecidos 17 compostos similares de aflatoxinas, porém as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as de maior incidência em culturas agrícolas.^{27,69} A representação das estruturas estão ilustradas na Figura 4.⁵¹

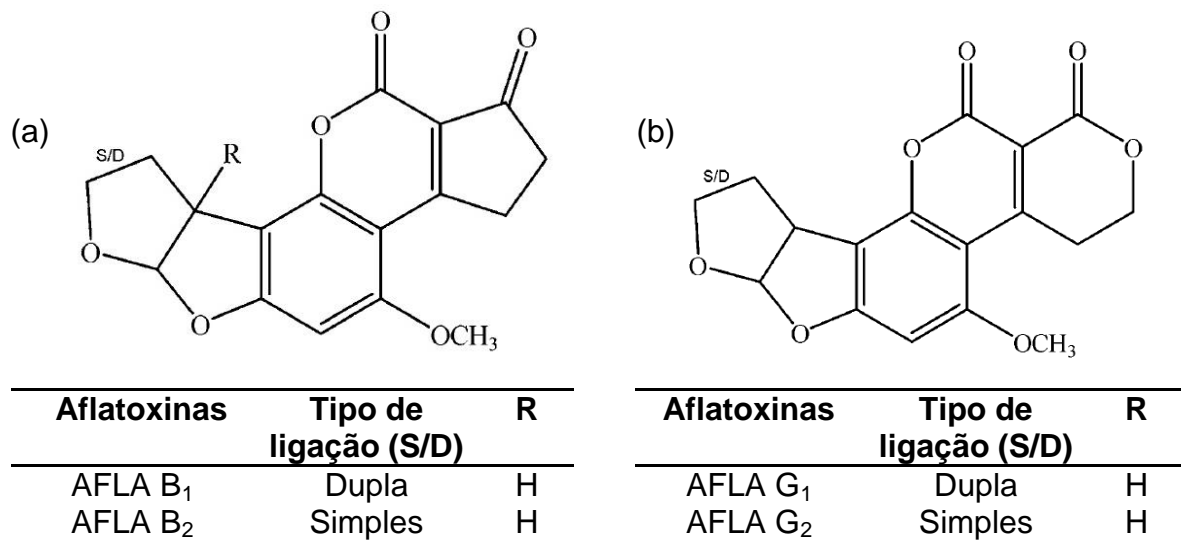


Figura 4. Estruturas químicas das Aflatoxinas: (a) AFLA B₁ e B₂; (b) AFLA G₁ e G₂. (Fonte: Köppen et al., 2010)⁷⁰

As aflatoxinas são bastante estáveis em muitos alimentos e são relativamente resistentes a degradação.²⁷ Estas micotoxinas são contaminantes naturais de vários produtos agrícolas, tais como: nozes, amendoim, milho, trigo e outros alimentos derivados.^{17,29} São as substâncias de ocorrência natural com maior potencial carcinogênico,^{24,28,71} sendo que a AFLA B₁ é a mais potente,⁷¹⁻⁷⁴ seguida de AFLA G₁, B₂ e G₂.^{27,75} São compostos altamente tóxicos, teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos.^{24,72-74} O grande efeito produzido pelas aflatoxinas é hepatotoxicose, mas também podem interferir no sistema imunológico.^{29,71}

3.1.3.2 Tricotecenos

Micotoxinas pertencentes a classe dos tricotecenos foram isoladas pela primeira vez a partir de *Trichothecium roseum*.²⁴ O termo tricoteceno é derivado de tricotecina, o primeiro membro da família identificado.⁷⁶ Eles são um grupo de mais de 150 micotoxinas estruturalmente relacionadas,^{17,68,77} que compartilham um núcleo tricíclico chamado tricoteceno (Figura 5), caracterizado por uma ligação dupla no C9 e C10 e um anel epóxido em C12 e C13.⁷⁸

Possuem uma estrutura básica sesquiterpenóide (15 carbonos) denominada de farnesil-pirofosfato. Com base no seu padrão de substituição de grupos

funcionais específicos, são divididos em classes do tipo A, B, C e D, dependendo da presença ou ausência de grupos funcionais característicos, com toxicidade variada, que está relacionada com a sua estrutura.^{29,79}

Algumas micotoxinas do tipo A, incluem toxina T-2, toxina HT-2, neosolaniol (NEO) e diacetoxiscirpenol (DAS). Possuem um grupo hidroxila, um grupo éster ou nenhuma cadeia lateral em C8,⁷⁷ enquanto tricotecenos do tipo B, tais como exemplo, desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON), tem um grupo ceto substituinte na posição C-8 do anel sesquiterpenóide e estão mais relacionados com efeitos tóxicos crônicos. Tricotecenos do tipo C são caracterizadas por poucas espécies como crotocina. Há a presença de um segundo grupo epóxi na posição C-7,8 ou C-9,10 enquanto tricotecenos tipo D (verrucarina, satratoxina) contêm um anel macrocíclico entre os carbonos 4 e 5 com duas ligações éster (Figura 5).⁷⁸

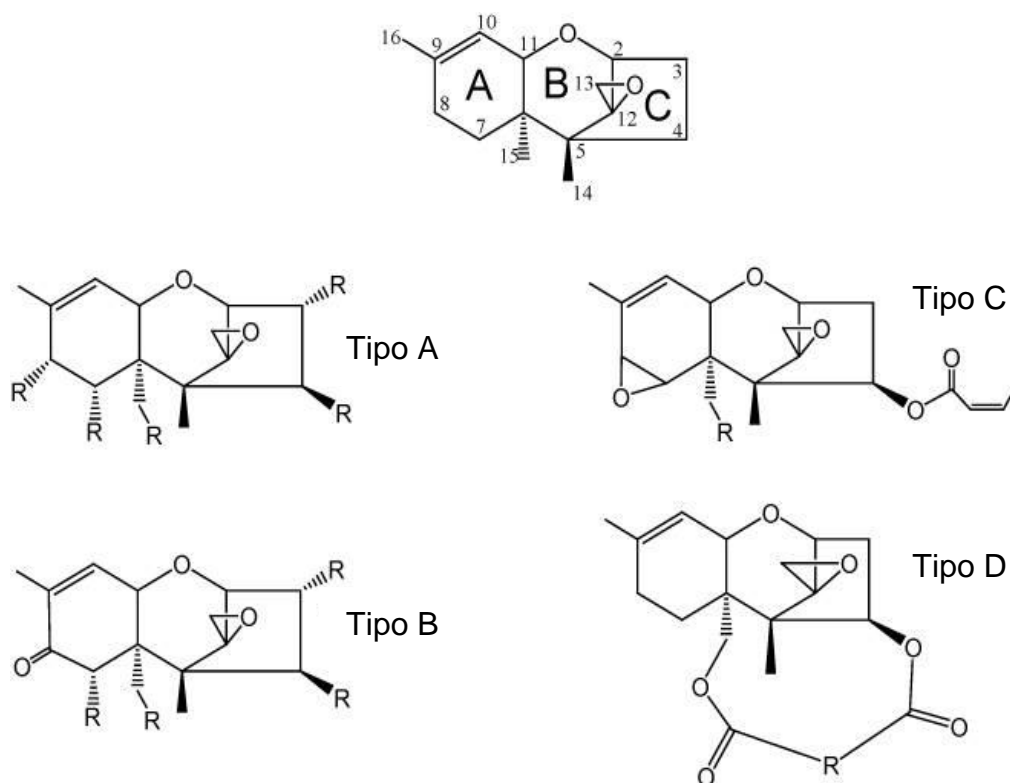


Figura 5. Estrutura principal dos tricotecenos e estruturas gerais dos tricotecenos do Tipo A, B, C e D. (Fonte: McCormick et al., 2011)⁸⁰

Dos tricotecenos identificados, DON e T-2 são toxicologicamente os mais relevantes e amplamente estudados.⁸¹ As micotoxinas HT-2 e T-2 são dois dos tricotecenos mais potentes, capazes de inibir a síntese de proteínas em eucariotas.⁵⁵ O valor da DL₅₀ para DON é cerca de dez vezes maior que para nivalenol, toxina T-2 e HT-2, que é por sua vez, cerca de dez vezes maior do que para as micotoxinas de estruturas macrocíclicas.²⁷ Os tricotecenos são as micotoxinas que afetam o maior número das funções biológicas como: sistema nervoso, aparelho digestivo, regiões produtoras de componentes sanguíneos e pele.⁸²

Como os tricotecenos são lipofílicos, podem ser facilmente absorvidos através da pele.⁸³ São compostos muito estáveis, tanto durante o armazenamento e moagem, bem como no cozimento de alimentos, não sendo degradados pelas altas temperaturas.⁸⁴

3.1.3.2.1 Desoxinivalenol

É a micotoxina produzida por *Fusarium* mais estudada e mais comumente detectada,²⁴ embora seja a menos tóxica dos tricotecenos.⁸⁵ É causadora dos maiores problemas na produção animal.³⁴ Estruturalmente, é um composto orgânico polar, que pertence aos tricotecenos do Tipo B. Sua molécula contém três grupos hidroxilas livres (-OH), que estão associados com a sua toxicidade.^{24,81,86}

Uma das propriedades físico-químicas mais importantes da micotoxina DON é a sua capacidade de resistir a altas temperaturas, o que aumenta os riscos da sua ocorrência em alimentos. Essa micotoxina é muito estável em condições de temperatura dentro do intervalo de 170 °C a 350 °C. Também não é observada sua redução durante a fritura de alimentos em óleo. No entanto, os níveis de DON são reduzidos em massa cozida e macarrão em razão de sua lixiviação para a água de cozimento devido a sua hidrossolubilidade.⁸¹

A micotoxina DON pode ocorrer em trigo, cevada, aveia e milho, como consequência da infestação pelo fungo *Fusarium*.⁸⁶⁻⁸⁸ Os organismos sobrevivem em resíduos deixados no campo da colheita da temporada anterior, proporcionando uma fonte de inóculo para a nova safra.⁷²

É popularmente conhecida como "vomitoxina" ^{24,72,87,89} por induzir vômitos e rejeição de alimentos em várias espécies animais.^{29,86} A toxicidade de DON é caracterizada por um conjunto de sintomas, incluindo a diarreia, vômitos, anorexia, ganho de peso reduzido, alterações neuroendócrinas e imunológicas, leucocitose, hemorragia, problemas de reprodução, e em última instância, pode levar à morte.^{86,87}

3.1.3.3 Fumonisinias

As fumonisinias são um grupo de micotoxinas não fluorescentes. Elas foram descobertas e caracterizadas em 1988.²⁴ São produzidas por *Fusarium verticillioides* (antigamente = *F. moniliforme*), *F. proliferatum* e outras espécies de *Fusarium*.^{90,91}

De ocorrência mundial, são frequentemente encontradas em cereais, principalmente em milho e subprodutos.^{29,90} Também podem ser encontradas em sorgo e arroz.⁸⁸ As toxinas podem ocorrer especialmente quando o milho é cultivado sob condições quentes e secas.⁹⁰ São tóxicas para o fígado, sendo que seu principal modo de ação é a interferência no metabolismo dos esfingolipídios.^{72,92}

Estes compostos têm recebido especial atenção devido a sua associação com o câncer.⁷⁴ A presença desta toxina está relacionada com a alta incidência de câncer de esôfago nos seres humanos da África do Sul e da China.⁸⁸ Além disso, estudos recentes comprovaram a atividade neurotóxica, imunossupressora e carcinogênica desta toxina, especialmente afetando órgãos como rim e fígado.¹⁸

Cerca de 15 diferentes fumonisinias já foram descritas.⁶⁸ Estas foram agrupadas em quatro categorias principais (A, B, C e P).^{92,93} As estruturas estão representadas na Figura 6.

A fumonisina que se encontra em maior abundância é a FB₁, seguida pela FB₂ e FB₃.⁶⁸ A FB₃ é considerada a mais tóxica.⁹³ As fumonisinias não são destruídas pelos processamentos comumente utilizados em alimentos.⁹ São relativamente estáveis ao calor, e o conteúdo de toxina é significativamente reduzido durante os processos em que a temperatura é superior a 150 °C. Há pouca degradação das fumonisinias durante a fermentação.⁸⁴

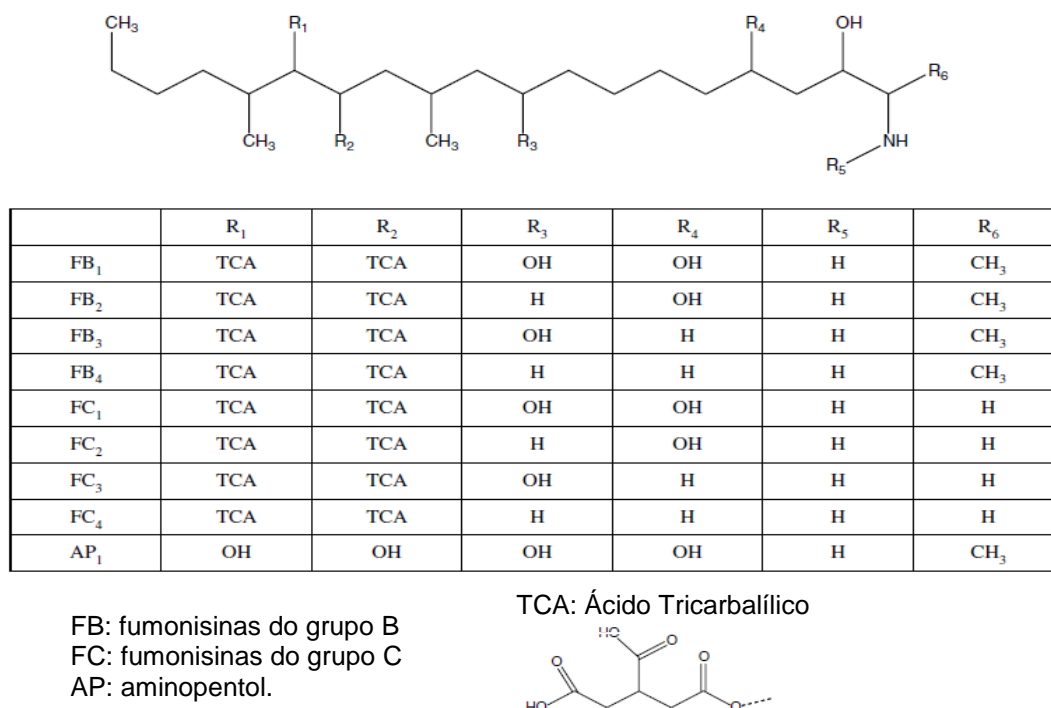


Figura 6. Estrutura química geral e substituintes das principais fumonisinias.

(Fonte: Soriano e Dragacci, 2004)⁹⁴

3.1.3.4 Ocratoxina

Esta micotoxina é muitas vezes referida como ocratoxina A. Apesar da existência de outras ocratoxinas, estas são de importância limitada em termos de toxicidade. A ocratoxina A é um composto naturalmente fluorescente.⁷³ Na Figura 7 estão representadas as estruturas químicas das ocratoxinas.⁹⁵

A ocratoxina A (OTA) foi descoberta em 1965 na África do Sul. Foi isolada como um metabolito tóxico de *Aspergillus ochraceus* (atualmente *Aspergillus westerdijkiae*) a partir de farinha de milho inoculada artificialmente com o fungo.^{24,28,83} Pouco depois, foi reconhecida como um potente agente nefrotóxico.⁸³ OTA é uma das micotoxinas mais relevantes, com grande importância agroeconômica. Seus efeitos tóxicos conhecidos são: imunossupressor,²⁹ teratogênico, inibição de fertilidade, efeitos mutagênicos e carcinogênicos.⁹⁶ Ela é a mais tóxica das ocratoxinas.⁸⁴ A IARC classificou OTA como um possível agente cancerígeno (grupo 2B).⁷⁴

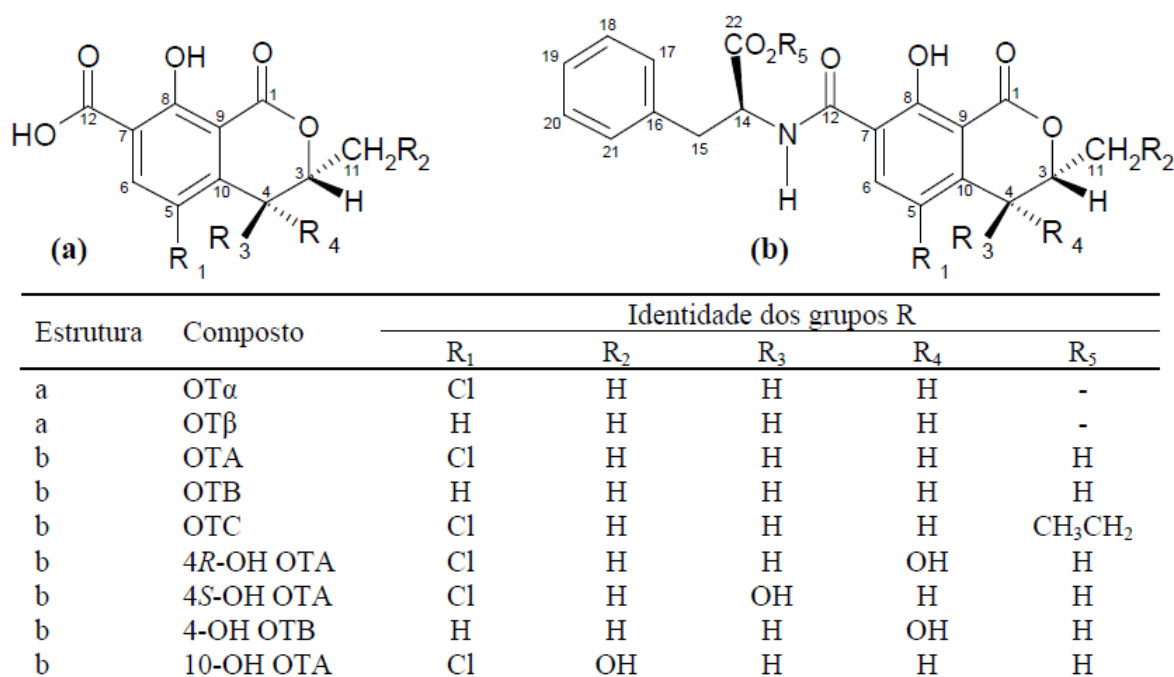


Figura 7. Estrutura química geral e principais substituintes das ocratoxinas.

(Fonte: Xiao et al., 1996)⁹⁵

A OTA é produzida por vários gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium*.¹⁹ É considerada a segunda micotoxina mais importante⁸³ e está comumente presente nos cereais, uvas, café e cacau. OTA é estável termicamente^{29,97} assim como a maioria dos processamentos,^{18,84} e por consequência pode ser encontrada em alimentos, mesmo após o processamento. Devido a estabilidade de OTA, pode ocorrer o acúmulo no sistema circulatório do fígado e de outros tecidos, tais como o tecido adiposo e muscular, e conseqüentemente, a sua presença nos alimentos de origem animal. Esta micotoxina exibe toxicocinética incomum, com meia-vida de 35,5 dias no homem após a ingestão oral (a mais longa conhecida em mamíferos).^{19,98,99}

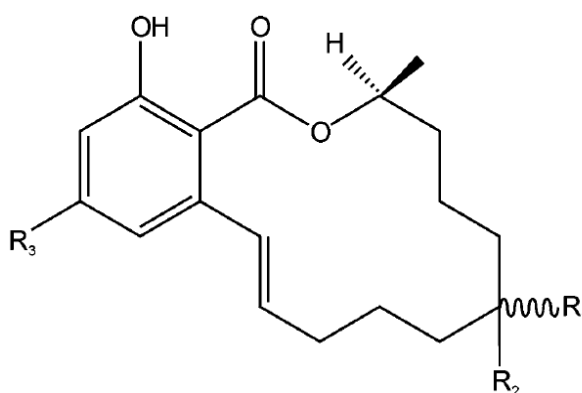
3.1.3.5 Zearalenona

O nome do composto zearalenona foi derivado de *Gibberella zeae*.³⁰ Anteriormente conhecido como F-2 toxina. A ZEN é uma micotoxina produzida por

uma variedade de fungos do gênero *Fusarium*, dentre eles os *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum*.¹⁰⁰

O principal efeito tóxico da ZEN é estrogênico.²⁹ Isto se deve à sua capacidade para acoplar com o receptor estrogênico, resultando em efeitos graves no sistema reprodutivo.³⁰ Pode causar aborto e infertilidade, estando associada com o câncer do colo do útero.⁸³ Em suínos machos, induz feminilização e supressão de libido. Em vacas, tem sido constatada infertilidade, produção reduzida de leite e hiperestrogenismo.¹⁰⁰ Além disso, a ZEN também mostra propriedades hepato-, hemato-, imuno- e genotóxicas.^{30,100} Na Figura 8, encontram-se ilustradas as estruturas química da ZEN e compostos derivados.¹⁰¹

Na maioria das vezes esta micotoxina é encontrada em milho. No entanto, é encontrada também em outras culturas importantes, tais como trigo, cevada, sorgo e centeio.^{30,88,100}



	R ₁	R ₂	R ₃
Zearalenona e derivados			
Zearalenona	-	=O	OH
α-Zearalenol	OH (R)	H	OH
β-Zearalenol	OH (S)	H	OH
Zearalenona-4-sulfato	H	H	OSO ₃ H

Figura 8. Estrutura química da zearalenona e seus compostos relacionados.
(Fonte: Köppen et al., 2010)⁷⁰

3.1.4 Co-ocorrência de micotoxinas: efeitos aditivos, sinérgicos

A maioria das pesquisas de micotoxinas se concentra sobre a ocorrência de toxinas individuais em alimentos. Porém, várias micotoxinas podem ocorrer simultaneamente, quer a partir do mesmo ou a partir de diferentes espécies de fungos. No entanto, há relativamente pouca informação sobre a interação entre concomitância de micotoxinas e as consequências em termos de toxicidade.¹⁰²

A presença de múltiplas micotoxinas em um único alimento pode levar a efeitos sinérgicos, aditivos e antagonistas. Interações complexas e sinérgicas tóxicas entre diferentes micotoxinas, muitas das quais isoladamente apresentam toxicidade relativamente baixa. Os efeitos sinérgicos ocorrem quando o efeito da combinação de várias micotoxinas são maiores do que os efeitos individuais da soma das micotoxinas presentes no alimento. Já, o efeito aditivo ocorre quando a resposta à exposição a várias micotoxinas é a mesma que a resposta da soma de cada toxina individualmente. Por fim, o efeito antagonista, ocorre mais raramente, quando o efeito tóxico de várias micotoxinas é inferior ao efeito previsto a partir da resposta da soma das toxinas individualmente.¹⁰³

A toxicidade combinada é muito difícil prever porque é influenciada por vários fatores, incluindo a química do mecanismo de ação, toxicodinâmica e toxicocinética, planejamento experimental, bem como os aspectos estatísticos.¹⁰⁴

Devido aos efeitos sinérgicos, as combinações de micotoxinas têm maior impacto sobre a saúde do que as toxinas isoladas. Por isso, níveis aparentemente baixos de toxinas individuais tornam-se importantes quando combinados.

3.2 CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS FÚNGICAS

É importante não apenas produzir, mas também é necessário garantir a qualidade dos alimentos produzidos, com custos reduzidos e com perdas e impacto ambiental minimizados. O controle químico de doenças é, em muitos casos, a única medida eficiente e economicamente viável para garantir a alta produtividade e qualidade de produção.¹⁰⁵

Os fungicidas são uma classe de agrotóxicos utilizados para matar ou inibir o crescimento de fungos. Eles são largamente utilizados na indústria farmacêutica, na agricultura, na proteção das sementes durante o armazenamento e para prevenir o crescimento de fungos que produzem toxinas.¹⁰⁶

Desempenham um papel importante no controle da presença de fungos nas culturas agrícolas. Estes têm de ser considerados seguros para o meio ambiente e seres humanos antes de autorizada a sua utilização no campo.⁴⁸ Os fungicidas são aplicados para controlar a giberela quando as condições favoráveis para desenvolvimento da doença estão previstos.¹⁰⁷

Os fungicidas mais utilizados são da classe dos triazóis. Incluem metconazole, protioconazole, tebuconazole, protioconazole + tebuconazole, e propiconazole.¹⁰⁷ Contudo, o uso de fungicidas, pode, em determinadas condições, estimular a produção de micotoxinas.⁴⁸ Fungicidas da classe química das estrobilurinas, geralmente não são recomendadas para o controle da giberela porque alguns estudos demonstraram que podem estar associadas com níveis elevados de DON em cereais.^{107,108} Para garantir menor grau de contaminação por micotoxinas em grãos de trigo, recomenda-se a aplicação destes fungicidas apenas em mistura com triazóis.^{107,109-111}

Têm sido usados com sucesso para controlar muitas doenças desde a sua introdução no final do século XIX. No entanto, sua eficácia contra giberela tem sido inconsistente. Em muitos casos, esta inconsistência pode ser atribuída a uma aplicação incorreta do fungicida. No entanto, mesmo quando aplicados corretamente, os melhores produtos disponíveis são apenas 60-70% eficazes.¹⁸ Isto ocorre pela dificuldade de se atingirem os sítios de infecção (anteras). Toda tecnologia de aplicação foi desenvolvida para doenças foliares (que estão na horizontal). Como as espigas estão em posição vertical, acabam sendo um alvo mais difícil de ser atingido por completo.⁶²

A giberela é uma doença complexa em termos de agentes patogênicos envolvidos, fontes de inóculo e toxinas produzidas e, como tal, é uma doença complexa para controlar com fungicidas.¹⁸ Embora as boas práticas agrícolas, certamente, ajudam a reduzir o risco de epidemias associadas a *Fusarium*, a aplicação de fungicidas permanece a medida mais importante para reduzir os sintomas de *Fusarium*. O controle químico dessa complexa doença patogênica

continua a ser um problema sério. O curto período vulnerável do patógeno (florescimento), o fato de ser um patógeno de espiga, e devido ao fato de infectar principalmente em condições de umidade adequada, vem a dificultar um controle eficiente.¹⁰⁶

Fungicidas visando o controle da giberela são normalmente aplicados na fase de floração porque as anteras extrusadasⁱ são os locais de infecção primária (Figura 9), embora a janela de vulnerabilidade durante a infecção pode se estender desde a floração até as fases de enchimento de grão, dependendo da cultivar em questão.¹¹²

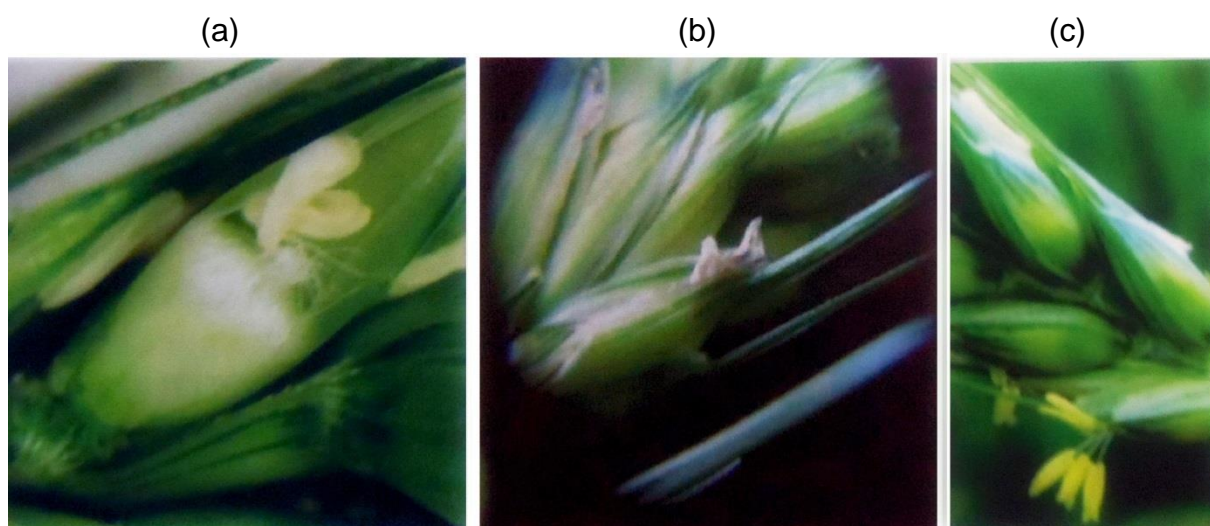


Figura 9. (a) Anteras inclusas; (b) Anteras parcialmente exclusas ou presas; e (c) Anteras totalmente exclusas. (Fonte: Reis, Casa e Tonin, 2011)¹¹³

ⁱ Quanto a localização das anteras no antécio, elas podem ser: (a) Anteras inclusas ou internas não expostas, que permanecem aderidas ao estigma, no interior do antécio; não se dissociando a flor, ficam invisíveis; (b) Antera parcialmente excluída ou presas; e (c) Totalmente exclusas.¹¹³

3.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MICOTOXINAS

A legislação sobre alimentos serve para proteger a saúde dos consumidores e os interesses econômicos dos produtores de alimentos.¹⁸ Devido aos riscos para saúde, organizações nacionais e internacionais estabeleceram limites máximos de micotoxinas em alimentos, a fim de garantir a segurança dos alimentos.¹⁷

No Brasil, recentemente foi implementada uma legislação específica para micotoxinas em grãos de diversos cereais, incluindo trigo e milho, a qual determina o limite máximo tolerável (LMT) em grãos e diversos subprodutos.¹¹⁴

A legislação sobre micotoxinas varia de acordo com o país, sendo que o limite tolerável varia conforme o tipo de alimento. No Brasil, os limites máximos de micotoxinas estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estão na Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.¹¹⁴ A Resolução nº 59 da ANVISA, publicada em 30/12/2013 no Diário Oficial da União,¹¹⁵ prorrogou de janeiro de 2016 para 1º de janeiro de 2017 as mudanças que estabelecem novos limites de micotoxinas tolerados para o trigo, milho, arroz, cevada e seus derivados.

Dessa forma, a resolução atendeu uma proposta de prorrogação encaminhada para a ANVISA, em setembro de 2013, pela Câmara Setorial de Culturas de Inverno, do Ministério da Agricultura. Essa medida foi necessária para que, até o ano de 2016, sejam realizados estudos para verificar quais limites se aplicam a realidade brasileira e estabelecer novas regras, prevalecendo até lá a tabela de limites em vigor desde janeiro de 2012.¹¹⁶ Na Tabela 4, encontram-se os valores dos limites máximos tolerados nos diferentes produtos alimentícios.

Tabela 4. Limites máximos tolerados para micotoxinas em cada produto alimentar e os prazos estabelecidos para aplicação da legislação brasileira.

Micotoxina	Produtos	Limite Máximo Tolerado (µg/kg)			
		Imediata	2012	2014*	2016*
Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5			
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1			
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20			

Desoxinivalenol (DON)	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200		
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada		2000	1500 1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada		1750	1250 750
	Trigo e milho em grãos para posterior processamento			3000
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10		
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2		
	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada			20
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.		200	100
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20		
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho		300	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo		400	200
	Milho em grão e trigo para posterior processamento			400
Fumonisinias (B ₁ , B ₂)	Milho de pipoca	2000		
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200		
	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha		2500	1500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho		2000	1000
	Milho em grão para posterior processamento			5000

Adaptado ANVISA 2011.¹¹⁴

*Prazos alterados pela resolução RDC nº 59/2013.¹¹⁵

3.4 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

Normalmente, os contaminantes são divididos em dois grupos, as substâncias uniformemente distribuídas (pesticidas, aditivos, metais pesados, PCB, dioxinas, resíduos de medicamentos, entre outros) e não uniformemente distribuídas (toxinas naturais, organismos geneticamente modificados, salmonelas, entre outros). O tipo de distribuição dos contaminantes em alimentos e rações tem implicações importantes na determinação destes nas diversas matrizes.³

O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de micotoxinas não é uma tarefa simples.²⁵ Exigências como baixos limites de detecção, alta sensibilidade e a necessidade de laboratórios especializados, criam desafios para análises de rotina.¹⁹

Além de fatores como precisão e reprodutibilidade, procedimentos analíticos são caracterizados por três critérios práticos: (a) a velocidade com que a análise pode ser realizada, (b) o nível de habilidade técnica necessária para efetuar o ensaio, e (c) se o ensaio proporciona um resultado qualitativo ou quantitativo.⁸⁸ Necessitam-se métodos rápidos, de fácil execução e quantitativos.¹¹⁷ Além disso, é importante ser capaz de detectar e quantificar pequenas concentrações, para que se atendam as normatizações da legislação.¹⁸

É difícil determinar com precisão a concentração de micotoxinas em um lote de grande volume, devido à variabilidade associada com todos os procedimentos desde a amostragem até a determinação instrumental.^{73,88} Porém, é de suma importância que os resultados obtidos estejam em conformidade. Resultados falsos positivos podem acarretar na rejeição desnecessária do produto, gerando prejuízos econômicos. Por outro lado, lotes com concentrações acima dos limites estabelecidos podem ser aceitos como lotes com qualidade, podendo acarretar na aceitação de um produto sem qualidade que poderá causar danos à saúde do consumidor.¹¹⁸

Um procedimento de determinação de micotoxinas consiste geralmente em três etapas: amostragem, preparo da amostra e determinação instrumental (quantificação).^{17,20,25,88}

3.4.1 Amostragem

A etapa de amostragem aborda questões tais como, quando, onde e quanto de amostra é necessário coletar. Especifica como a amostra será selecionada ou retirada do lote, o número de amostras, e o tamanho das mesmas.^{18,20,118}

A amostragem desempenha um papel crucial na determinação de micotoxinas devido à distribuição heterogênea destes contaminantes.¹¹⁹ A seleção de uma amostra representativa para análise é de fundamental importância, uma vez que resultados errôneos podem levar a remessas inaceitáveis sendo aceitas ou cargas satisfatórias sendo rejeitadas de forma desnecessária.^{17,19}

Assim, esta etapa é responsável pela maior parte da incerteza associada com a variabilidade total de um procedimento de determinação de micotoxinas.¹²⁰ Cerca de 90% do erro associado nas determinações de micotoxinas pode ser atribuído à forma com que a amostra original é coletada.¹⁹

A amostragem, a subamostragem e a determinação analítica são responsáveis pelas variações de 75,6%, 15,9% e 8,5% na determinação de micotoxinas, respectivamente (Figura 10).¹⁸

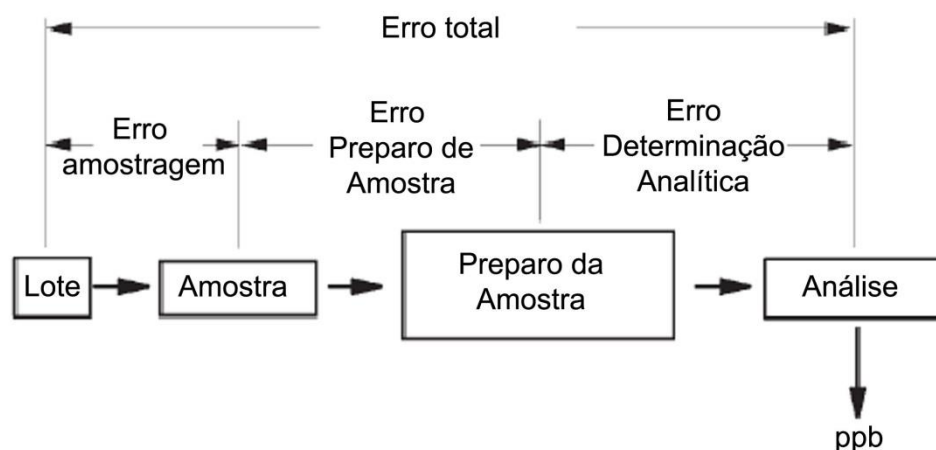


Figura 10. Variabilidade associada com o procedimento para determinação de micotoxinas.(Fonte: Magan e Olsen, 2004; Trucksess e Pohlan, 2001)^{18,25}

Alguns núcleos do lote de um produto podem conter elevadas concentrações de toxinas, enquanto outros não contêm toxinas, o que resulta numa distribuição desigual da micotoxina. Isto é devido ao fato de que os fungos não crescem

uniformemente, e as toxinas produzidas são depositadas em alguns grãos de cereais, e não em outros (Figura 11). Portanto, micotoxinas tendem a se concentrar em determinados pontos.^{20,73,121}

Quanto maior o grau de contaminação, maior a probabilidade de uniformidade na distribuição e de que os resultados das determinações sejam mais exatos. Inversamente, quando a concentração global de uma toxina em um lote de grão é baixa, a distribuição desigual é acentuada.¹²¹

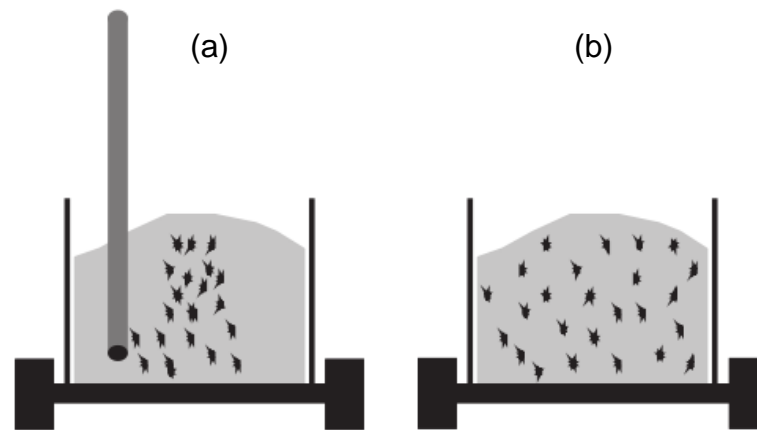


Figura 11. Distribuição dos analitos em um lote. (a) Distribuição não homogênea (b) distribuição homogênea. (Fonte: Krska et al., 2012)⁷³

Uma amostragem adequada é crucial para diminuir a variabilidade dos resultados na determinação de micotoxinas.⁸⁸

3.4.2 Preparo da amostra

No preparo das amostras para análise cromatográfica, o custo e o tempo, bem como as fontes de erros durante a análise são considerados. O preparo da amostra representa cerca de 60% do tempo e do custo da análise.²⁰

Uma vez que uma amostra foi tomada a partir de um lote, esta é triturada,²⁵ podendo ser por via seca ou via úmida. É muito importante triturar a totalidade da amostra.^{88,118} Após moagem, a amostra deve ser homogeneizada, e dela ser retirada uma subamostra para a extração e quantificação das micotoxinas.⁸⁸

A amostra pode ser triturada com um líquido apropriado, tal como água, formando uma suspensão entre as partículas da amostra e a água, chamada de *slurry*. Uma pequena porção desta mistura é utilizada para a extração. A utilização do *slurry* ao invés da amostra seca, pode diminuir a quantidade necessária de solventes para a extração, e com isso, os problemas de eliminação de resíduos são minimizados.⁸⁸

Na maioria dos casos, o preparo da amostra em si compreende vários processos. Eles podem influenciar fortemente a recuperação dos analitos, podendo afetar portanto, a exatidão e precisão de todo o método analítico.²⁰

Uma vez que a micotoxina foi extraída da matriz, o extrato líquido pode ser purificado para remover impurezas que possam dificultar a detecção e a quantificação da micotoxina. A purificação é um requisito para alguns, mas não todos os métodos analíticos.⁸⁸ Além de remover impurezas da amostra, em alguns casos esta etapa consiste também em uma etapa de pré-concentração do analito.¹⁷

As micotoxinas são compostos com diferentes propriedades físico-químicas. Por isso, normalmente, os procedimentos específicos de extração e purificação eram otimizados apenas para uma micotoxina alvo. Nos últimos anos a tendência é que se busque desenvolver métodos de extração diferenciados, capazes de realizar a extração simultânea de várias micotoxinas ou de um grupo de micotoxinas que apresentem características químicas semelhantes.^{17,20}

Quanto maior for o número de micotoxinas, mais difícil é encontrar um procedimento de purificação adequado, que permita recuperações quantitativas para todos os analitos. Por esta razão, a maior parte dos métodos multimicotoxinas omite a etapa de purificação. Esta estratégia, muitas vezes resulta em problemas de sensibilidade, seja em função a um maior efeito matriz ou a falta de pré-concentração da amostra.¹²²

Outra opção, recentemente introduzida na análise multimicotoxinas, é o uso das várias modificações do método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro), hoje amplamente utilizado na análise multirresíduo, por promover rápida extração e purificação. O princípio fundamental do método QuEChERS é a partição do analito entre a acetonitrila e a água, induzida pela adição de sais inorgânicos. Enquanto que os analitos são transferidos para uma fase orgânica, as impurezas mais polares da matriz são deixadas numa camada aquosa.⁷⁵ É um dos métodos

preferidos para a análise de alimentos, porque combina várias etapas e abrange uma grande gama de analitos que podem ser determinados em relação às técnicas de extração mais antigas. Pizzutti e colaboradores¹²³ adaptaram este método para extração simultânea de pesticidas e micotoxinas.

3.4.3 Determinação instrumental

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determinação de micotoxinas em diversas matrizes. Técnicas analíticas para determinação e quantificação incluem técnicas imunológicas, cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC).⁴⁷

A LC tem sido a técnica analítica mais amplamente utilizada para determinação de micotoxinas, considerando seu desempenho satisfatório em termos de exatidão, precisão, sensibilidade e reprodutibilidade.^{19,117,124} A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com diferentes detectores é frequentemente utilizada tanto para as análises de rotina assim como para a realização de pesquisas.¹²⁵ Porém a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas está ganhando cada vez mais espaço (Figura 12).¹⁹

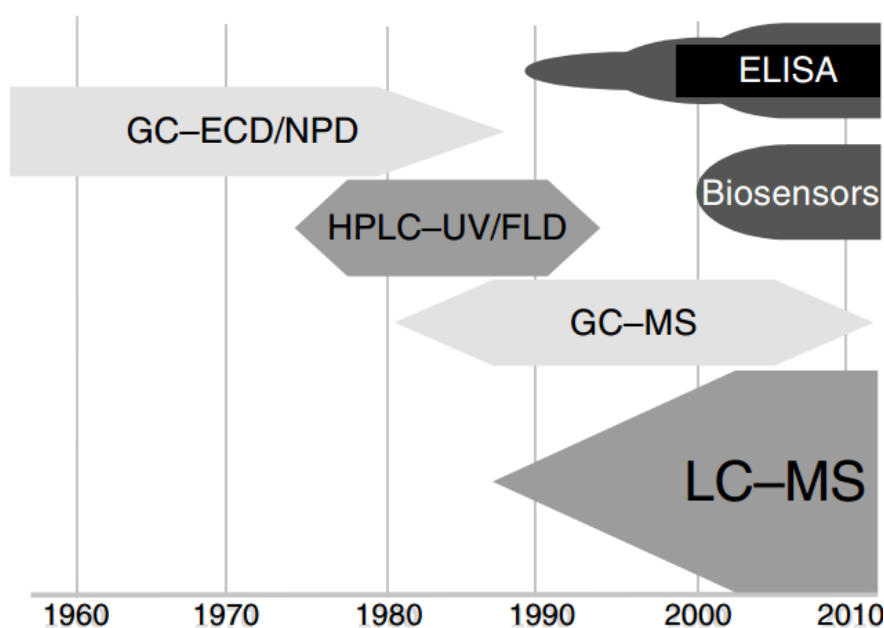


Figura 12. Tendências na análise de micotoxinas a partir da perspectiva do tempo (1960–2010) (Fonte: Hajslova, Zachariasova e Cajka, 2011)¹²⁶

Embora os fatores limitantes na utilização da cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massas (LC-MS) sejam devido ao alto custo dos equipamentos, aos requisitos de laboratório relativamente avançados e as limitações no tipo dos solventes utilizados na extração e separação,¹⁷ nos últimos anos esta técnica se tornou muito utilizada. A LC-MS tem avançado nos últimos dez anos para o *status* de técnica de referência no campo de determinação de micotoxinas.¹²⁵ Além de simplificar o preparo de amostras,¹²⁷ fornece dados seletivos e quantitativos para várias micotoxinas a partir de uma única análise, mas pode sofrer os efeitos da matrizⁱⁱ.^{128,129}

Técnicas de MS são essenciais para pesquisas avançadas em segurança dos alimentos e monitoramento ambiental. Estas áreas são importantes para garantir a saúde dos seres humanos e animais.

A necessidade de métodos empregando LC-MS/MS é ainda maior porque a identificação inequívoca do analito e a quantificação exata são pré-requisitos em análise de alimentos, de acordo com recentes leis e regulamentos nacionais e internacionais. Além disso, a espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS), prevê um grau avançado de segurança na identificação do analito devido ao seu elevado grau de seletividade. As técnicas de LC-MS ou LC-MS/MS permitem a determinação simultânea de compostos em concentrações relativamente baixas. Vários métodos por LC-MS/MS tem sido publicados para determinação de diferentes grupos de micotoxinas.¹³⁰ A Tabela 5 mostra alguns métodos recentemente publicados.

ⁱⁱ O efeito matriz é causado por substâncias co-extrativas, que além de produzir a supressão de íons na interface de ionização, causa também a perda ou acréscimo do sinal cromatográfico, influenciando a quantificação dos compostos de interesse. Este efeito pode ocorrer ao longo de todo o tempo da análise cromatográfica.¹²⁹

Tabela 5. Resumo de métodos multimicotoxinas publicados em 2013 para análise de cereais e derivados por LC-MS/MS.

Analitos	Matriz	Extração Solvente /Purificação	Referência
10 Tricotecenos	Grãos e produtos derivados de centeio orgânico e convencional	Acetonitrila/Água (80:20, v/v) SPE <i>Bond Elut Mycotoxin</i> [®]	Blajet-Kosicka ¹³¹
29 micotoxinas, dentre elas Aflatoxinas, Tricotecenos	Plantas de trigo	Foi testado diferentes solventes de extração.	Schenzel ¹³²
AFLA B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ ; OTA, DON, ZEN, T-2 e HT-2	Farinha de trigo, farinha de cevada, farinha de aveia e pães a base de farinha de trigo e farinha de centeio.	Acetonitrila/Água (84:16, v/v) SPE - polimérica	Lattanzio et al ¹²²
AFLA B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ e M ₁ ; OTA, ZEN e Fumonisin	Pistaches, avelãs, pimentão, cacau, café, milho e flocos de milho. Cereais, pão, leite, queijo, óleo de gergelim	Coluna de imunoafinidade	Şenyuva et al. ¹³³
17 micotoxinas, incluindo tricotecenos, aflatoxinas	Alimentos, incluindo alimentos infantis e animais.	Acetonitrila/Água (84:16, v/v) SPE	Ren et. al. ¹³⁴
Tricotecenos	Massas (seca e fresca)	Acetonitrila	Serrano et al ¹³⁵
69 micotoxinas, dentre elas tricotecenos, aflatoxinas, fumonisinas e ocratoxinas.	Milho, amendoim, soja e produtos derivados destes, cerveja, sopa de legumes.	Acetonitrila/Água/ácido acético glacial (79:20:1, v/v/v)	Abia et al. ¹³⁶
13 micotoxinas de <i>Fusarium</i> , entre elas DON, DAS, T-2 e HT-2	Cereais orgânicos (trigo, aveia, cevada, centeio) e diferentes produtos de cereais orgânicos (farinha, flocos de cereais, cereais parboilizado)	Acetonitrila/Água (84:16, v/v)	Juan et al. ¹³⁷
AFLA B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ ; OTA, DON, ZEN, T-2 E HT-2, Fumonisin B ₁ e B ₂	Trigo, cevada, sorgo e produtos derivados de cereais	Acetonitrila/Água (80:20, v/v)	Oueslati et al. ¹³⁸
Desoxinivalenol -3-glucoside (DON-3G)	Produtos processados derivados de cereais como pão, biscoito, mini-bolos.	Acetonitrila/Água (80:20, v/v) coluna de imunoafinidade	Suman et al. ¹³⁹

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Serão descritos os materiais e os métodos utilizados na validação do método analítico, assim como para a coleta e análise das amostras. Os ensaios a campo realizados em cooperação com empresas parceiras, não são descritos neste item, pois a parte agrônômica não foi o foco deste trabalho. Cabe ressaltar que todos os ensaios foram realizados por recursos humanos qualificados, seguindo procedimentos rigorosos desde o cultivo até a análise das amostras.

4.1 MATERIAIS

Este trabalho foi realizado através da cooperação entre o Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), um terminal portuário da cidade de Rio Grande – RS, uma cooperativa, um moinho e uma fábrica de ração animal. Todas as análises laboratoriais foram realizadas no CEPARC, o qual está em processo de acreditação pelo INMETRO. Desta forma, todo trabalho foi realizado de acordo com norma NBR ISO/IEC 17025, requisito geral para competência de laboratórios de ensaio e calibração.

4.1.1 Instrumentos e acessórios

- Cromatógrafo a líquido, sistema UPLC-MS/MS (Waters, EUA) composto por:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
 - Coluna cromatográfica Bech C18, 100 mm de comprimento; 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters, EUA);
 - Detector MS Triplo Quadrupolo, Xevo TQ-S (Waters,EUA), utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI), com interface (Z-spray), operando no modo positivo;
 - Sistema de aquisição de dados através do software *MassLynx* e *Targetlynx 4.1* (Waters, EUA);
 - Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q[®]- resistividade 18,2 MΩ cm (MilliPore[®], EUA);
- Balança analítica de precisão com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Balança analítica de precisão com 2 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Pipetador automático *Handy Step* (Brand, Alemanha);
- Pipetador semiautomático (Eppendorf, Alemanha);
- Centrífuga Hareaus Varifugue (Thermo Scientific, Alemanha);

- Homogeneizador/triturador (Silverston Machine Ltda, Waterside Chesan, Bucks, Inglaterra);
- Mesa agitadora modelo 3016 (GFL, Alemanha);
- Espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 (Varian, USA).

4.1.2 Reagentes e soluções

- Metanol, Tolueno, Ácido Acético Glacial, Acetonitrila, todos com pureza grau pesticida (J. T. Baker Chemicals, EUA ou Mallinckrodt, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Mili-Q[®] (resistividade de 18,2 MΩ Cm);
- Ácido Fórmico (Sigma – Aldrich, Alemanha);
- Sulfato de Magnésio Anidro 99,5% de pureza (UCT – Inglaterra);
- Soluções de Dicromato de Potássio em Ácido Perclórico, padrão NIST (SpecSol[®], Brasil);

4.1.3 Gases

- Argônio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil) (gás de colisão do UPLC-MS/MS);
- Nitrogênio 99,999% de pureza (Proveniente do gerador de Nitrogênio acoplado ao LC-MS/MS) (gás de dessolvatação do UPLC-MS/MS);

4.1.4 Insumos

- Tubo de polipropileno de fundo cônico, com tampa rosqueável, capacidade de 50 mL (Nalgene, EUA);
- *Vial* (Waters, EUA);
- Balão volumétrico certificado de diversos volumes (Blau Brand, Alemanha ou Restek, EUA);
- Frasco de vidro âmbar para armazenamento de soluções;

4.1.5 Micotoxinas selecionadas

Para este estudo, foram selecionadas 12 micotoxinas. A escolha dos analitos se deve a relevância dos mesmos na contaminação em milho e trigo e por serem os de incidência mais comumente relatados nestas matrizes alimentares. As micotoxinas em estudo foram: Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), Ocratoxina A, Fumonisin (B₁ e B₂), Desoxinivalenol, Diacetoxiscirpenol e Zearalenona (Sigma Aldrich, Alemanha) Toxina T-2 e Toxina HT-2 (Fermentek, Israel).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das soluções analíticas

4.2.1.1 Preparo das soluções estoque

A micotoxina pura na forma de cristal (sal), especialmente as aflatoxinas, pela sua natureza eletrostática, tende a se dispersar na área do laboratório. Precauções especiais são necessárias para se evitar a contaminação do ar, bancadas, paredes e frascos.⁸²

O preparo das soluções analíticas estoque foi efetuado de maneira diferenciada para cada uma das micotoxinas. Foi considerado o valor de massa informado pelo fabricante na embalagem do material de referência. Desta forma, inicialmente, não se removeu as tampas originais e septos dos frascos contendo os materiais de referência, evitando, desta forma, a disseminação de partículas das micotoxinas. Foi apenas removida a proteção central de alumínio do frasco com o conteúdo. O septo foi perfurado com uma agulha descartável e adicionado no frasco o solvente/ou solução adequado utilizando uma seringa de vidro *Hamilton*. Desta forma, o material de referência contido no interior do frasco foi solubilizado, para então, o frasco ser aberto e o conteúdo deste transferido para um balão volumétrico certificado, completando o volume com o mesmo solvente utilizado para a solubilização do conteúdo do interior do frasco (Tabela 6).

Tabela 6. Preparo das soluções estoque das 12 micotoxinas em estudo.

Micotoxina	Massa do material de referência (mg)	Fornecedor	Solvente	Volume de solvente (mL)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Aflatoxina B ₁	5	Sigma Aldrich	Metanol	100	50
Aflatoxina B ₂	5	Sigma Aldrich	Metanol	100	50
Aflatoxina G ₁	5	Sigma Aldrich	Metanol	100	50
Aflatoxina G ₂	5	Sigma Aldrich	Metanol	100	50
Zearalenona	10	Sigma Aldrich	Acetonitrila	100	100
Diacetoxiscirpenol	5	Sigma Aldrich	Acetonitrila	50	100
Desoxinivalenol	5	Sigma Aldrich	Acetonitrila	5	1000
Toxina T-2	10	Sigma Aldrich	Acetonitrila	100	100
Toxina HT-2	10	Sigma Aldrich	Acetonitrila	100	100
Fumonisina B ₁	5	Sigma Aldrich	Acetonitrila/ água (50:50, v/v)	50	100
Fumonisina B ₂	5	Fermentek	Acetonitrila/ água (50:50, v/v)	50	100
Ocratoxina A	5	Fermentek	Tolueno/Ácido Acético (99:1, v/v)	250	20

Para as micotoxinas Toxina T-2, Toxina HT-2, DAS, Fumonisina B₁, Fumonisina B₂, considerou-se o grau de pureza especificado pelo fabricante para o preparo da solução e cálculo da concentração final obtida. Para os padrões das demais micotoxinas, que não apresentam pureza especificada (por não serem obtidos sinteticamente e sim a partir de micro-organismos), fez-se necessário a confirmação da concentração de suas soluções através de outra técnica analítica. Essas soluções de micotoxinas foram padronizadas em espectrofotômetro UV-Vis segundo o Método Oficial 971.22 da AOAC modificado.¹⁴⁰

Soluções de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) nas concentrações de 0,25; 0,125 e 0,0625 mmol L⁻¹, preparadas em solução de ácido perclórico (HClO₄) a 0,01 mmol L⁻¹ foram utilizadas para a determinação do fator de correção (FC) do Espectrofotômetro UV-Vis e esse foi empregado no cálculo para correção das concentrações das soluções analíticas.

Realizou-se a leitura da medida de absorvância das soluções de K₂Cr₂O₇ nas três concentrações já citadas, no comprimento de onda de absorção máxima (350 nm), usando a solução de ácido perclórico como branco. Calculou-se a absorvidade molar específica (ϵ) para cada uma das soluções usando a Equação 1.

$$\varepsilon = \frac{A \times 1000}{\text{Concentração em mM}}$$

Equação 1

Onde:

ε = absorptividade molar de cada solução de $K_2Cr_2O_7$;

A = absorvância de cada solução de $K_2Cr_2O_7$.

Após calcular a absorptividade molar de cada solução de $K_2Cr_2O_7$ (0,25; 0,125 e 0,0625 mmol L⁻¹), foi realizada a média dos três valores de ε , para determinar o fator de correção através da Equação 2. Exemplo detalhado no Apêndice 1:

$$FC = \frac{3160}{\varepsilon_{\text{médio}}}$$

Equação 2

Onde:

FC = Fator de correção do espectrofotômetro;

$\varepsilon_{\text{médio}}$ = média dos 3 valores de ε ,

obtidos de cada solução de $K_2Cr_2O_7$

O intervalo de aceitabilidade do fator de correção do espectrofotômetro deve ser: $1,05 > FC > 0,95$.

As soluções estoque de AFLA B₁, B₂, G₁ e G₂; ZEN, DON e OTA foram diluídas em solvente adequado e foi realizado as leituras de absorvância no comprimento de onda indicado para cada micotoxina conforme, Tabela 7.

Tabela 7. Informações para correção da concentração de soluções analíticas de micotoxinas por espectrofotometria UV-Vis.

Micotoxina	Solvente	Diluição	Comprimento de Onda (nm)	Coefficiente de Absortividade molar (ϵ)	Peso Molecular (g)
Aflatoxina B ₁	Metanol	1:5	362	21500	312
Aflatoxina B ₂	Metanol	1:5	362	21400	314
Aflatoxina G ₁	Metanol	1:5	362	17700	328
Aflatoxina G ₂	Metanol	1:5	362	19200	330
Zearalenona	Acetonitrila	1:5	274	12622	318
Desoxinivalenol	Acetonitrila	0,1:5	217	6618	296,3
Ocratoxina A	Tolueno/Ácido Acético (99:1, v/v)	-	333	5440	403,5

A concentração final das soluções analíticas estoque de cada micotoxina foi calculada utilizando a Equação 3. Exemplo detalhado do cálculo no Apêndice 2:

$$C = \frac{A \times FC \times PM \times 1000 \times FD}{\epsilon} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

C = concentração da solução de micotoxina (μg de micotoxina mL^{-1})

A = absorvância medida no espectrofotômetro UV-Vis;

FC = fator de correção do equipamento;

FD = fator de diluição;

PM = peso molecular da micotoxina;

ϵ = absorvância molar da micotoxina.

4.2.1.2 Preparo da solução mistura e das soluções analíticas de trabalho

Considerando que cada um dos grupos de micotoxinas estudados apresentam diferentes sensibilidades frente a técnica de UPLC-MS/MS, bem como, diferentes limites máximos toleráveis para cada micotoxina, foi necessário que cada um desses grupos fossem estudados em concentrações diferentes. Por essa razão,

a solução mistura é composta pelas 12 micotoxinas estudadas, divididas em dois grupos, com concentrações distintas.

Preparou-se 200 mL de uma mistura de todas as micotoxinas analisadas por UPLC-MS/MS em acetonitrila. A concentração de cada micotoxina na solução mistura encontra-se descrita na Tabela 8. Essa solução foi armazenada em diferentes frascos de cor âmbar (tampa contendo septo de teflon[®]), com capacidade de 30 mL. Este fracionamento foi realizado a fim de evitar possíveis contaminações e/ou evaporações provenientes da manipulação constante do volume total da solução.

Tabela 8. Fornecedores dos materiais de referência, solventes utilizados no preparo das soluções analíticas estoque e concentrações das micotoxinas nas soluções estoques e na solução mistura.

Micotoxina	Grupo	Solvente	Concentração da solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração da solução mistura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Aflatoxina B ₁	1	Metanol	53,5	0,5
Aflatoxina B ₂	1	Metanol	23,0	0,5
Aflatoxina G ₁	1	Metanol	52,8	0,5
Aflatoxina G ₂	1	Metanol	45,0	0,5
Ocratoxina A	1	Tolueno/ Ácido Acético (99:1, v/v)	23,9	0,5
Fumonisina B ₁	2	Acetonitrila/água (1:1, v/v)	98,0	25
Fumonisina B ₂	2	Acetonitrila/água (1:1, v/v)	98,0	25
Desoxinivalenol	2	Acetonitrila	1000	25
Diacetoxiscirpenol	2	Acetonitrila	1000	25
Zearalenona	2	Acetonitrila	200	25
Toxina T-2	2	Acetonitrila	98,0	25
Toxina HT-2	2	Acetonitrila	98,0	25

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em freezer a -18 °C. Antes do uso, tais soluções foram retiradas com antecedência do congelador e deixadas em repouso até atingirem a temperatura aproximada de 20 °C (laboratório com temperatura controlada).

Para a confecção das curvas analíticas usadas para os estudos de linearidade e de efeito matriz, prepararam-se as soluções analíticas de trabalho a

partir da solução mistura. Adicionaram-se volumes definidos dessa solução mistura em sete balões volumétricos certificados e completou-se o volume conforme Apêndice 3. Em seguida, transferiu-se 500 μL de cada uma das sete soluções analíticas de trabalho para *vials* separados e a cada um deles adicionou-se 500 μL do solvente de extração (acetoneitrila contendo 1% de ácido acético e padrão interno para controle do instrumento) (Tabela 9).

Tabela 9. Concentração final das micotoxinas nas soluções das curvas analíticas.

Micotoxina	Concentração das soluções utilizadas para confecção das curvas analíticas (ng mL^{-1})						
	1	2	3	4	5	6	7
Aflatoxina B ₁							
Aflatoxina B ₂							
Aflatoxina G ₁	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0
Aflatoxina G ₂							
Ocratoxina A							
Fumonissina B ₁							
Fumonissina B ₂							
Desoxinivalenol							
Diacetoxiscirpenol	5,0	10,0	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0
Zearalenona							
Toxina T-2							
Toxina HT-2							

A fim de propiciar uma avaliação capaz de confirmar a eficiência e a qualidade geral do procedimento de extração e da análise cromatográfica, houve a introdução de padrões internosⁱⁱⁱ. A quantificação foi realizada por padronização externa, ou seja, levando-se em consideração apenas as áreas dos picos das micotoxinas em estudo.

O padrão interno do instrumento foi propoxur na concentração de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para confecção das curvas analíticas em extrato da matriz, transferiu-se 500 μL de cada uma das sete soluções analíticas de trabalho preparadas em solvente orgânico (contendo padrão interno), para *vials* separados e a cada um deles foi adicionado

ⁱⁱⁱ Padrão interno é uma substância química adicionada a uma porção da amostra ou ao extrato da amostra em uma quantidade conhecida, em uma etapa específica da análise, a fim de avaliar a execução correta do procedimento analítico (ou parte dele). O padrão interno deve ser quimicamente estável e deve demonstrar o mesmo comportamento dos analitos.¹⁴⁸

500 µL do extrato branco das matrizes em estudo, para aplicação do método para análise de trigo e milho. Assim, tanto as curvas analíticas obtidas através das soluções preparadas em solvente orgânico quanto àquelas obtidas através das soluções preparadas em extrato branco de cada matriz, apresentaram as mesmas concentrações finais de cada micotoxina. Para os ensaios de fortificação, utilizou-se também a solução mistura preparada em acetonitrila, conforme concentrações mostradas na Tabela 8.

4.2.2 Avaliação de amostras “branco”

Na ausência de matriz branco (material de referência sem conter os analitos) das matrizes em estudo, amostras de farinha de trigo integral e de milho foram adquiridas no comércio local da cidade de Santa Maria e avaliadas para o uso como matriz “branco”.

As amostras foram armazenadas em geladeira com temperatura máxima controlada a 12 °C.

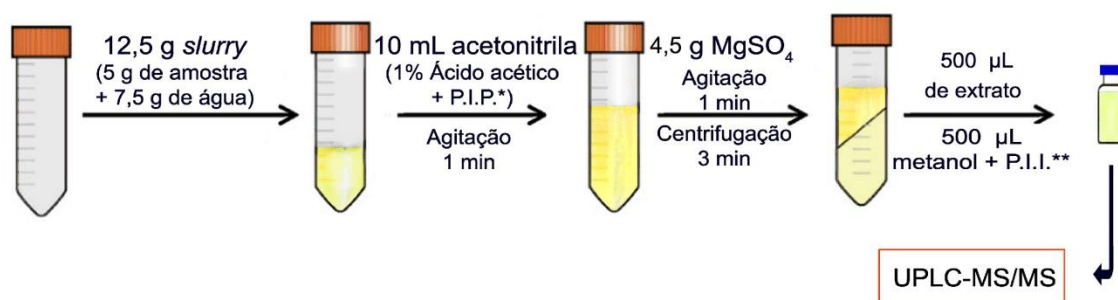
4.2.3 Método analítico multirresíduo para determinação de micotoxinas

O método analítico foi baseado no método preconizado por Pizzutti e colaboradores¹²³ para determinação simultânea de pesticidas e micotoxinas em arroz. Este método foi adaptado para determinação de 12 micotoxinas nas matrizes de trigo e milho, sendo que as condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas tendo como base os estudos de Spanjer e colaboradores,¹⁴¹ com algumas adaptações. O método com suas modificações, foi validado *in house* (intra-laboratorial), visto que a validação de métodos analíticos é um requisito fundamental para demonstração da competência técnica analítica de laboratórios.

4.2.3.1 Preparo da amostra e procedimento de extração

As amostras de trigo e milho foram trituradas por moagem via úmida. Os grãos foram homogeneizados juntamente com água, a fim de se obter uma suspensão homogênea (*slurry*). A proporção entre grãos e água para obtenção do *slurry* foi determinada a partir de experimentos, nos quais foram avaliadas as proporções 1:1, 1:1,5 e 1:2, para grãos e água, respectivamente. Este estudo foi realizado tanto para milho quanto para trigo.

O procedimento de extração foi realizado conforme descrito por Pizzutti e colaboradores¹²³ com adaptações. Consistiu na pesagem de 12,5 g de *slurry* seguida da adição de 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético e o padrão interno do procedimento (P.I.P) (quinalfós, na concentração de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$), em cada tubo. Após fechá-los, efetuou-se agitação em mesa agitadora por cerca de um minuto. Em seguida, acrescentou-se 4,5 g de sulfato de magnésio anidro e repetiu-se a agitação novamente por um minuto. Posteriormente, efetuou-se uma etapa de centrifugação por três minutos a 3600 rpm (rotação por minuto). Finalmente, transferiu-se 0,5 mL deste extrato para *vial* e adicionou-se 0,5 mL de metanol contendo o padrão interno do instrumento (P.I.I.) (propoxur, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$), seguindo, diretamente para análise por UPLC-MS/MS. O esquema do procedimento de extração está representado na Figura 13.



*P.I.P. = Padrão Interno do Procedimento (Propoxur $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$)

**P.I.I. = Padrão Interno do Instrumento (Quinalfós $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$)

Figura 13. Representação do método de extração utilizado para determinação de micotoxinas em milho e trigo.

4.2.3.2 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com os estudos de Spanjer e colaboradores.¹⁴¹ As condições instrumentais empregadas para o sistema de UPLC-MS/MS foram as seguintes:

- Para o cromatógrafo à líquido:
 - Volume de injeção de 2 μL , no modo *partial loop with needle overfill*;
 - Temperatura do forno da coluna: 60 $^{\circ}\text{C}$;
 - Eluente A: Água (0,1% de ácido fórmico);
 - Eluente B: Acetonitrila (0,1% de ácido fórmico);
 - Gradiente da fase móvel: O programa foi iniciado em 90% eluente A e foi diretamente levado a 30% em 10 min, mantendo-se constante durante 0,1 min e diminuindo linearmente para 10% do eluente A. Esta condição foi mantida constante durante dois minutos. A coluna foi reequilibrada no último minuto para a composição inicial da fase móvel;
 - Vazão da fase móvel constante em 0,45 mL min^{-1} ;
 - Tempo total de corrida: 13 minutos.
- Para o espectrômetro de massas:
 - Ionização à pressão atmosférica por ESI no modo positivo;
 - Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar de 2,0 kV, temperatura 120 $^{\circ}\text{C}$;
 - Temperatura do gás de dessolvatação: 400 $^{\circ}\text{C}$;
 - Vazão do gás nitrogênio para dessolvatação: 100 L h^{-1} ;
 - Vazão do gás no cone da amostragem: 7,0 L h^{-1} ;
 - Vazão do gás de colisão (Argônio): 0,15 mL min^{-1} ;
 - A energia de colisão e a voltagem no cone de amostragem foram otimizadas somente para Fumonisina B₁, que após injeção não foi detectada de forma satisfatória. Foi realizada então, a infusão das soluções analíticas diretamente no MS, na vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Duas transições MRM (monitoramento de reações múltiplas) foram monitoradas para cada um dos analitos, sendo a primeira empregada

para a quantificação do analito e a segunda para a confirmação do mesmo. Estas informações se encontram na Tabela 10.

Tabela 10. Condições instrumentais para determinação de micotoxinas empregando UPLC-MS/MS, com ionização por ESI no modo positivo, em amostras de milho e trigo.

Micotoxina	t_R (min)	Íon precursor	Voltagem do cone (V)	Transições			
				Quantificação		Confirmação	
				Íon Produto	Energia de colisão (eV)	Íon Produto	Energia de colisão (eV)
Aflatoxina B ₁	7,2	313,1	50	285	23	241	37
Aflatoxina B ₂	6,94	315,1	50	287,1	26	259,1	30
Aflatoxina G ₁	6,90	329,1	40	243,1	25	214,3	25
Aflatoxina G ₂	6,62	331,1	50	245,1	30	243,1	25
Ocratoxina A	8,79	404,1	2	239,1	26	221,05	34
Fumonisina B ₁	7,38	722,4	58	352,4	37	334,4	42
Fumonisina B ₂	8,09	706,5	59	336,4	34	318,4	40
Desoxinivalenol	1,38	297,2	23	249,1	10	231,2	12
Diacetoxiscirpenol	7,3	367,3	14	307,3	10	289,3	12
Zearalenona	8,75	319,1	24	187,0	18	184,9	26
Toxina T-2	8,59	467,4	8	305,2	8	245,3	7
Toxina HT-2	7,77	425,3	23	263,2	10	105,1	37
Propoxur*	7,39	210,1	15	110,9	12	92,9	25
Quinalfós**	9,82	299,0	25	96,9	25	162,9	35

*Padrão interno do instrumento (P.I.I.), / **Padrão interno do procedimento (P.I.P.) – não são micotoxinas.

4.2.3.3 Validação

Se um método existente for modificado para atender a requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas.¹⁴²

Na prática, a adequação à finalidade de métodos analíticos aplicados na rotina é mais comumente avaliada através de estudos de validação.¹⁴³ A validação é uma avaliação que garante que as informações geradas por um método analítico sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra a que se refere.¹⁴⁴

Os parâmetros de validação avaliados neste trabalho foram: linearidade, efeito matriz, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão (ensaio de fortificação e recuperação).

O método multirresíduo para determinação de micotoxinas foi validado individualmente para cada matriz em estudo (milho e trigo).

4.2.3.3.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade de um método quantitativo pode ser definida pela sua capacidade em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado de concentração.¹⁴²

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções analíticas, preparadas tanto em solvente orgânico quanto no extrato da matriz (extrato “branco” de milho e extrato “branco” de trigo).

Primeiramente, injetou-se o extrato “branco” dos reagentes (procedimento de extração realizado sem a matriz e sem os analitos, para verificação da pureza dos reagentes) e extrato “branco” da matriz (extração da matriz sem a adição dos analitos, para confirmar se realmente a matriz não contém os analitos em estudo). Em seguida, procedeu-se a injeção das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz, conforme item 4.2.1. As soluções foram injetadas em ordem crescente de concentração, onde as soluções em solvente foram injetadas e na sequência, as soluções em extrato de matriz de mesma concentração, evitando assim o fenômeno de *carry over*^{iv,145} da coluna cromatográfica. Esta sequência de injeção foi repetida por sete vezes.

A partir dos dados obtidos, realizaram-se os cálculos da média das áreas dos analitos e do valor de RSD%. Para obtenção das curvas analíticas ($y = ax + b$), a concentração de cada micotoxina estudada foi plotada no eixo das abscissas e a respectiva área obtida foi plotada no eixo das ordenadas. Para aquelas micotoxinas em que a matriz “branco” continha o analito, a média das áreas do analito no extrato “branco” foi descontada do valor de área do determinado analito, em cada uma das

^{iv} Carry over pode ser definido como um aumento na área do pico cromatográfico do analito, proveniente de resquícios do mesmo de análise anterior, possivelmente existentes no interior do injetor, coluna e/ou detector.¹⁴⁵

soluções da curva analítica. A partir da plotagem desses dados, obteve-se o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) das curvas analíticas, bem como a equação da reta para cada micotoxina.

4.2.3.3.2 Avaliação do efeito matriz

Efeito matriz é o estudo de seletividade que objetiva assegurar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõe a matriz amostral, gerando basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental.¹⁴⁶

O efeito matriz representa uma das maiores fontes de erro nas determinações analíticas em nível de traços, especialmente de micotoxinas.¹⁴⁷ Para realizar a avaliação da magnitude da interferência deste efeito nos resultados deste estudo, aplicou-se dois métodos.

O primeiro deles, baseia-se na comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato de cada matriz estudada (milho e trigo). O cálculo foi efetuado através da Equação 4.

$$\text{Efeito Matriz}(\%) = \frac{A1 - A2}{A2} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

A1 = média das áreas da solução em extrato da matriz, em uma determinada concentração;

A2 = média das áreas da solução em solvente orgânico, em uma determinada concentração.

A outra forma de avaliação do efeito matriz, foi realizada com base na comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico com aquelas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em extrato da matriz.

O cálculo para a avaliação do efeito matriz a partir das inclinações das curvas analíticas, foi realizado de acordo com a Equação 5.

$$\text{Efeito Matriz}(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s} \right) \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

S_m = inclinação da curva analítica preparada em extrato “branco” da matriz;

S_s = inclinação da curva analítica preparada em solvente orgânico.

Através dessas equações, é possível determinar se a matriz exerce efeito positivo (acréscimo na intensidade do sinal) ou negativo (supressão do sinal) sobre o resultado da análise. Conforme o SANCO,¹⁴⁸ resultados com efeito matriz entre +20% e -20% são considerados aceitáveis para análises de contaminantes em alimentos em nível de traços.

4.2.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Nas determinações de analitos presentes nas amostras em concentrações muito baixas (traço), a determinação da menor concentração em que o analito pode ser detectado com confiabilidade é muito importante para evitar resultados errôneos¹¹⁴.

O limite de detecção (LOD, do idioma inglês *Limit of Detection*) de um método é definido como a concentração mínima do analito medida e declarada com 95 ou 99% de confiança, em que a concentração do analito é maior do que zero.¹⁴⁹

Com base nos dados obtidos no estudo de linearidade das curvas analíticas de cada uma das 12 micotoxinas estudadas, foi determinado a estimativa do limite de detecção do instrumento (LOD_i) e do método (LOD_m), bem como do limite de quantificação do instrumento (LOQ_i) e do método (LOQ_m).

A partir das áreas e do valor de RSD% (7 réplicas) de cada micotoxina presente nas sete soluções analíticas estudadas, aplicou-se a Equação 6 e obteve-se a estimativa do LOD_i (µg L⁻¹)

$$LOD_i = 3 \times RSD \times C \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

RSD: desvio padrão relativo das áreas obtidas

C: concentração da solução analítica

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator obtido para o método de extração – fator 4 (Apêndice 3), obtém-se a estimativa do LOD_m (µg kg⁻¹).

A partir do LOD_i, aplicando-se a Equação 7, obtém-se o LOQ_i.

$$LOQ_i = LOD_i \times 3,33 \quad \text{Equação 7}$$

Através da multiplicação do LOQ_i pelo fator do método, é possível obter o LOQ_m estimado calculado. No entanto, considera-se como valor real do LOQ_m (µg kg⁻¹) a menor concentração que ao ser fortificada na matriz, apresenta recuperações entre 70 e 120%, com valores de RSD% menor ou igual a 20%.¹⁴⁹

4.2.3.3.4 Procedimento de fortificação e recuperação

Para execução dos estudos de fortificação e recuperação, realizou-se a fortificação em 3 níveis de concentração com sete repetições para cada nível. Também foi realizada a extração das amostras “branco” das matrizes em estudo, para verificação da real ausência das micotoxinas em estudo, em cada matriz.

Em tubos de teflon[®] com tampa rosqueável e capacidade de 50 mL foram pesados 12,5 ± 0,05 g de *slurry* da matriz. Logo após, efetuou-se a fortificação com a solução mistura das micotoxinas estudadas, nas concentrações descritas na Tabela 11. Adicionou-se 10, 25 e 100 µL da solução mistura à amostra. O procedimento de extração foi realizado conforme descrito no item 4.2.3.1.

Tabela 11. Níveis de fortificação aplicados para o estudo de recuperação.

Micotoxina	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	1	2	3
Aflatoxina B ₁			
Aflatoxina B ₂			
Aflatoxina G ₁	1,0	2,5	10,0
Aflatoxina G ₂			
Ocratoxina A			
Fumonisina B ₁			
Fumonisina B ₂			
Desoxinivalenol			
Diacetoxiscirpenol	50,0	125,0	500,0
Zearalenona			
Toxina T-2			
Toxina HT-2			

4.2.4 Amostragem para aplicação do método em amostras reais

Este estudo também objetivou determinar micotoxinas em produtos a base de milho e trigo provenientes de diversos pontos da cadeia produtiva e comercial, começando no setor primário com ensaios realizados a campo, passando pelo processamento, até a análise de produtos disponibilizados na prateleira para o consumidor.

Todas as amostras foram coletadas conforme Regulamento da Comissão Europeia nº 401/2006,¹⁵⁰ que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial das concentrações de micotoxinas nos produtos alimentícios.

4.2.4.1 Ensaios a campo

Em cooperação com cooperativa gaúcha, três distintos ensaios a campo foram realizados. Toda parte experimental a campo foi organizada e executada pelo departamento técnico da instituição.

Cada experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso. As unidades experimentais (parcelas) foram constituídas de, no mínimo, 12 m². Para cada parcela dos ensaios com genótipos de trigo com diferentes reações de

resistência a giberela e com diferentes fungicidas, foi determinado a severidade (S) e a incidência (I) da doença, e calculou-se o índice de giberela (IG). Após a colheita do grão, este foi pesado para verificação do rendimento e enviado ao CEPARC para determinação de micotoxinas.

4.2.4.1.1 Ensaio com genótipos de trigo em distintas localidades

O ensaio foi conduzido na safra de inverno de 2013 em três localidades no estado do Rio Grande do Sul, sendo elas: Cruz Alta, São Luiz Gonzaga e Santa Rosa (Figura 14). Foi avaliado 13 linhagens de trigo e uma cultivar utilizada como testemunha. Foi utilizado como testemunha a cultivar Quartzo (OR-Biotrigo). Esta cultivar é caracterizada como moderadamente suscetível à giberela. As linhagens de trigo selecionadas fazem parte de um programa de melhoramento genético de trigo. As 13 linhagens juntamente com a testemunha foram avaliadas em triplicata, totalizando 126 amostras em estudo.

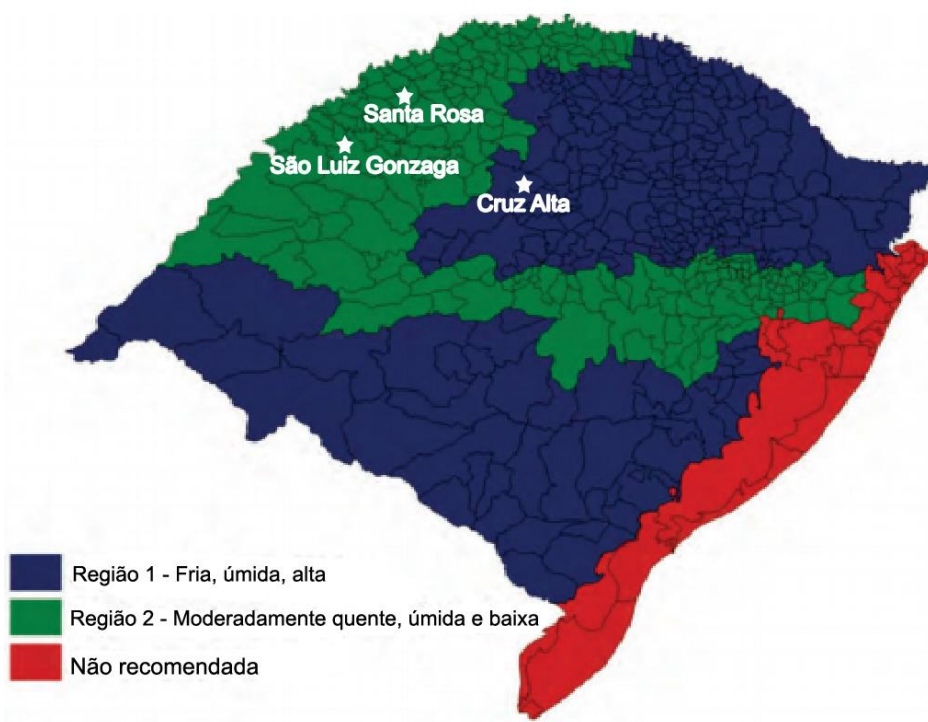


Figura 14. Regiões homogêneas de adaptação de cultivares de trigo no Rio Grande do Sul, com destaque para as três localidades em estudo.

4.2.4.1.2 Ensaio com genótipos de trigo com diferentes reações de resistência à giberela

Foi avaliado a resposta de diferentes genótipos de trigo, com e sem tratamento fúngico. Para isto, selecionou-se 5 cultivares de trigo, as quais apresentam diferentes reações de resistência à giberela, sendo elas:

- Cultivar 1: Moderadamente suscetível
- Cultivar 2: Moderadamente suscetível
- Cultivar 3: Moderadamente resistente
- Cultivar 4: Moderadamente suscetível
- Cultivar 5: Moderadamente resistente

O experimento foi conduzido na safra de inverno 2013, na cidade de Cruz Alta. Foram testadas uma (25-50% floração) e duas aplicações (25-50% floração + 10 dias após a primeira aplicação) de Opera Ultra (0,75 L/ha) + Assist (0,5 L/ha) no florescimento, em comparação com testemunha não tratada. O delineamento foi de blocos ao acaso, com cinco repetições, totalizando 75 amostras em estudo. No estágio vegetativo, foram feitas três aplicações de Fox (0,4 L/ha) + Áureo (0,25 L/ha) em todos os tratamentos, incluindo a testemunha, a fim de que apenas o manejo para giberela variasse entre os mesmos.

4.2.4.1.3 Ensaio com diferentes fungicidas

O objetivo deste ensaio foi avaliar a eficiência de diferentes fungicidas na redução das concentrações de micotoxinas. Foi selecionado uma cultivar suscetível à giberela, e esta foi avaliada sem tratamento fúngico e em 11 tratamentos com princípios ativos e mistura destes para o controle de giberela, contando com produtos registrados e não registrados (Tabela 12). Foram realizadas cinco repetições do ensaio totalizando 60 amostras. O experimento foi conduzido no município de Cruz Alta.

Tabela 12. Tratamentos fungicidas aplicados na cultivar de trigo selecionada para o controle de giberela.

Trat.	Fungicidas (Grupo Químico)	Dose (L ha ⁻¹)
1	-----	Sem tratamento
2	Triazol (A) + Estrobilurina (B)	0,75 ^a
3	Estrobilurina (B) + Triazol (C)	0,50 ^a
4	Estrobilurina (D) + Triazol (E)	0,60 ^b
5	Triazol (F)	0,75
6	Benzimidazol (G)	0,80
7	Estrobilurina (D) + Triazol (E)	0,75 ^c
8	Benzimidazol (G)	1,00
9	Estrobilurina (D) + Triazol (E) + Benzimidazol (G)	0,75 ^c
10	Estrobilurina (H) + Carboxamida (I)	0,30 ^d
11	Estrobilurina (H) + Carboxamida (I)	0,35 ^d
12	Estrobilurina (H) + Triazol (J)	0,75 ^d

^aAdição de adjuvante (0,25% v/v) / ^bMistura pronta com RET + 0,7 L ha⁻¹ óleo NTX / ^cÓleo mineral (0,5% v/v) + RET II / ^dAssist (0,5 L ha⁻¹)

4.2.4.2 Amostras de trigo importadas e para exportação

Em março de 2013, foram coletadas 30 amostras de grãos de trigo enviadas por cooperativas gaúchas e empresas de armazenamento de grãos para exportação, através do Porto de Rio Grande – RS. Foram coletadas também cinco amostras de grãos de trigo importadas da Argentina no mês de março de 2013, através do mesmo porto. A amostragem foi realizada por empresa terceirizada sob responsabilidade do Porto, e enviadas ao CEPARC para análise.

4.2.4.3 Amostras de trigo e seus subprodutos do processo de moagem

Em colaboração com um moinho de beneficiamento de farinha de trigo, efetuou-se coletas quinzenais, no período de abril de 2013 a janeiro de 2014, de amostras de grãos de trigo para processamento antes da limpeza prévia dos grãos, após a etapa de limpeza, da farinha e do farelo obtidos através da moagem destes grãos, totalizando 80 amostras. Foram coletados aproximadamente 2 kg de cada amostra, sendo que a amostragem foi realizada pelo próprio moinho e enviada ao

CEPARC para posterior análise. O lote representado era composto por menos de uma tonelada.

4.2.4.4 Amostras de farinha de trigo coletadas em supermercados

Amostras de farinha de trigo foram coletadas nos meses de abril, junho, agosto, outubro e dezembro de 2013 nas cidades de Cruz Alta e Santa Maria no Rio Grande do Sul. Neste período foram coletadas 10 amostras de farinha de trigo em cada mês, em ambas as cidades, totalizando 100 amostras.

O peso global de cada amostra, de acordo com a CE¹⁵⁰, deve ser pelo menos um quilograma (1 kg), composta de pelo menos três amostras elementares para compor a representatividade da prateleira (lote $\leq 0,05$ toneladas). Desta forma, foram coletadas três embalagens de cada farinha a fim de compor uma amostra global. As amostras foram coletadas aleatoriamente na prateleira, representando as mercadorias que estavam à disposição do consumidor no dia da coleta. Não foi monitorada nenhuma marca comercial específica.

4.2.4.5 Amostras de milho para exportação

Em março de 2013, foram coletadas 30 amostras de grãos de milho, enviadas por cooperativas gaúchas e empresas de armazenamento de grãos para exportação, através do Porto de Rio Grande – RS. A amostragem foi realizada por empresa terceirizada sob responsabilidade do Porto, e enviadas ao CEPARC.

4.2.4.6 Amostras de farinha de milho coletadas em supermercados

Amostras de farinha de milho foram coletadas nos meses de abril, junho, agosto, outubro e dezembro de 2013 nas cidades de Cruz Alta e Santa Maria no Rio Grande do Sul. Neste período foram coletadas 10 amostras de farinha de milho em cada mês, em ambas as cidades, totalizando 100 amostras.

O método de amostragem foi o mesmo utilizado na coleta das amostras de farinha de trigo descrito no item 4.2.4.4.

4.2.4.7 Amostras destinadas à alimentação animal

Foram realizadas coletas de amostras de grãos e quirera de milho destinadas a fabricação de ração animal, no período de abril de 2013 a janeiro de 2014. A frequência de coleta foi quinzenal, sendo que as amostras eram a matéria prima recebida pela fábrica. Foram coletadas 40 amostras ao longo do período mencionado. Cada amostra foi composta de 2 kg, representando lotes de $> 1 \leq 3$ toneladas.

4.2.5 Análises estatísticas

Os resultados quanto as concentrações de micotoxinas determinadas em linhagens de trigo em diferentes localidades, genótipos de trigo com diferentes reações de resistência a giberela, grãos de trigo tratados com diferentes fungicidas, farinhas de trigo e milho coletadas em supermercados foram submetidos à análise de variância conjunta. As médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% probabilidade de erro ($p=0,05$). Esse teste visa à separação de médias de tratamentos em grupos distintos, através da minimização da variação dentro e maximização da variação entre grupos. Os resultados são facilmente interpretados, devido à ausência de ambiguidade, resultando em maior objetividade e clareza,¹⁵¹ principalmente quando se realiza a comparação de vários tratamentos.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os primeiros resultados discutidos foram referentes à validação do método e posteriormente, discutido a aplicação deste nas amostras oriundas dos distintos pontos da cadeia produtiva e comercial. Foram avaliadas 476 amostras de produtos de trigo e 170 amostras de produtos de milho.

5.1 MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico foi validado para duas matrizes: milho e trigo. A primeira etapa realizada foi a homogeneização das amostras (grãos, quirera e farinhas). O procedimento adotado para foi o de moagem por via úmida, devido aos melhores resultados evidenciados em estudos anteriores. Pesquisa realizada por Lippolis e colaboradores,¹⁵² demonstrou que o preparo da amostra através da obtenção do *slurry* é estritamente necessário para se obter amostras de laboratório representativas e homogêneas para determinação das micotoxinas, bem como para minimizar erros de classificação dos lotes aceitável/rejeitável. O grupo de pesquisa de Spanjer¹⁵³ concluiu que os melhores resultados foram obtidos a partir da obtenção do *slurry*, por produzir partículas de menores dimensões e, conseqüentemente, amostras mais homogêneas e com menor coeficiente de variação.

A proporção mais adequada para o preparo do *slurry* foi de uma parte de grãos para 1,5 de água. Pizzutti e colaboradores¹²³ utilizaram a proporção de 1:1 (grãos/ água) para a matriz arroz. Porém, para trigo e milho, com esta proporção não foi possível triturar e homogeneizar adequadamente as amostras. A proporção de 1:2 (grãos/ água) também não foi adequada devido ao aspecto demasiadamente líquido do *slurry*.

Foi utilizado QuEChERS modificado para a etapa de extração. Inicialmente desenvolvido para a análise de resíduos de pesticidas, tem sido usado para determinação de outros tipos de resíduos e contaminantes, tais como drogas veterinárias e micotoxinas.

De acordo com Maštovská et al.¹⁵⁴ a utilização da acetonitrila acidificada promove recuperações satisfatórias dos analitos, principalmente aqueles que apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é que a acetonitrila é um solvente mais adequado para ser utilizado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do que solventes como acetona e acetato de etila.

Ao solvente de extração, foi adicionado um dos padrões internos, neste caso o Quinalfós, que foi utilizado com padrão interno do procedimento (Figura 15). O segundo padrão interno, Propoxur, foi utilizado para avaliar o instrumento (Figura 16), o qual foi adicionado no solvente para diluição do extrato antes da injeção.

Similarmente ao trabalho desenvolvido por Righi,¹⁴⁷ neste trabalho, os dois padrões internos empregados eram pesticidas.

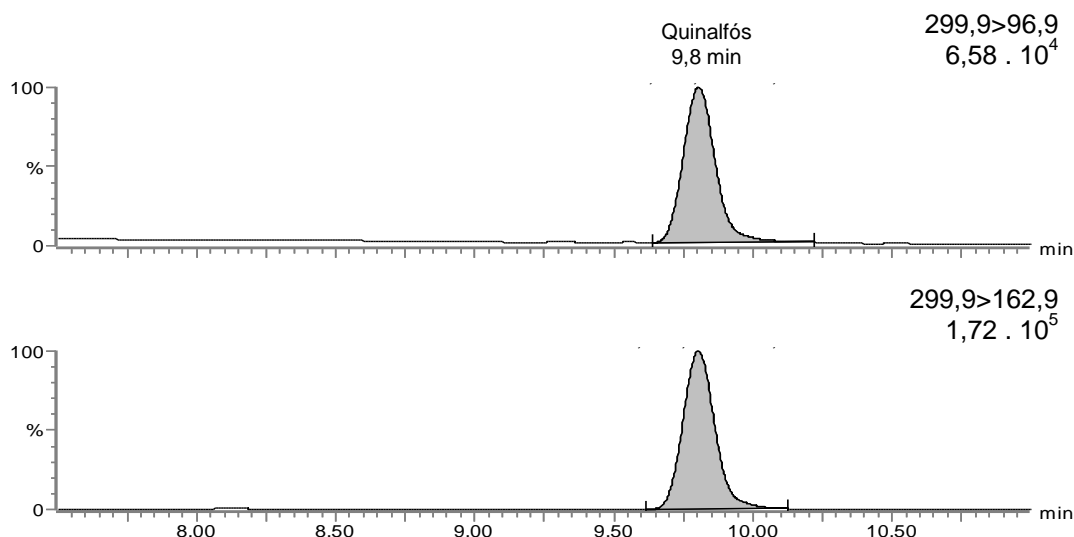


Figura 15. Cromatograma do padrão interno do procedimento Quinalfós, na concentração de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

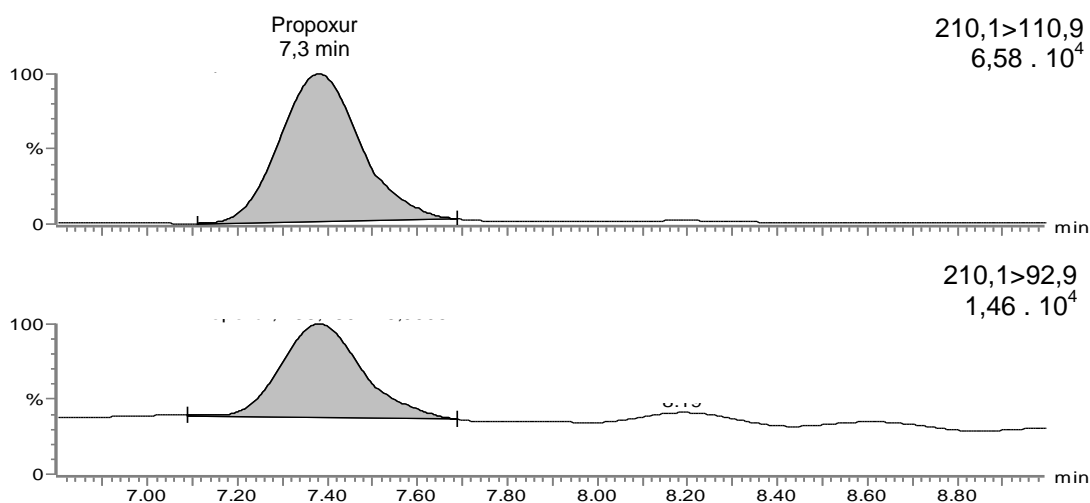


Figura 16. Cromatograma do padrão interno do instrumento Propoxur, na concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Primeiramente, optou-se por estas substâncias pela disponibilidade dos mesmos nos laboratórios do CEPARC. Justifica-se também devido ao objetivo do estudo que serviu de base para este trabalho, que foi o desenvolvimento de método simultâneo para determinação de micotoxinas e pesticidas. Em LC-MS/MS, padrões internos são frequentemente usados para compensar os efeitos da matriz e as perdas durante a etapa de extração e de purificação. Convém destacar que os

padrões internos não foram utilizados para a quantificação dos analitos, mas apenas como padrões de controle.

Na análise multimicotoxina, o uso do P.I. é bastante limitado. Padrões isotopicamente marcados tais como FB₁ deuterado (FB₁-d₆)¹⁵⁵ e T-2 deuterado têm sido relatados.¹⁵⁶ Porém, a utilização de padrões isotopicamente marcados possui custo elevado. Em alguns casos, a utilização de um determinado P.I. tem sido limitada aos analitos estruturalmente próximos, por exemplo, nafcilina (produto de hidrólise de tricotecenos macrocíclicas)¹⁵⁷ zearalanona (ZAN, um derivado da ZEN),^{134,158} verrucarol (produto de hidrólise de tricotecenos macrocíclicas), de-epóxi-DON (um metabólito da DON) e diclofenaco (droga anti-inflamatória).

Anastassiades e colaboradores⁷⁵ estudaram extensivamente os efeitos de diferentes sais e suas combinações. O MgSO₄ anidro demonstrou ser o sal mais indicado devido sua maior capacidade de remoção da água. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação produz uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares.

A adição de sais, como o MgSO₄, promove o efeito *salting out* que é a partição dos analitos entre as duas fases líquidas presentes. Este efeito resulta em melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa. Este procedimento têm sido amplamente utilizado em métodos multirresíduos.¹⁵⁹

Não foi realizada nenhuma etapa de purificação a fim de evitar a perda de analitos durante a análise. O procedimento de extração QuEChERS sem esta etapa tem sido testado para análise multimicotoxinas por outros grupos de pesquisas.¹⁶⁰⁻¹⁶² O passo extração em fase sólida (SPE) tem sido evitado em métodos de multimicotoxinas porque o sorvente etilenodiamino-N-propil, uma amina primária e secundária (PSA) remove eficazmente os compostos polares, criando assim um risco de perda de alguns dos analitos de interesse.⁷⁵ Em particular, as fumonisinas podem se ligar ao PSA, o que dificulta sua extração.^{160,161,163,164}

Porém, tem sido relatado efeito matriz em MS mais acentuado. Para minimizar este efeito, efetua-se uma etapa de diluição de uma parte do extrato a uma parte de metanol. Plattner e Maragos¹⁶⁵ afirmaram que a utilização da MS

representa uma alternativa para a detecção simultânea de micotoxinas sem a necessidade de uma etapa de purificação.

A separação das micotoxinas investigadas foi realizada por cromatografia líquida de fase reversa, sendo que a coluna utilizada foi C18. A cromatografia líquida em fase reversa é considerada uma escolha adequada para a separação de misturas de compostos neutros e iônicos de baixo peso molecular.¹⁶⁶ Ela tem sido utilizada com êxito na maior parte dos métodos desenvolvidos para determinação de várias micotoxinas em matrizes para alimentação humana e animal.^{122,141,167-169}

Fases móveis compatíveis com o MS foram escolhidas. Foram utilizadas misturas aquosas de acetonitrila acidificada. Solventes semelhantes têm sido utilizados para a separação de micotoxinas em outros trabalhos.^{141,160} Outras misturas de metanol também têm sido descritas na literatura.^{167,170,171}

O gradiente de eluição foi necessário para conseguir a eluição dos compostos mais fortemente retidos em um tempo de corrida razoável, mas ainda obter picos com boas formas. Um gradiente de eluição geralmente é um pré-requisito quando analitos com uma grande variedade de polaridade são separados.¹⁶⁶ Tem sido aplicada em diversos métodos multimicotoxinas.^{141,167}

Em métodos multirresíduos, pelo menos, algum grau de co-eluição é geralmente inevitável.¹⁷² No entanto, no método desenvolvido, a resolução incompleta não foi um problema uma vez que diferentes íons precursores foram utilizados para a detecção dos analitos com picos sobrepostos. Por exemplo, AFLA G₁ e AFLA B₂ possuem praticamente o mesmo tempo de retenção, mas podem ser identificadas e quantificadas devido a suas diferentes razões massa/carga (m/z) (Figura 17).

A ionização empregada foi por *electrospray* no modo positivo. As diferenças na sensibilidade entre eletronebulização nos modos positivo ou negativo não foram sistematicamente investigadas neste estudo. Na literatura vários estudos podem ser encontrados sobre este tema. Razzazi-Fazeli e colaboradores^{156,173} relatam que o modo positivo deve ser preferido para os tricotecenos tipo A (por exemplo, DAS, Toxina T-2 e Toxina HT-2) e o modo negativo para tricotecenos Tipo B (por exemplo, nivalenol e DON). Laganà *et. al.*,¹⁷⁴ Biselli *et al.*,¹⁷⁵ Sulyok *et al.*¹⁶⁷ e Ren *et al.*¹³⁴ também trabalharam tanto no modo positivo quanto negativo e reportaram resultados similares. Spanjer e colaboradores¹⁴¹ ressaltam que a injeção do extrato

da amostra em ambos os modos (duas injeções) dobra o tempo de análise e pode acarretar em possíveis erros para uma dada amostra.

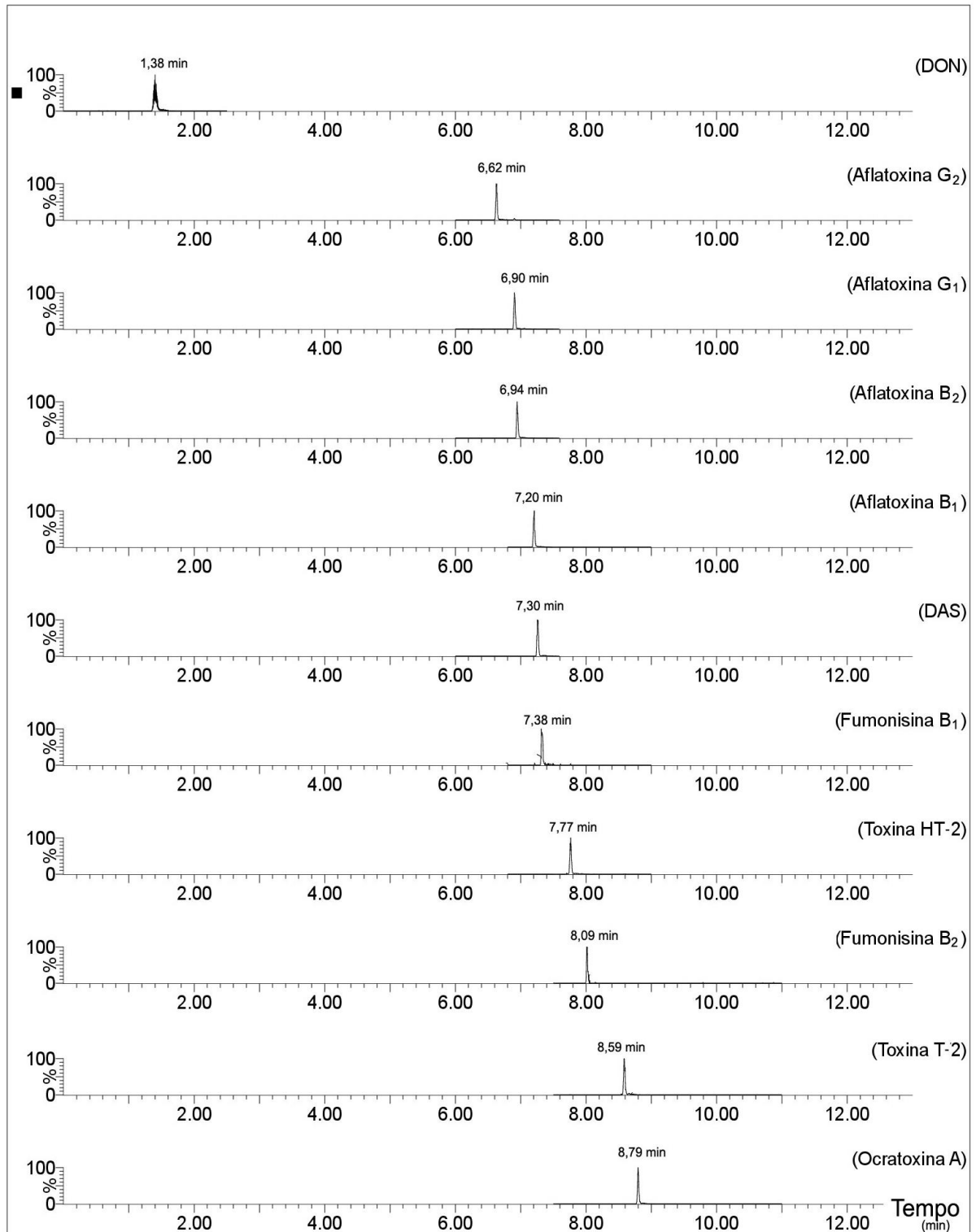


Figura 17. Cromatograma das micotoxinas em estudo com o tempo de retenção de cada um dos analitos.

5.1.1 Validação de método analítico multirresíduo para determinação de micotoxinas em trigo

5.1.1.1 Avaliação da amostra “branco”

Na ausência de material de referência “branco” da matriz de trigo, amostras de farinha de trigo integral (grão de trigo moído) foram avaliadas pelo procedimento de extração representado na Figura 13 e descrito no item 5.1.

Porém, todas as amostras de trigo avaliadas para seleção da amostra “branco”, apresentaram contaminação pela micotoxina DON (Figura 18). Desta forma, selecionou-se a amostra que apresentou os menores níveis de contaminação, sendo que o valor da concentração da micotoxina DON foi descontado. Hajslova *et. al.*¹²⁶ afirmam que o uso da matriz absolutamente branco é o ideal, porém, os mesmos autores ressaltam que na prática, a obtenção é dificilmente alcançada, sendo que matrizes à base de trigo contêm pelo menos vestígios de DON.

A ausência de branco se deve ao fato das micotoxinas serem contaminantes naturais. Desta forma, não há como prever a ausência/presença destes contaminantes nas matrizes, diferentemente de pesticidas, que são aplicados na cultura.

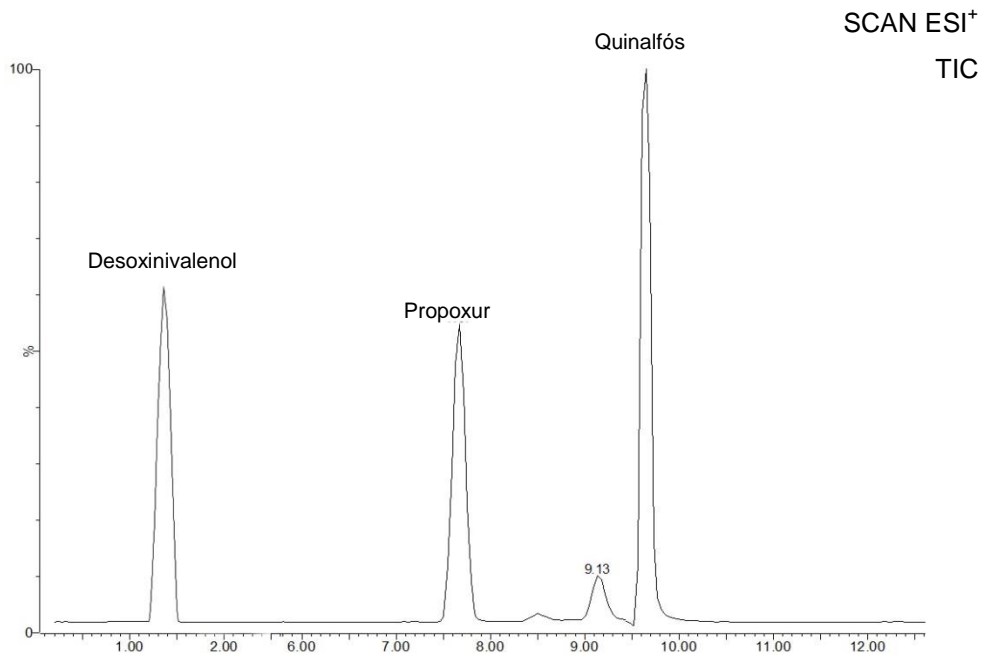


Figura 18. Cromatograma do extrato “branco” da matriz de trigo.

5.1.1.2 Curva analítica e linearidade

O valor do coeficiente de determinação expressa numericamente o percentual da variação total do sinal analítico (y) em função da variação da concentração do analito (x). Esse percentual, como qualquer outro, varia de 0 a 100% e o valor de r^2 , sendo a expressão numérica do mesmo, varia de 0 a 1. Quanto mais próximos de um os valores de r^2 , melhor será a qualidade das curvas analíticas.¹⁴⁷

Conforme pode ser observado na Tabela 13, as curvas analíticas obtidas, tanto a partir de soluções analíticas preparadas em metanol, como a partir de soluções analíticas preparadas no extrato de trigo, apresentaram comportamento muito similar. Em ambos os casos, as 12 micotoxinas apresentaram coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,98 e destas, 10 apresentaram coeficiente de determinação maior que 0,99.

Tabela 13. Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho, obtidos pela análise cromatográfica das soluções analíticas preparadas em solvente e no extrato de trigo para cada uma das micotoxinas.

Micotoxina	Soluções preparadas em solvente				Soluções preparadas em extrato de matriz			
	a	b	r^2	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	a	b	r^2	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)
Aflatoxina B ₁	1002,2	-305,23	0,9963	0,1 - 50	1034,3	-103,81	0,9963	0,1 - 50
Aflatoxina B ₂	1002,2	-305,23	0,9963	0,1 - 50	1034,3	-103,81	0,9963	0,1 - 50
Aflatoxina G ₁	1191,9	-491,17	0,9984	0,1 - 50	1300	-188,82	0,9941	0,1 - 50
Aflatoxina G ₂	512,75	-194,6	0,9991	0,1 - 50	572,08	-132,26	0,9975	0,1 - 50
Ocratoxina A	1914,3	-630,34	0,9975	0,1 - 50	1745,5	-649,54	0,9984	0,1 - 50
Fumonisina B ₁	763,83	-37086	0,9958	5 - 2500	772,01	-20545	0,9971	5 - 2500
Fumonisina B ₂	1104,7	-53419	0,9959	5 - 2500	1125,3	-34121	0,9981	5 - 2500
Desoxinivalenol	25,169	-614,01	0,9992	5 - 2500	24,134	-458,45	0,9992	5 - 2500
Diacetoxiscirpenol	3429,4	-364,51	0,9985	5 - 2500	3403,2	-85,478	0,9991	5 - 2500
Zearalenona	71,139	-327,22	0,992	5 - 2500	54,553	-260,49	0,9941	5 - 2500
Toxina T-2	47103	-47,625	0,9939	5 - 2500	3,8242	-193,85	0,983	100 - 2500
Toxina HT-2	14,195	134,06	0,9889	5 - 2500	10,493	-63,641	0,9895	5 - 2500

O único caso que se distinguiu dos demais, foi o da micotoxina Toxina T-2, que não apresentou resposta cromatográfica (não detectado) nas três menores concentrações das curvas analíticas preparadas em extrato de trigo. Desta forma, a

faixa linear da mesma foi menor que para as demais micotoxinas do mesmo grupo, ficando no intervalo de 100 a 2500 ng mL⁻¹, enquanto as demais micotoxinas do mesmo grupo apresentaram faixa linear de 5 – 2500 ng mL⁻¹.

5.1.1.3 Efeito matriz

O efeito da resposta cromatográfica influenciada pela matriz ou “efeito matriz”, pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector para um determinado analito presente no extrato da amostra quando comparado ao mesmo analito em solvente orgânico.^{142,148}

O efeito causado pela matriz é dependente das propriedades físico-químicas dos analitos e das características dos componentes endógenos da matriz (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, pressão de vapor, entre outros)¹⁷⁶.

Na Tabela 14, encontram-se os percentuais de efeito matriz, observados para cada micotoxina em cada concentração das soluções da curva analítica.

Tabela 14. Percentual do efeito matriz observado na faixa de concentração estudada nas curvas analíticas para cada nível de concentração.

Micotoxinas	Efeito matriz calculado em cada nível de concentração (%)							Média
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6	Nível 7	
Aflatoxina B ₁	33	2	6	13	11	16	9	13
Aflatoxina B ₂	85	41	36	19	13	8	3	29
Aflatoxina G ₁	64	44	17	29	21	19	9	29
Aflatoxina G ₂	18	52	24	18	14	20	12	22
Ocratoxina A	-5	-6	-2	-13	-7	-13	-9	-8
Fumonisina B ₁	676	756	208	248	44	12	2	278
Fumonisina B ₂	194	514	193	218	40	8	2	167
Desoxinivalenol	20	-1	1	4	0	-1	-4	3
Diacetoxiscirpenol	-17	-33	-21	-11	-11	-6	-5	-15
Zearalenona	-8	-17	-19	-28	-19	-28	-24	-20
Toxina T-2	-100	-100	-100	-100	-51	-30	-20	-71
Toxina HT-2	69	1	-26	-30	-35	-37	-26	-12

Em LC-MS/MS estes efeitos são bem conhecidos. São causados por componentes da matriz da amostra que co-eluem com o analito e competem com o mesmo durante o processo de ionização.¹⁴⁹

Na maioria dos métodos multimicotoxinas que empregam ESI, efeitos de matriz significativos, principalmente encontrados como a supressão de sinal, têm sido observado.^{163,167,172,177} Por exemplo, para a micotoxina ZEN, evidenciou-se efeito matriz de supressão, ou seja, o sinal analítico de ZEN em matriz foi menor que o sinal analítico em solvente orgânico (Figura 19).

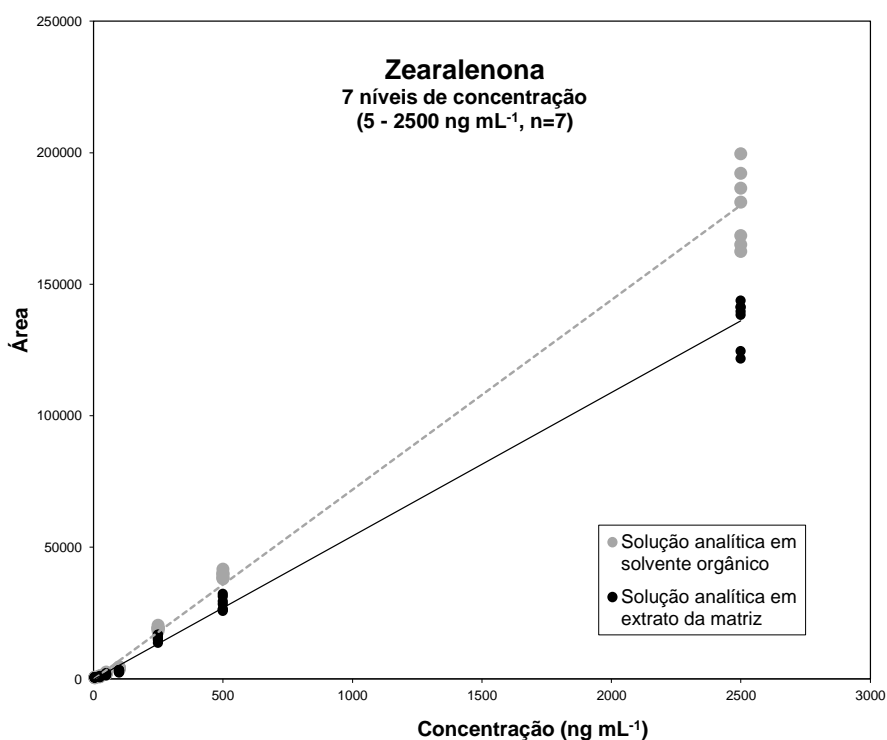


Figura 19. Curva analítica preparada a partir das soluções analíticas da micotoxina Zearalenona em solvente orgânico e em extrato de matriz em 7 concentrações (5 – 2500 ng mL⁻¹).

A Toxina T-2 não foi detectada nas quatro primeiras concentrações das soluções analíticas preparadas em extrato de trigo, sendo detectada somente a partir da concentração de 100 ng mL⁻¹ (5^a ponto da curva analítica). Já nas soluções analíticas preparadas em solvente, tal toxina apresentou sinal analítico em todas as concentrações estudadas (Figura 20). Mol *et. al.*¹⁶⁴ destaca que efeitos como este são indesejados, pois em métodos quantitativos, a supressão dificulta a quantificação exata do analito, enquanto para análises qualitativas, a supressão resulta em altos limites de detecção. No entanto, em trabalho realizado por Juan e colaboradores¹⁶² foi observado um aumento do sinal da Toxina T-2 e Toxina HT-2 quando na presença do extrato da matriz de grãos e farinhas de trigo.

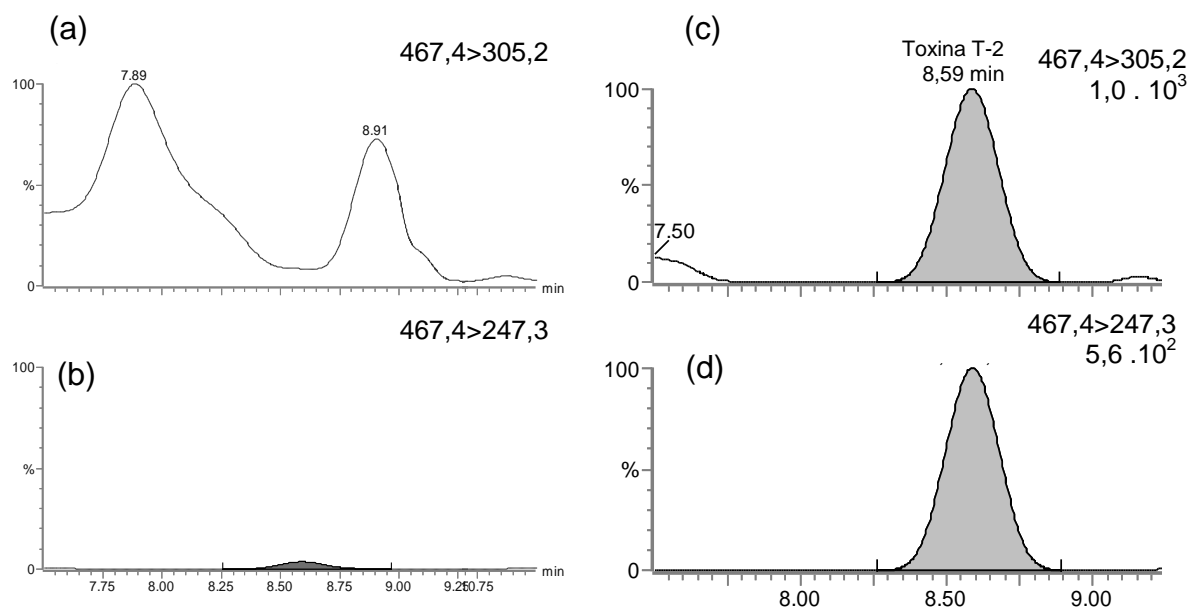


Figura 20. Cromatograma obtido para Toxina T-2 por UPLC-MS/MS, em solução analítica preparada na concentração de 50 ng mL^{-1} ; (a) transição de quantificação em extrato de trigo e (b) transição de confirmação em extrato de trigo; (c) transição de quantificação em solvente orgânico; (d) transição de confirmação em solvente orgânico.

A ausência da etapa de purificação pode possibilitar problemas analíticos, devido à co-eluição dos componentes da matriz, que podem afetar a eficiência de ionização dos analitos, levando a supressão ou incremento do sinal.¹⁷⁰

Já no caso da fumonisina B₁, foi observado aumento no sinal analítico na presença da matriz trigo, sendo que este foi maior quando em baixas concentrações do analito. O cromatograma da injeção de solução de 25 ng mL^{-1} de FB₁ em solvente (Figura 21,) e em extrato de matriz de trigo (Figura 22), evidencia as diferenças no sinal analítico ocasionadas pelo efeito da matriz trigo. Na medida em que a concentração do analito foi aumentada, o efeito matriz foi reduzido (Tabela 14). Este fato é explicado por Pizzutti,¹⁴⁹ que afirma que em baixas concentrações, o efeito matriz tende a ser significativamente maior, pois ocorre um decréscimo na razão de concentração do analito em relação à concentração da matriz.

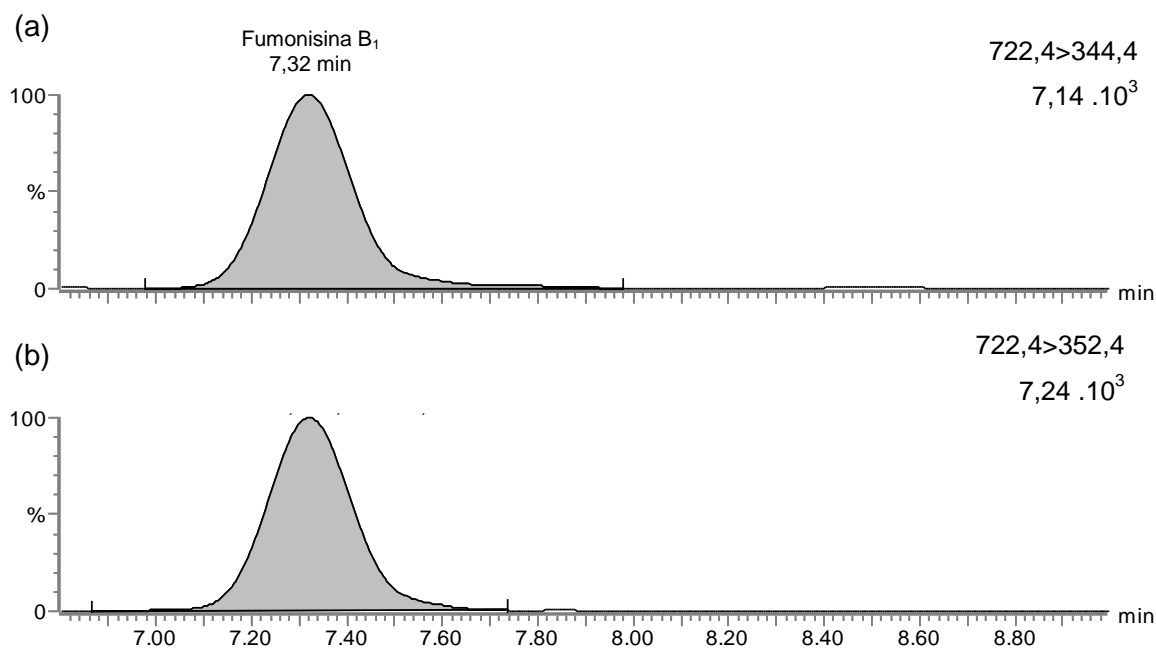


Figura 21. Cromatograma obtido para Fumonisin B₁ por UPLC-MS/MS, na concentração de 25 ng mL⁻¹, em solvente orgânico; (a) transição de quantificação e (b) transição de confirmação.

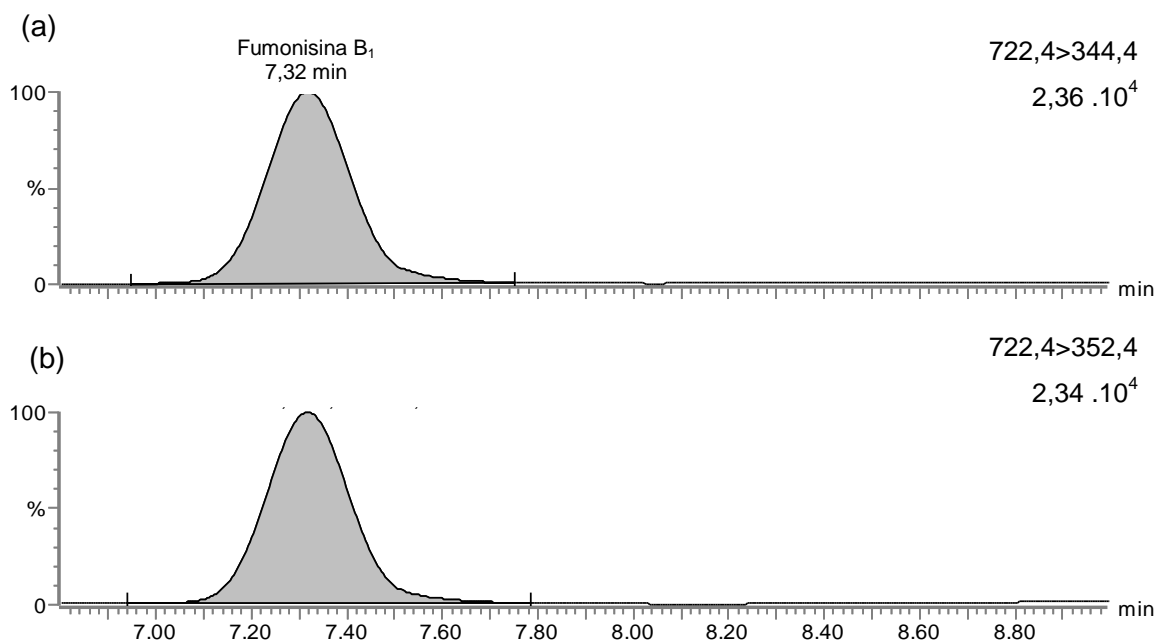


Figura 22. Cromatograma obtido para Fumonisin B₁ por UPLC-MS/MS, na concentração de 25 ng mL⁻¹, em extrato de trigo; (a) transição de quantificação e (b) de confirmação.

Por outro lado, a DON, micotoxina mais importante a ser determinada em trigo, não apresentou efeito matriz considerável (-4%). A curva analítica para DON confeccionada através de solução analítica preparada em solvente orgânico, possui praticamente a mesma inclinação, comparada com a curva analítica confeccionada através de solução analítica preparada em extrato de trigo (Figura 23). Resultados semelhantes foram encontrados por Spanjer e colaboradores¹⁴¹. Sulyok e colaboradores¹⁶⁷ também não evidenciaram efeito matriz para DON, assim como para AFLA B₁ e OTA.

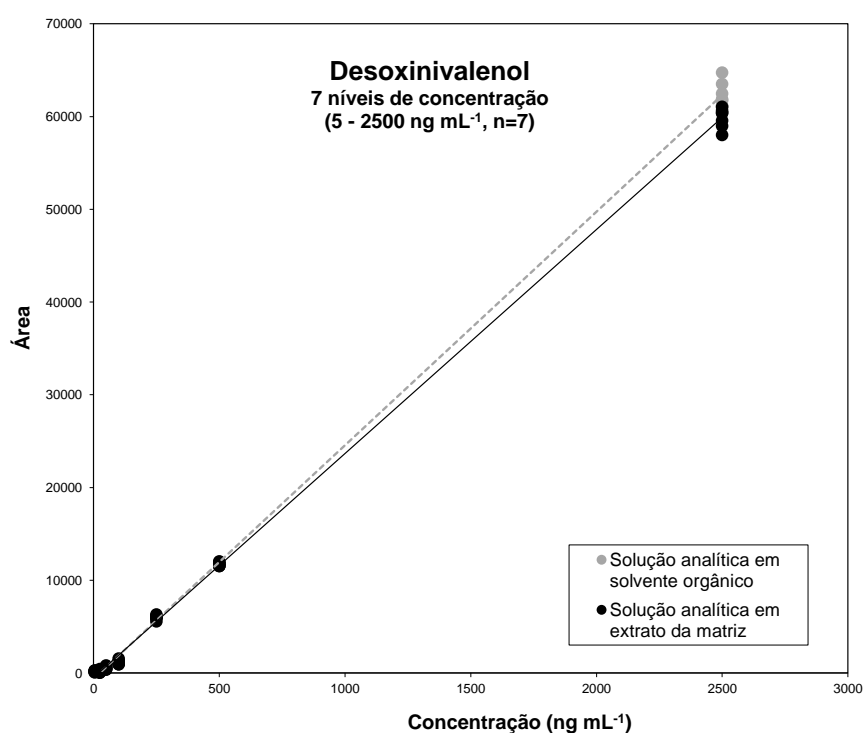


Figura 23. Curva analítica preparada a partir das soluções analíticas da micotoxina Desoxinivalenol, em solvente orgânico e em extrato de matriz (5 – 2500 ng mL⁻¹).

O efeito matriz não é considerável quando seus valores estiverem dentro da faixa de -20% a +20%.¹⁷⁸ Na Figura 24 estão expressos os valores de efeito matriz calculados a partir da inclinações das curvas analíticas, sendo expressos considerando as curvas analíticas completas, com as sete concentrações e também aquelas contendo apenas as concentrações de 5 a 100 ng mL⁻¹. Desta maneira é possível evidenciar que nas menores concentrações o efeito matriz é mais pronunciado para alguns compostos, como por exemplo Fumonisina B₁ e Fumonisina B₂, que apresentam efeito matriz positivo de 237% e 213%

respectivamente. Já as micotoxinas Toxina T-2 e Toxina HT-2 apresentam efeito matriz de supressão do sinal, apresentando valores de -100% e -39%, respectivamente. Já quando a comparação é feita utilizando todas as concentrações da curva analítica incluindo as concentrações mais altas, o efeito matriz não é pronunciado para as Fumonisinias. No entanto, para as micotoxinas Zearalenona e Toxina HT-2 o efeito matriz é considerável.

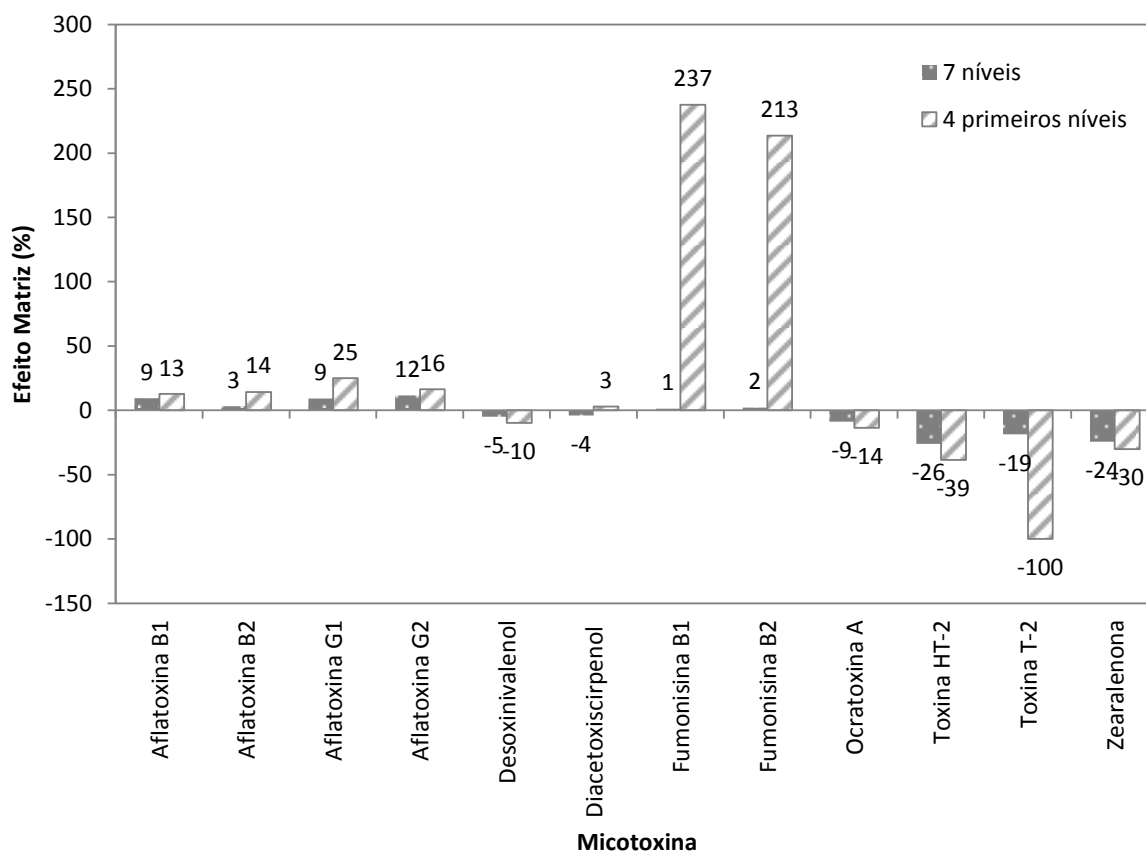


Figura 24. Percentual do efeito matriz calculado a partir das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato de trigo.

Para algumas micotoxinas, o efeito matriz foi pronunciado. A estratégia para minimizar a influência dos compostos da matriz trigo na determinação de micotoxinas foi a utilização das curvas analíticas em extrato de trigo (*matrix-matched calibration*). Desta forma, a mesma influência sofrida durante a determinação dos analitos na amostra, também é sofrida pelos analitos presentes nas soluções analíticas.

5.1.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação do método, considerado como o limite real, foi o menor nível de fortificação em que foi possível obter recuperações dentro da faixa aceitável de 70 a 120% e valores de RSD% $\leq 20\%$. Os limites de quantificação para todas as micotoxinas estudadas atendem tanto aos limites estabelecidos pela legislação brasileira, quanto àqueles estabelecidos pela União Europeia. Para as micotoxinas Toxina T-2, Toxina HT-2 e DAS não há legislação vigente no Brasil. Porém, foram incluídas devido a sua alta toxicidade quando comparada com DON, que também faz parte dos tricotecenos. Na Tabela 15 constam os valores estimados dos limites de detecção e de quantificação do instrumento calculado para cada micotoxina deste estudo, bem como o LOQ real do método. Para a toxina T-2, estes valores não puderam ser calculados devido a supressão de sinal de tal micotoxina em extrato de trigo, nas menores concentrações.

Tabela 15. Estimativa dos limites de detecção e de quantificação calculados e limite de quantificação real do método.

Micotoxinas	LOD estimado		LOQ estimado		LOQ _m Real
	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Experimental ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Aflatoxina B ₁	0,1	0,4	0,33	1,33	1
Aflatoxina B ₂	0,5	2	1,67	6,66	1
Aflatoxina G ₁	0,5	2	1,67	6,66	1
Aflatoxina G ₂	0,5	2	1,67	6,66	1
Ocratoxina A	0,1	0,4	0,33	1,33	1
Fumonisina B ₁	5	20	16,65	66,6	50
Fumonisina B ₂	5	20	16,65	66,6	50
Desoxinivalenol	25	100	83,25	333	50
Diacetoxiscirpenol	25	100	83,25	333	50
Zearalenona	5	20	16,65	66,6	50
Toxina T-2	-	-	-	-	500
Toxina HT-2	25	100	83,25	333	50

5.1.1.5 Ensaios de fortificação e recuperação

A determinação da exatidão de um método analítico, deve ser preferencialmente, feita por intermédio de ensaios de recuperação, utilizando-se material de referência certificado (MRC). Porém, na ausência destes, é possível determinar o percentual de recuperação dos analitos através dos ensaios de fortificação da matriz “branco”, que neste trabalho não era “branco” para a micotoxina DON, isto é, a matriz de trigo utilizada como “branco” continha DON.

As micotoxinas são determinadas em níveis de traços, portanto, quando o analito está em baixas concentrações, há uma faixa de aceitabilidade dos valores de recuperação. A faixa de aceitação recomendada é de 70 a 120%, com RSD inferior a 20%.¹⁴⁸ No entanto, de acordo com a União Européia (UE),¹⁵⁰ para determinadas micotoxinas, como por exemplo, para a FB₁ nos níveis de concentração $\leq 500 \mu\text{g kg}^{-1}$, são aceitos valores de recuperação na faixa de 60 a 120%, com RSD $\leq 30\%$. Na Tabela 16, constam valores de recuperação das três concentrações de fortificação para as micotoxinas em estudo, assim como os valores de RSD%.

Tabela 16. Média dos percentuais de recuperação e RSD% dos extratos das amostras de trigo fortificadas nos três níveis de concentração estudados.

Micotoxinas	Níveis de Fortificação					
	Nível 1		Nível 2		Nível 3	
	Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)
Aflatoxina B ₁	78,9	3,8	115,9	8,1	85,4	6,9
Aflatoxina B ₂	82,9	9,1	93,9	6,5	88,3	3,2
Aflatoxina G ₁	85,2	10,4	87,1	9,8	91,8	7,1
Aflatoxina G ₂	82,9	9,1	93,9	6,5	92,3	3,0
Ocratoxina A	83,5	10,9	89,4	9,6	81,4	5,3
Fumonisina B ₂	74,2	6,7	73,6	9,7	76,1	4,9
Fumonisina B ₁	77,0	2,5	79,9	3,2	80,4	2,2
Desoxinivalenol	92,6	11,2	96,0	13,3	93,3	6,5
Diacetoxiscirpenol	88,5	12,2	93,5	6,8	90,7	5,5
Zearalenona	74,8	5,8	82,2	7,9	87,4	5,3
Toxina T-2	-	-	-	-	74,3	1,8
Toxina HT-2	99,9	11,8	100,1	8,9	99,5	5,5

Para 11 das micotoxinas em estudo, os valores de recuperação foram satisfatórios nos três níveis de concentração fortificados, evidenciando desta forma a exatidão satisfatória do método analítico. Apenas a Toxina T-2 não foi recuperada nos dois menores níveis de concentrações. Porém, na maior concentração de fortificação, os valores de recuperação para esta micotoxina ficaram compreendidos dentro da faixa estabelecida.

Os valores de RSD%, para todas as micotoxinas estudadas, situaram-se dentro da faixa aceitável ($\leq 20\%$). Isso demonstra a satisfatória precisão do método analítico multirresíduo.

5.1.2 Validação de método analítico multirresíduo para determinação de micotoxinas em milho

5.1.2.1 Avaliação da amostra “branco”

Na ausência de material de referência “branco” da matriz de milho, uma amostra de farinha de milho integral (grão de milho moído) foi avaliada pelo procedimento de extração representado na Figura 13 e descrito no item 5.1.

Porém, todas as amostras de milho avaliadas para seleção da amostra “branco”, apresentaram contaminação pelas micotoxinas FB₁ e FB₂ (Figura 25). Desta forma, selecionaram-se as amostras que apresentaram as menores concentrações destas micotoxinas, que posteriormente foram descontadas das concentrações das amostras analisadas.

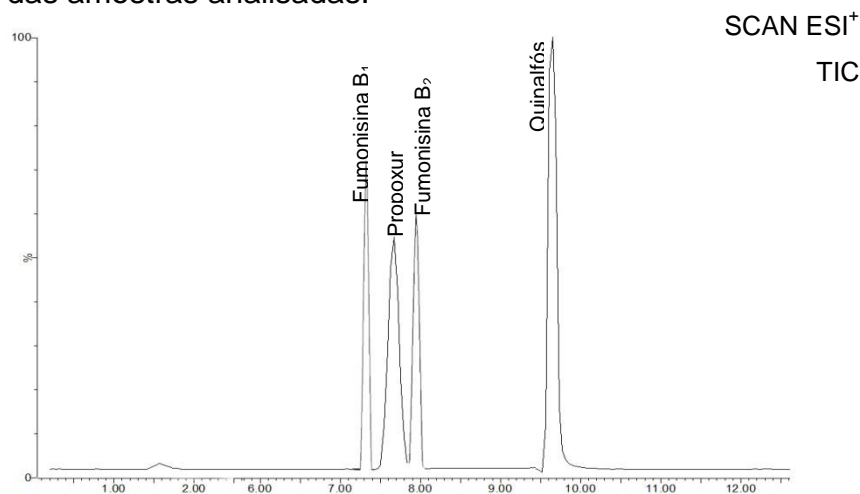


Figura 25. Cromatograma do extrato “branco” de milho.

Hajslova *et. al.*¹²⁶ explicam que assim como a obtenção de amostras “branco” de trigo é dificilmente alcançada, para amostras de milho também há a mesma dificuldade, sendo que estas contêm pelo menos vestígios de fumonisinas.

5.1.2.2 Curva analítica e linearidade

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica¹⁷⁹. Na

Tabela 17, encontram-se os dados obtidos através do estudo de linearidade das curvas analíticas.

Tabela 17. Coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear de trabalho obtidos, para cada micotoxina, pela análise por UPLC-MS/MS das soluções analíticas preparadas em solvente e no extrato de milho.

Micotoxinas	Curva Analítica Soluções em solvente				Curva Analítica Soluções em extrato de milho			
	a	b	r^2	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)	a	b	r^2	Faixa Linear (ng mL ⁻¹)
Aflatoxina B ₁	1389,9	-523,74	0,9912	0,1 - 50	1309,4	43,828	0,9914	0,1 - 50
Aflatoxina B ₂	968,19	-415,91	0,9973	0,1 - 50	908,56	-69,56	0,994	0,1 - 50
Aflatoxina G ₁	1179,5	-388,23	0,9923	0,1 - 50	1178	-199,07	0,997	0,1 - 50
Aflatoxina G ₂	523,79	-254,93	0,9955	0,1 - 50	492,8	-131,68	0,9988	0,1 - 50
Ocratoxina A	2051	-724,81	0,997	0,1 - 50	1764	-438,86	0,997	0,1 - 50
Fumonisina B ₁	525,73	-9037,8	0,9921	5 - 2500	523,92	-5077,4	0,9915	5 - 2500
Fumonisina B ₂	850,43	-25292	0,9938	5 - 2500	846,77	-19075	0,9928	5 - 2500
Desoxinivalenol	27,298	-814,62	0,9987	5 - 2500	24,649	-421,51	0,9986	5 - 2500
Diacetoxiscirpenol	36,13	-562,41	0,9951	5 - 2500	32,621	-201,25	0,9973	5 - 2500
Zearalenona	81,106	-1466	0,9944	5 - 2500	71,529	-1331,4	0,9944	5 - 2500
Toxina T-2	5,104	-95,236	0,9947	5 - 2500	4,726	-20,234	0,9917	100 - 2500
Toxina HT-2	15,664	-16,37	0,9942	5 - 2500	13,717	40,104	0,9949	5 - 2500

Todos os coeficientes de determinação obtidos para as 12 micotoxinas em estudo são superiores a 0,99, tanto para as soluções analíticas preparadas em

solvente quanto para aquelas preparadas em extrato de milho. O coeficiente de determinação permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.¹⁷⁹

Para todas as micotoxinas foi possível trabalhar em uma ampla faixa dinâmica linear visto que a para as micotoxinas do grupo 1 essa faixa está no intervalo de 0,1 a 50 ng mL⁻¹, e para as micotoxinas do grupo 2 este intervalo está compreendido entre 5 – 2500 ng mL⁻¹.

5.1.2.3 Efeito matriz

O efeito matriz pode sofrer variações ao longo do tempo e também depende do instrumento utilizado, devendo por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método, quanto na aplicação deste método nas análises de rotina.

Na Tabela 18, encontram-se os percentuais do efeito matriz para amostras de milho, observados para as micotoxinas em estudo, nas faixas de concentração estudadas. Da mesma forma que para a matriz trigo, o efeito matriz para milho também foi maior nas menores concentrações, quando calculados ponto a ponto.

Na Figura 26, estão expressos os valores de efeito matriz calculados a partir das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas, em sete diferentes concentrações, bem como a partir das soluções com as quatro menores concentrações. Ao contrário da situação observada com o trigo, onde o efeito matriz foi consideravelmente maior nas soluções de menor concentração, em milho este fato não foi observado, uma vez que o efeito matriz de maneira geral foi baixo para todas as concentrações das soluções analíticas preparadas em extrato desta matriz, permanecendo dentro do intervalo de -20% a + 20%. Sabe-se que valores de efeito matriz neste intervalo não exercem influência considerável nos resultados dos demais parâmetros estudados.

Tabela 18. Percentual de efeito matriz observado para cada concentração das soluções analíticas no estudo de linearidade das curvas analíticas.

Micotoxinas	Efeito matriz calculado em cada nível de concentração							Média
	Nível 1 (%)	Nível 2 (%)	Nível 3 (%)	Nível 4 (%)	Nível 5 (%)	Nível 6 (%)	Nível 7 (%)	
Aflatoxina B ₁	14	25	15	4	14	8	-5	11
Aflatoxina B ₂	15	6	9	-1	8	8	-6	6
Aflatoxina G ₁	37	29	14	5	7	5	0	14
Aflatoxina G ₂	-13	12	7	-5	7	1	-6	1
Ocratoxina A	-17	4	-4	-12	-12	-10	-14	-9
Fumonisina B ₁	152	83	51	10	8	3	0	44
Fumonisina B ₂	343	101	5	2	6	3	0	65
Desoxinivalenol	69	28	17	0	-1	-1	-9	15
Diacetoxiscirpenol	16	-1	-5	-10	-3	-2	-10	-2
Zearalenona	-21	-13	-8	-17	-11	-13	-12	-13
Toxina T-2	-47	40	-24	-7	1	0	-7	-6
Toxina HT-2	12	-23	-8	-19	-10	-9	-12	-10

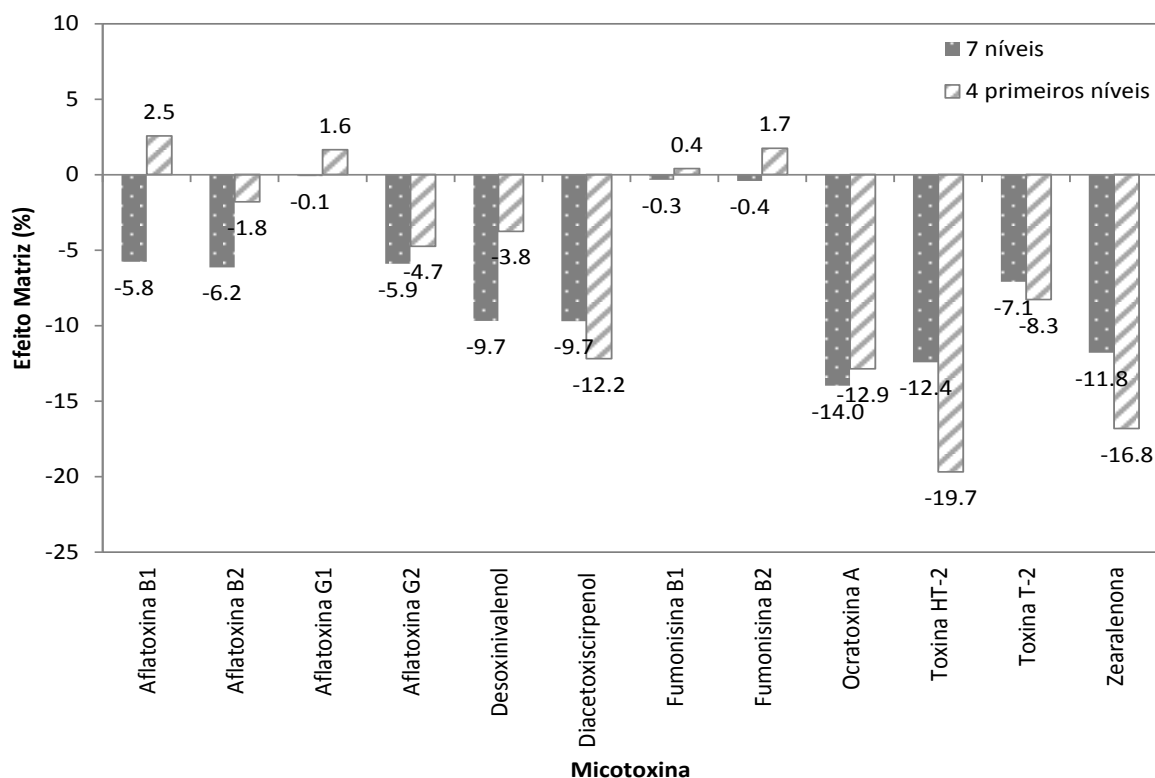


Figura 26. Percentual de efeito matriz obtido através do cálculo a partir das inclinações das curvas analíticas confeccionadas através das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato de milho.

Comparando-se o efeito exercido pela matriz trigo com o efeito exercido pela matriz milho, pode-se observar que o sinal analítico é mais afetado quando em presença de extrato de trigo (Figura 27).

Algumas micotoxinas, como por exemplo, as aflatoxinas, tiveram o sinal analítico aumentado quando em extrato de trigo, enquanto em extrato de milho ocorreu um decréscimo no sinal, comparado aquele apresentado pelas soluções analíticas em solvente.

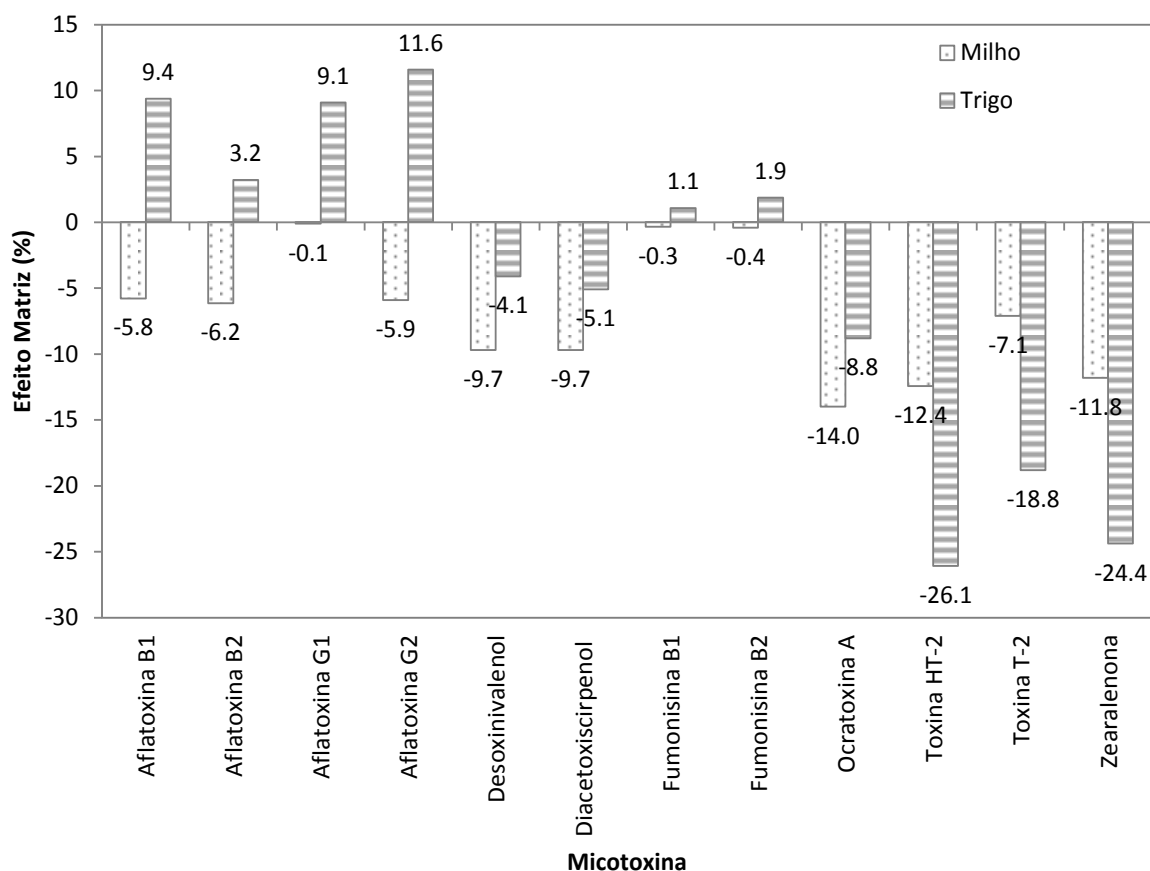


Figura 27. Comparação entre o efeito matriz exercido pela matriz milho e aquele apresentado pela matriz trigo, calculado a partir das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato de matriz (sete concentrações).

O efeito matriz é um parâmetro que precisa ser constantemente avaliado. Variação da medida do efeito da matriz pode ser encontrada entre as amostras individuais do mesmo produto, por exemplo, milho colhido em anos diferentes.^{17,172}

5.1.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação real do método validado para análise de amostras de milho, foi considerado a menor concentração de fortificação em que foi possível obter percentuais de recuperação dentro da faixa aceitável (70-120%) e valores de RSD \leq 20%. Os limites de quantificação do método de todas as micotoxinas atendem tanto aos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, quanto àqueles estabelecidos pela União Europeia. Os limites de quantificação estimados e o obtido experimentalmente encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Estimativas dos limites de detecção e de quantificação calculados, para o instrumento e para o método, e limite de quantificação real do método.

Micotoxinas	LOD estimado		LOQ estimado		LOQ _m Real
	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método (μ g kg ⁻¹)	Instrumento (ng mL ⁻¹)	Método (μ g kg ⁻¹)	Experimental (μ g kg ⁻¹)
Aflatoxina B ₁	0,1	0,4	0,3	1,3	1
Aflatoxina B ₂	0,1	0,4	0,3	1,3	1
Aflatoxina G ₁	0,1	0,4	0,3	1,3	1
Aflatoxina G ₂	0,1	0,4	0,3	1,3	1
Ocratoxina A	0,1	0,4	0,3	1,3	1
Fumonisina B ₁	25	100	83,25	333	50
Fumonisina B ₂	25	100	83,25	333	50
Desoxinivalenol	5	20	16,65	66,6	50
Diacetoxiscirpenol	5	20	16,65	66,6	50
Zearalenona	5	20	16,65	66,6	50
Toxina T-2	25	100	83,25	66,6	50
Toxina HT-2	25	100	83,25	333	50

5.1.1.5 Ensaios de fortificação e recuperação

Através dos ensaios de fortificação e recuperação, foi possível avaliar o método quanto a sua precisão e exatidão. Na Tabela 20 constam os percentuais de recuperação, nos três níveis de concentração para as 12 micotoxinas em estudo, assim como os valores de RSD%.

Tabela 20. Média dos percentuais de recuperação e dos valores de RSD% obtidos através do estudo de fortificação e recuperação em milho, nas três concentrações de fortificação estudadas.

Micotoxinas	Níveis de Fortificação					
	Nível 1		Nível 2		Nível 3	
	Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)	Rec. (%)	RSD(%)
Aflatoxina B ₁	74,9	13,7	78,8	9,1	86,6	10,4
Aflatoxina B ₂	90,4	13,5	84,8	14,3	87,7	11,2
Aflatoxina G ₁	84,7	9,6	87,1	9,8	91,2	9,5
Aflatoxina G ₂	84,1	7,3	78,4	4,8	84,6	3,5
Ocratoxina A	87,5	8,9	84,8	9,2	83,1	8,4
Fumonisina B ₁	77,7	19,0	80,5	15,8	83,2	5,5
Fumonisina B ₂	78,1	17,9	75,1	12,2	72,3	3,8
Desoxinivalenol	76,9	3,8	78,8	4,4	82,3	2,0
Diacetoxiscirpenol	90,5	12,4	86,9	7,9	83,9	4,4
Zearalenona	86,3	9,4	90,4	13,3	86,0	9,9
Toxina T-2	88,4	15,3	79,8	11,7	88,6	6,5
Toxina HT-2	88,7	15,3	87,6	15,9	88,9	13,0

Através dos valores de recuperação (Rec%) e do desvio padrão relativo (RSD%), evidencia-se que o método é preciso e exato e atende as exigências dos órgãos regulamentadores, podendo ser desta forma utilizado para a determinação das 12 micotoxinas estudadas.

5.2 MONITORAMENTO

Foi realizado o monitoramento quanto à presença e concentração de 12 micotoxinas em trigo, desde o campo até os produtos disponibilizados na mesa do consumidor através da análise de alimentos presentes nas prateleiras de supermercados. A avaliação no início da cadeia produtiva foi realizada através de três ensaios a campo. O primeiro consistiu no estudo de distintos materiais genéticos em diferentes localidades de semeadura. Também foram testados genótipos com diferentes classificações de reação de resistência à giberela (moderadamente suscetível e com moderada resistência). Em um terceiro ensaio a campo, foi selecionado uma única cultivar, a qual foi submetida a diferentes

tratamentos fungicidas. Ou seja, foi avaliada a interação genótipo-ambiente; genótipo- tratamento fungicida; genótipo- reação de resistência à giberela.

Após a colheita, o segundo seguimento da cadeia produtiva é o comércio. Os grãos depois de colhidos são armazenados e podem ser comercializados no mercado interno ou exportados. Da mesma forma, grãos de outros países podem ser adquiridos para abastecer o mercado interno. Foram avaliados grãos de trigo tipo exportação, assim como aqueles grãos que foram importados pelo Brasil através do porto de Rio Grande.

Grande parte do trigo brasileiro é processado para obtenção da farinha. O processamento avaliado foi o de moagem dos grãos de trigo. Foram analisados os grãos recebidos para processamento antes e após uma etapa de limpeza (anterior a moagem), assim como, foram então avaliadas as respectivas frações (farinha branca e farelo de trigo).

Após a etapa de processamento, a farinha obtida está pronta para a comercialização. Este produto é o que chega à mesa do consumidor. Para contemplar esta última etapa, avaliou-se amostras de farinha de trigo disponíveis nas prateleiras de supermercados das cidades de Cruz Alta e Santa Maria, no Rio Grande do Sul.

Amostras de milho também foram avaliadas. Amostras de grãos destinados à exportação através do Porto de Rio Grande, assim como amostras de milho e quirera de milho destinadas à ração animal. Foram analisadas também, amostras de farinha de milho destinadas a alimentação humana disponíveis nas prateleiras de supermercados das cidades de Cruz Alta e Santa Maria, no Rio Grande do Sul.

Os resultados obtidos em cada experimento são discutidos a seguir.

5.2.1 Ensaio a campo

5.2.1.1 Ensaio com genótipos de trigo em distintas localidades

Foram verificados efeitos significativos ($p < 0,01$) para os fatores linhagens, ambientes e interação linhagens x ambientes (Tabela 21), indicando que a ocorrência de DON é dependente das condições ambientais, corroborando com os resultados obtidos por Silva¹⁸⁰ e Blandino et al.¹⁸¹

Tabela 21. Efeitos significativos ($p < 0,01$) para os fatores ambientes, cultivares e interação cultivares x ambientes.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	Test F
Linhagens	13	176173**	12,2
Ambiente	2	1047809**	72,5
Linh X Amb	26	137239**	9,65

**Valores significativos a 1% ($p < 0,01$) de probabilidade de erro pelo teste F

As linhagens 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 se classificam como trigo de ciclo precoce e médio, enquanto as linhagens 11, 14, 15, 16, 17 e 21 se classificam como trigo de ciclo tardio. A testemunha utilizada, o cultivar Quartzo, possui ciclo médio, com espigamento em média de 91 dias. O período de floração das linhagens de trigo de ciclo precoce e médio variou de 85 a 103 dias após o plantio. Já para as linhagens caracterizadas como trigo de ciclo tardio este período variou de 100 a 110 dias.

As condições ambientais neste período são de suma importância, pois na fase do florescimento a planta fica suscetível ao fungo e no espigamento ele se instala. A ocorrência de giberela depende de precipitações pluviais elevadas, ou seja, dias consecutivos de chuva. A temperatura entre 20 e 24 °C, típica de primavera, é uma porta aberta para a doença. Ocorreram alguns períodos de chuvas nos três locais de cultivo, com destaque na fase de florescimento da cultura (Figura 28). Essa condição de umidade elevada, em tese, configurando ambiente favorável ao desenvolvimento de enfermidades, foi contrabalançada pelas temperaturas baixas nas cidades de São Luiz Gonzaga e Santa Rosa, fator desfavorável a doenças. Ainda se destaca, como atenuante de ambiente adverso (excesso de precipitação pluvial), que, na maioria dos dias secos, predominou uma condição de temperatura mínima e máxima baixas, céu claro e insolação elevada.¹⁸² No município de Cruz Alta a variação entre as temperaturas mínima e máxima foi maior nos período com chuva. Essa variação climática entre os três ambientes pode vir a explicar a variação para um mesmo genótipo nos distintos locais. Tibola *et.al.*¹⁵ afirma que as condições meteorológicas no período entre o início da antese e enchimento de grãos, têm grande influência sobre as concentrações de micotoxinas, o que corrobora com este estudo.

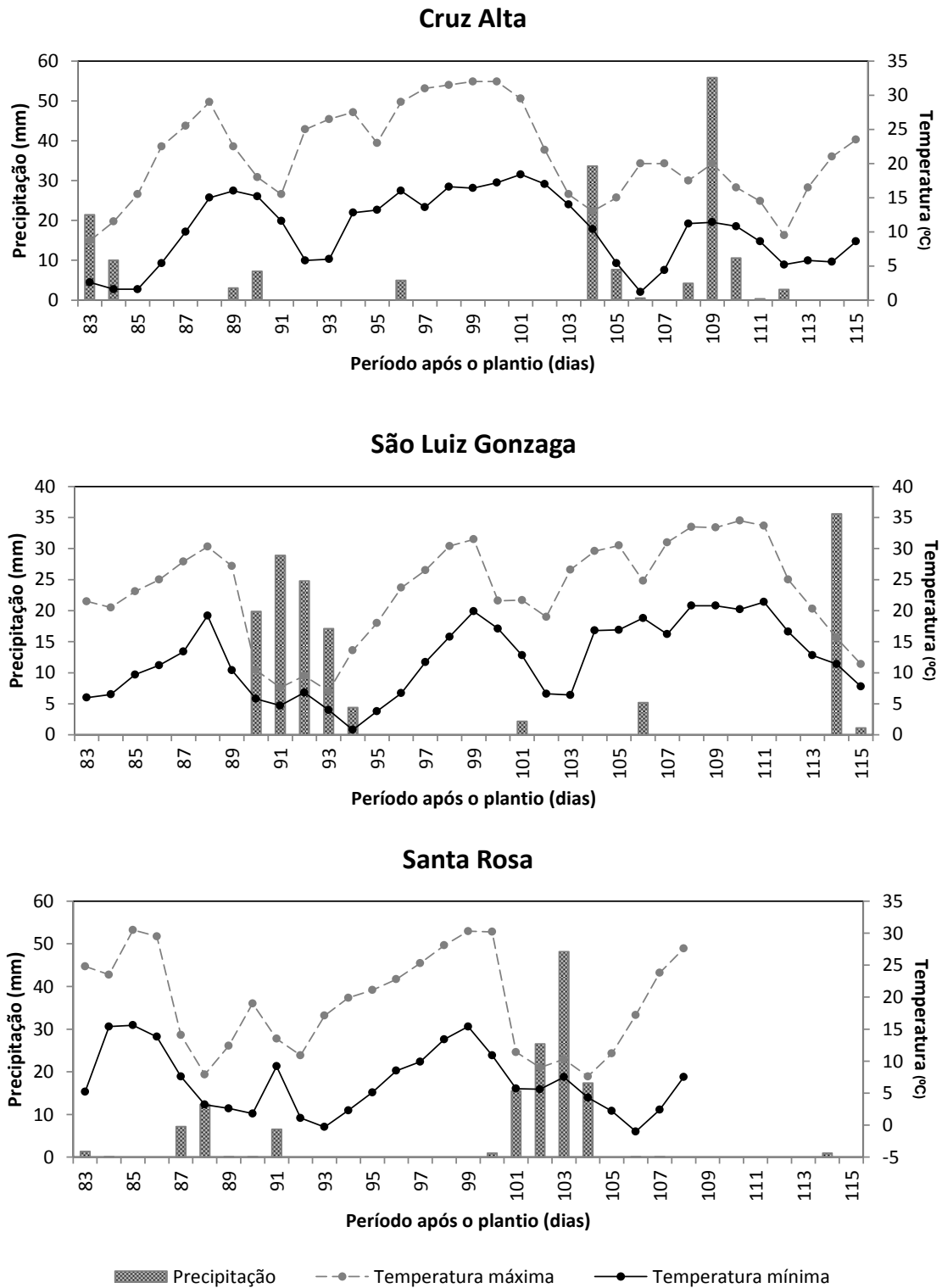


Figura 28. Dados de precipitação, temperatura mínima e temperatura máxima de Cruz Alta, São Luiz Gonzaga e Santa Rosa do período de 83 a 115 dias após a data de plantio. (Temperaturas mínima e máxima não disponíveis para a cidade de Santa Rosa para os dias 109 a 115). Figura elaborada a partir de dados do Instituto Nacional de Meteorologia.¹⁸²

Observou-se contaminação por DON em 100% das amostras em concentrações de 53 a 1483 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 29 e Apêndice 4). Foi notada diferença significativa para uma mesma linhagem nos três locais de cultivo. As linhagens cultivadas em Cruz Alta apresentaram as maiores concentrações de DON, com destaque para a linhagem 14 que apresentou a maior concentração de DON neste local (1483 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A linhagem 4 foi uma exceção, sendo a única que diferiu estatisticamente das demais linhagens, apresentando maior concentração de DON em São Luiz Gonzaga (260 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

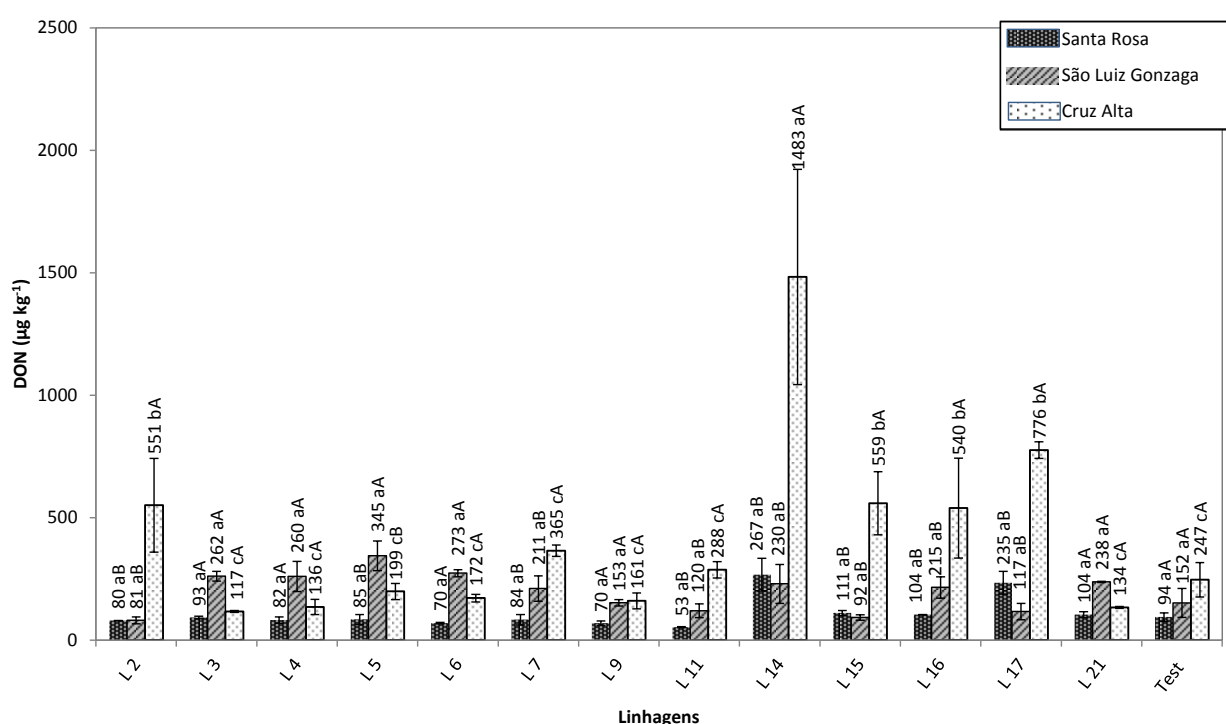


Figura 29. Comparação de médias pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro para presença da micotoxina DON em 13 linhagens de trigo cultivado em três ambientes. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre locais para um mesmo cultivar, enquanto que letras minúsculas indicam diferença estatística entre linhagens para um determinado local. A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as repetições.

Diferença significativa foi observada entre as distintas linhagens no mesmo local de cultivo (Figura 29). As diferenças mais acentuadas foram observadas em Cruz Alta, onde as linhagens apresentaram concentrações de DON que variaram de 117 a 1483 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na cidade de São Luiz Gonzaga os valores encontrados foram

de 81 a 345 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e na cidade de Santa Rosa, esses valores ficaram entre 53 e 267 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de DON.

A cultivar utilizada como testemunha não apresentou diferença significativa nas concentrações de DON quando comparado os três locais de cultivo. O mesmo pode ser observado para as linhagens 3, 4, 6, 9 e 21, cujas concentrações de DON encontradas nas três cidades não diferiram significativamente pelo teste Scott Knott a 5%. Essas linhagens se assemelham quanto ao ciclo precoce e médio, enquanto a cultivar 21 é a única de ciclo tardio. A testemunha é classificada como uma cultivar de ciclo médio.

As linhagens 14, 15, 16 e 17 de ciclo tardio apresentaram concentrações de DON na cidade de Cruz Alta maiores que nos outros locais de cultivo. Provavelmente, isso se deve ao fato que na fase de espigamento, as condições de precipitação e temperatura neste local foram mais favoráveis ao desenvolvimento do fungo e conseqüente produção de micotoxinas, quando comparada as condições climática de Santa Rosa e São Luiz Gonzaga onde também ocorreram precipitações, mas as variações entre as temperaturas máximas e mínimas foram menores.

Schaafsma *et. al.*¹⁸³ constataram que a maioria das diferenças de contaminação com DON (48%) são explicadas pelas variações climáticas, resultados que corroboram com este estudo. Na Sérvia, Stankovic *et al.*¹⁸⁴ observaram concentrações mais elevadas de DON na safra em 2005 (605 $\mu\text{g kg}^{-1}$), quando comparada com a safra de 2007 (283 $\mu\text{g kg}^{-1}$), devido a maior precipitação na época da floração e espigamento do trigo, observado em 2007.

A associação positiva e significativa (0,86) entre Santa Rosa e Cruz Alta (Figura 30), indica que tanto as linhagens que apresentaram as maiores concentrações de DON como aquelas que apresentaram as menores concentrações de DON tendem a serem as mesmas em ambos os locais, conforme pode ser visto mais detalhadamente na Figura 29.

Em contraposição, há associação negativa e significativa (-0,60) entre São Luiz Gonzaga e Cruz Alta (Figura 30), o que indica que as linhagens que apresentaram maiores valores de contaminação por DON em Cruz Alta tendem a apresentar os menores valores em São Luiz Gonzaga. As linhagens de ciclo precoce e médio tenderam a apresentar as maiores concentrações de micotoxinas em São

Luiz Gonzaga, enquanto em Cruz Alta esta tendência foi observada nas linhagens de ciclo tardio. Os maiores índices de precipitação foram constatados durante o período de floração das linhagens de ciclo precoce e médio em São Luiz Gonzaga, enquanto os maiores índices de precipitação em Cruz Alta foram verificados durante o período de floração das linhagens de ciclo tardio.

São Luiz Gonzaga e Santa Rosa não apresentaram associação significativa (-0,05), o que indica que não há uma relação entre as concentrações de DON evidenciadas nos dois locais de cultivo. As linhagens cultivadas em ambas as cidades apresentaram contaminação por DON que não diferiram estatisticamente. A única linhagem que apresentou diferença estatística entre estes dois locais foi a linhagem 5. Nestes dois locais foram verificadas baixas concentrações de DON (70 a 365 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

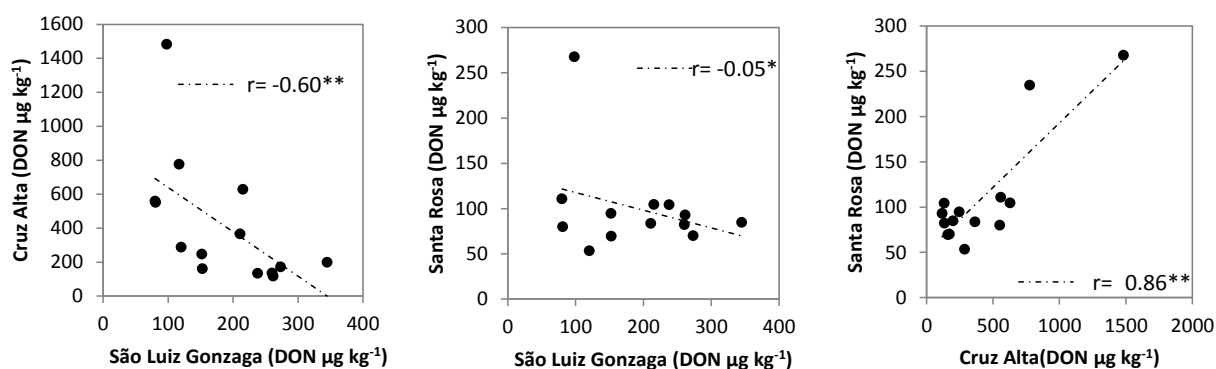


Figura 30. Dispersão gráfica dos valores de correlação de Pearson entre São Luiz Gonzaga e Cruz Alta, São Luiz Gonzaga e Santa Rosa e Cruz Alta e Santa Rosa para a micotoxina DON em amostras de treze linhagens de trigo. *Valores não significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste t . **Valores significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste t .

Alkadri *et. al.*¹⁸⁵ avaliaram a presença de 25 micotoxinas em grãos de trigo sírios e italianos. Eles observaram diferenças nas concentrações de micotoxinas nos diferentes locais, semelhantemente a este trabalho. Os autores justificaram a diferença na produção de micotoxinas pelas diferenças climáticas de ambos locais de estudo, que tiveram influência na concentração e na diversidade de micotoxinas.

No trabalho desenvolvido por Perkowski e colaboradores¹⁸⁶ também foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de micotoxina de *Fusarium*

em 15 cultivares estudadas. Silva¹⁸⁰ identificou variabilidade de comportamento de cultivares brasileiros à contaminação pela micotoxina DON, indicando que a alteração da composição varietal do trigo brasileiro pode ter impacto positivo no controle das concentrações de DON.

Entretanto, deve-se ressaltar que a safra de inverno 2013 apresentou poucas condições ao desenvolvimento fúngico nos locais em que foram realizados os experimentos. Sendo assim, em condições mais favoráveis, provavelmente, as concentrações de DON poderiam ser maiores. Por isso as pesquisas nessa área devem ser intensificadas, para que o trigo brasileiro possa atender as exigências da ANVISA nos próximos anos, com concentrações de DON inferiores aos limites máximos tolerados.

5.2.1.2 Ensaio com genótipos de trigo com diferentes reações de resistência a giberela

Todos os genótipos de trigo avaliados apresentaram contaminação média por DON, em concentrações variando de 57 a 966 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Apêndice 5 e Figura 31). A aplicação de fungicida causou redução significativa nas concentrações de DON quando comparada a testemunha que não recebeu nenhum tratamento fungicida.

Os genótipos 1, 2, 4 e 5 apresentaram redução nas concentrações de DON de comparado ao tratamento testemunha que não recebeu nenhuma aplicação. Para o tratamento com uma aplicação de fungicida, a redução foi de 52,5%; 58,9%; 66,8% e 76,2% para os genótipos 1, 2, 4 e 5, respectivamente. Quando a cultura de trigo recebeu duas aplicações de fungicida, a redução foi de 73,1%; 70,2%; 66,5% e 77,4, para os genótipos 1, 2, 4 e 5, respectivamente.

O efeito do número de aplicações na redução das concentrações de DON foi significativo apenas para o genótipo 1. Os genótipos 2, 4 e 5, as concentrações de DON, apesar de numericamente inferiores com duas aplicações, não diferiram estatisticamente entre uma e duas aplicações no florescimento.

Contrapondo os resultados obtidos neste trabalho, Baturó-Cieśniewska e colaboradores¹⁸⁷ verificaram que o uso de fungicidas não resultou na redução da concentração de DON em comparação com a testemunha não tratada na maioria dos casos. Os mesmos autores notaram que doses decrescentes, em alguns casos,

aumentaram a quantidade de micotoxinas produzidas. Porém, os mesmos desconhecem os mecanismos pelos quais os fungicidas estimulam a produção micotoxinas.

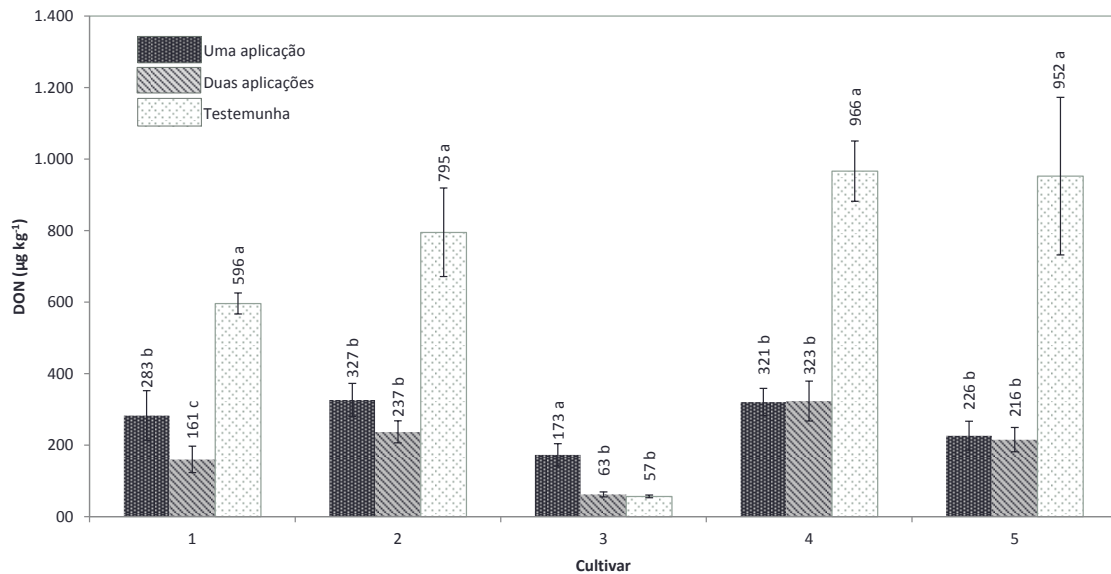


Figura 31. Concentração de DON em cada cultivar, quando tratados com uma aplicação de fungicida (25-50% de floração), duas aplicações de fungicidas (25-50% de floração e a segunda 10 dias após a aplicação anterior) e a testemunha não tratada. Médias com letras minúsculas iguais não diferem quanto ao número de aplicações para um mesmo cultivar pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as repetições.

A aplicação fungicida não causou redução das concentrações de micotoxina DON no genótipo 3, ao contrário, quando submetida a um tratamento fungicida as concentrações de DON foram três vezes superior as encontradas na testemunha não tratada, e quando submetida a duas aplicações de fungicida, a concentração de DON foi semelhante. Mathies e colaboradores¹⁸⁸ mostraram em estudo *in vitro* que doses subletais de fungicidas podem estimular a produção de tricotecenos por *Fusarium graminearum*.

Uma explicação para as doses subletais de fungicidas estimular a produção de micotoxinas foi proposta por Ramirez et al.¹⁸⁹ Os autores explicam que na presença de concentrações subletais de certos fungicidas, certas cepas fúngicas

respondem a essa tensão com aumento da produção de metabólitos secundários, incluindo as micotoxinas.

Outra hipótese para explicar o fato da cultivar 3 apresentar maiores concentrações de micotoxinas quando tratada com fungicidas é proposta por Simpson e colaboradores.¹¹¹ Eles sugerem que a remoção de fungos não produtores de micotoxina pode ter o efeito global de alívio da competição e levar ao aumento do estabelecimento de quaisquer agentes patogênicos produtores de toxinas que são menos sensíveis ao fungicida aplicado.

A reação de resistência à giberela das cultivares e as concentrações de DON não apresentaram correlação significativa (-0,41) quando a cultura não recebeu nenhum tratamento fungicida (Figura 32). Foi observada uma associação significativa e negativa (-0,73) quando comparado às concentrações de DON dos grãos que receberam uma aplicação fungicida, o que indica que cultivares com maiores reações de resistência à giberela, quando tratadas com uma aplicação de fungicida tendem a apresentar menores concentrações da micotoxina DON. Porém, quando a cultura recebeu dois tratamentos fungicidas, esta correlação não foi significativa (-0,57).

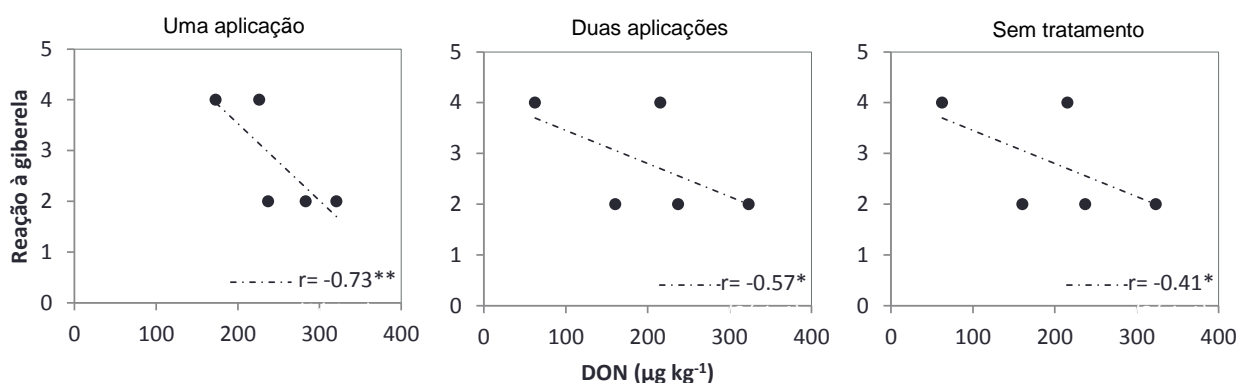


Figura 32. Dispersão gráfica dos valores de correlação de Pearson entre as concentrações de DON e a reação de resistência à giberela quando há uma aplicação de fungicida, duas aplicações de fungicidas e nenhuma aplicação (testemunha não tratada). *Valores não significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste t . **Valores significativos a 1% de probabilidade erro ($p < 0,01$) pelo teste t .

As cultivares 3 e 5 apresentam moderada resistência à giberela, porém resultados distintos quanto à concentração de DON foram obtidos. A cultivar 3 sem

tratamento fungicida apresentou concentração de DON de $56 \mu\text{g kg}^{-1}$ enquanto a cultivar 5 também sem tratamento fungicida apresentou contaminação por DON na concentração de $952 \mu\text{g kg}^{-1}$. Mesterházy et al.¹⁹⁰ também relataram genótipos com reação à giberela semelhantes, mas que apresentaram contaminação com DON distintas (100 e $700 \mu\text{g kg}^{-1}$).

A resistência da cultivar é uma estratégia importante que é amplamente recomendada para o controle de giberela e DON. No entanto, a resistência em trigo-*F.graminearum*-DON é uma característica complexa.^{191,192} Mesterházy¹⁹² descreveu cinco mecanismos de resistência à giberela, que mostram que não há uma estreita relação entre o acúmulo de DON e incidência e severidade da giberela. São eles: Tipo I: Resistência à infecção inicial, o Tipo II: resistência à propagação no interior da espiga, Tipo III: redução do acúmulo de DON (não correlacionado com as resistências do tipo I e II), Tipo IV: resistência dos grãos à infecção (mesmo que a espiga esteja infectada). Tipo V: tolerância (menor perda de produtividade, mesmo com elevada infecção).

Para Miller e Arnison¹⁹³ baixas concentrações da micotoxina DON no grão pode ser explicado por três possíveis causas: (a) baixa concentração de DON produzida pelo fungo, (b) a degradação de DON por enzimas da planta durante desenvolvimento do grão, ou (c) acúmulo de DON em outras partes da espiga, em tecidos que não sejam os grãos.

Os resultados relatados na literatura são contraditórios. A baixa consistência dos relatos pode ser decorrência das diferentes condições.¹⁹⁴ Ambiente e interação genótipo-ambiente têm um impacto forte neste patossistema.^{192,194,195} Diversos fatores podem influenciar a associação entre giberela e DON, incluindo as condições meteorológicas,^{196,197} a resistência da cultivar,^{190,192} efeito do fungicida^{111,198} bem como a agressividade patógeno.¹⁹⁴

Alguns autores relatam altas correlações entre as características de resistência e as concentrações de DON. Mas a maioria dos estudos revelaram associação não significativa destas variáveis.

Em estudo realizado por Müller e colaboradores,¹⁹⁹ o ranking de susceptibilidade de cultivares de trigo à giberela não teve influência significativa sobre o acúmulo de DON. Resultados obtidos por Bai e Shaner,²⁰⁰ Koch et. al.,²⁰¹ Brennan²⁰² evidenciaram que a suscetibilidade das cultivares à giberela é um fator

moderado sobre o acúmulo de micotoxinas. Porém outros fatores como manejo, incidência de espécies de *Fusarium* mais ou menos toxigências e fatores ambientais teriam maior influência.

Paul e colaboradores²⁰³ notaram que cultivares de trigo com distintas reações de resistência à giberela apresentaram uma interação significativa fungicida-cultivar, exceto para o rendimento e concentração de DON.

Embora o ano de 2013 tenha sido desfavorável à ocorrência de giberela no RS, foram observadas diferenças significativas no IG nos materiais avaliados (Figura 33). A incidência de giberela no ensaio foi baixa, variando de 0,01 a 2,33 (Apêndice 6). Em todos os genótipos, independente da reação à giberela, houve redução significativa no IG com as aplicações de fungicida no florescimento. Com relação ao número de aplicações, para os genótipos 1,2,3 e 4, observou-se redução no IG entre uma e duas aplicações de fungicida. No material 5, esta diferença não foi significativa, apenas em relação à testemunha não tratada no florescimento.

Uma vez que o acúmulo de micotoxina DON é consequência da invasão do patógeno²⁰⁴ poderia se esperar uma associação positiva entre o índice de giberela e as concentrações de DON. Entretanto, essa associação é muito variável e bastante complexa. Correlação significativa entre as concentrações de DON e índice de giberela foram observados quando as cultivares receberam um e dois tratamentos fungicidas (0,87 e 0,75 respectivamente). Por outro lado, o tratamento testemunha, sem fungicidas apresentou correlação não significativa (0,55).

Há relatos na literatura de associações significativas entre giberela e concentrações de DON como relatadas por Arseniuk *et. al.*²⁰⁵ e Mesterhazy *et. al.*¹⁹¹, e a ausência de associação significativa, conforme relatadas por Edwards *et al.*²⁰⁶ e Spolti *et. al.*¹¹² em estudo no sul do Brasil, observaram que duas aplicações de fungicidas se mostrou a melhor medida no controle da doença. No entanto, a adoção de tal prática não se mostrou consistente quanto a redução da contaminação por micotoxinas nos grãos.

Tibola e colaboradores¹⁵ observaram a mesma tendência de incidência de giberela e concentração de micotoxinas detectadas nas amostras de trigo quando compararam duas safras agrícolas, apesar de que os dados de severidade de giberela observados no campo e o acúmulo de micotoxinas nem sempre apresentam adequada correlação.

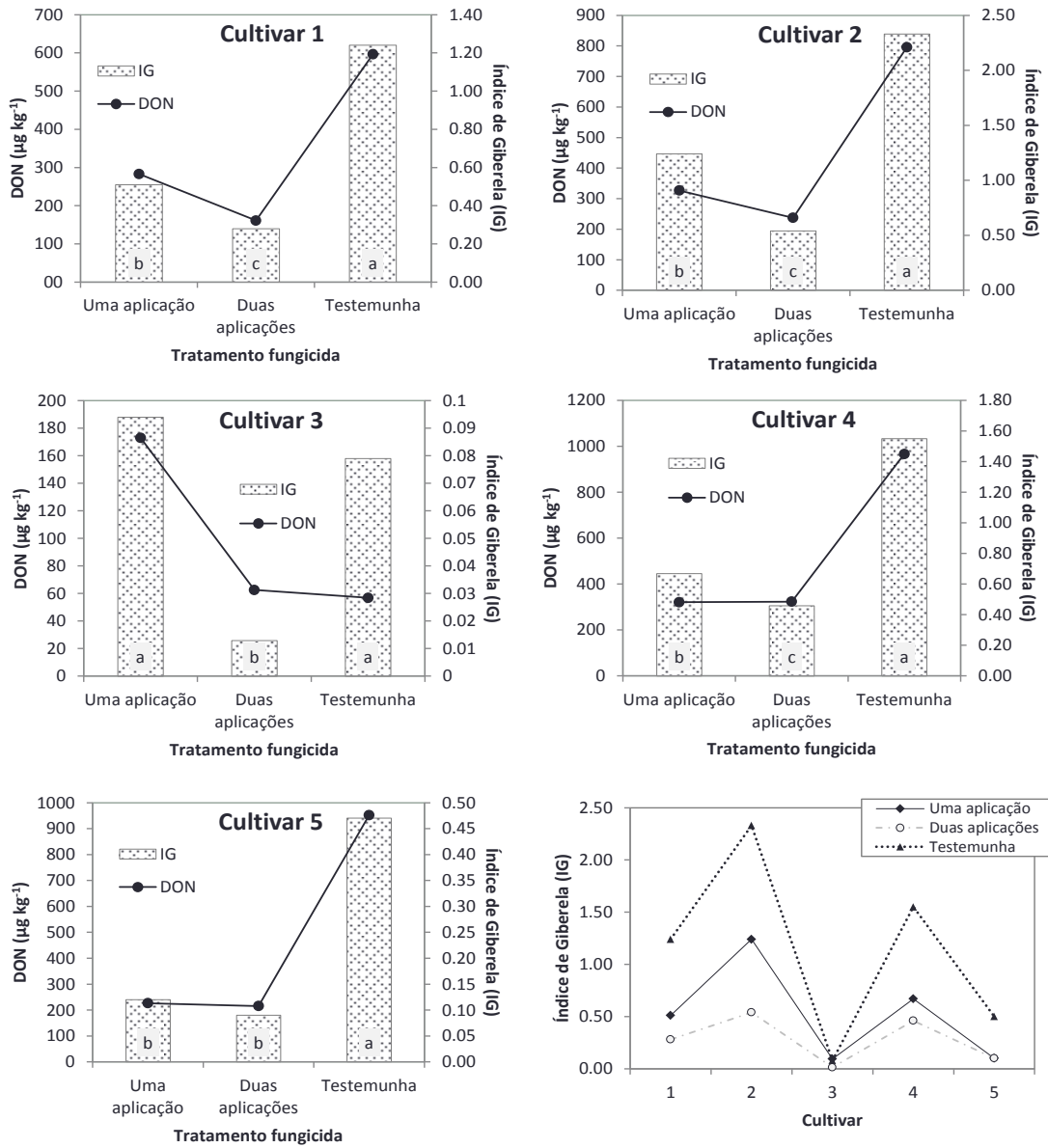


Figura 33. Índice de giberela em cada cultivar, quando tratados com uma aplicação de fungicida, duas aplicações de fungicidas e a testemunha não tratada comparada às concentrações de DON. Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença estatística no índice de giberela quanto ao número de aplicações para um mesmo cultivar pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A ausência de associação significativa (-0,28) entre o rendimento e as concentrações de DON evidencia que não há correlação entre estas duas variáveis em estudo. Spolti *et. al.*¹¹² observaram resultados semelhantes aos obtidos neste

estudo. As cultivares 2, 3 e 5 não diferiram estatisticamente da testemunha quando comparado o rendimento com um e dois tratamentos fungicidas. A cultivar 1 apresentou maior rendimento quando tratada com uma aplicação de fungicida, enquanto a cultivar 4 apresentou maior rendimento quando recebeu dois tratamentos fungicidas (Figura 34). Embora o rendimento de grãos não tenha diferido estatisticamente entre os tratamentos para todos os genótipos testados, em média, foram colhidos 3,7 sacas/ha a mais quando se utilizou fungicida no florescimento.

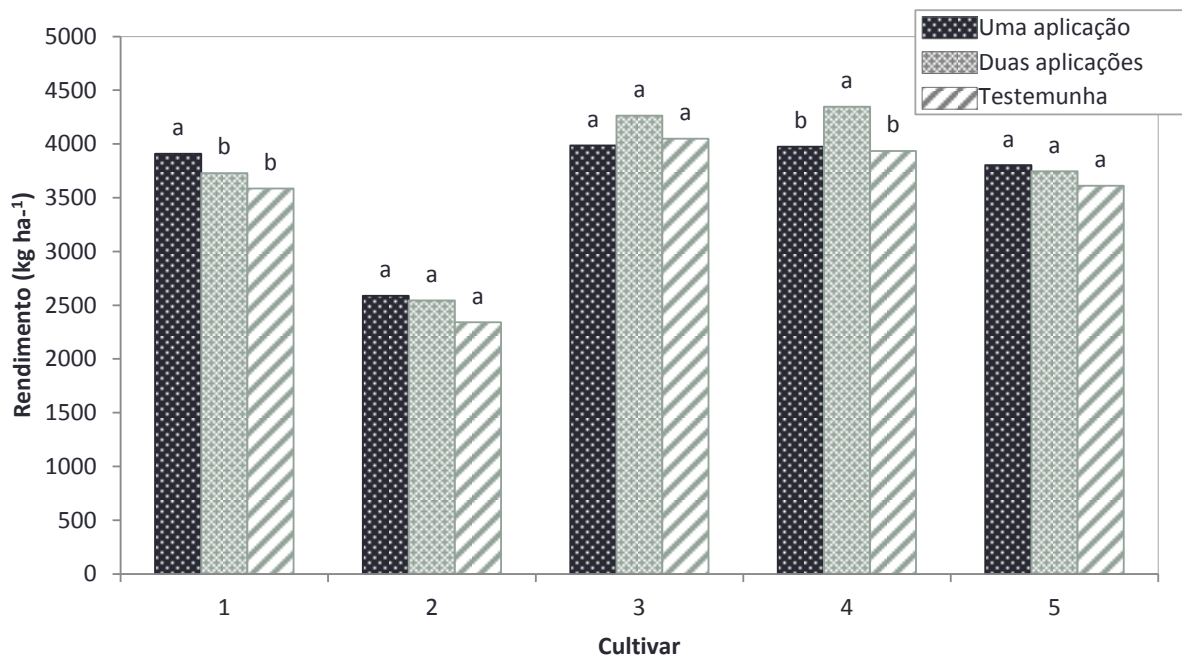


Figura 34. Rendimento de cada cultivar com uma, duas ou sem aplicações de fungicidas. Médias com letras minúsculas iguais para uma mesma cultivar não diferem em rendimento pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A complexidade do patossistema exige maior investigação, a ponto de se obter um melhor manejo da doença, assim como menor acúmulo de micotoxinas. O contínuo levantamento da incidência e severidade da giberela no campo, associado ao monitoramento da ocorrência de micotoxinas, são práticas fundamentais para balizar a adoção de estratégias de manejo adequadas, tais como aplicação ou não de fungicidas, escolha de cultivares com resistência à giberela e também ao acúmulo de micotoxinas, afim de minimizar os impactos negativos na cadeia produtiva, garantindo a produtividade e a qualidade dos grãos.

5.2.1.3 Ensaio com diferentes fungicidas

Na ausência de níveis elevados de resistência dentro de variedades comerciais de trigo, a maioria das tentativas para controlar a giberela dependem de aplicação de fungicida.¹¹¹ O uso de fungicidas durante o crescimento da cultura de trigo não garante a ausência de toxinas nos cereais colhidos.²⁰⁷ Além disso, há estreito período para a aplicação de fungicidas. Se esse período for perdido a infecção pode ocorrer, e assim, as aplicações posteriores do fungicida não evitarão a formação de DON.²⁰⁸

Todas as amostras de grãos de trigo avaliadas neste ensaio apresentaram contaminação por DON em concentrações de até 198 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As concentrações encontradas estão todas em conformidade com a legislação brasileira vigente (Tabela 4). No ano de 2013, as condições climáticas foram favoráveis em termos de agricultura, especialmente para os cereais de estação fria.²⁰⁹ No entanto, em safras com severa epidemia de giberela, como ocorrido em 2009, valores superiores a estes foram encontrados. Na safra de 2009, Tibola e colaboradores⁸ relataram concentrações de DON que excederam os limites máximos tolerados pela legislação brasileira atual, em 47, de 119 amostras.

Para a maioria dos tratamentos, foi observado redução das concentrações de DON em relação à testemunha não tratada. A utilização de fungicidas triazóis, benzimidazóis, e misturas de triazóis + estrobilurina, assim como triazóis, estrobilurina + benzimidazóis reduziram as concentrações de DON comparado ao ensaio que não recebeu nenhum tratamento fungicida. Estes resultados estão em conformidade com resultados obtidos por Blandino et al.¹⁸¹ e Haidukowski et al.,²¹⁰ que concluíram que fungicidas a base de triazol e imidazol são os mais eficientes para o controle da doença e diminuição das concentrações de DON.

Porém, a aplicação de fungicidas do grupo químico estrobilurinas em mistura com fungicida carboxamida, nos tratamentos 10 e 11 não causou redução das concentrações de DON. Ambos tratamentos não diferiram significativamente da testemunha não tratada. No tratamento 10, as concentrações de DON foram numericamente superiores às concentrações de micotoxina na testemunha (Figura 35).

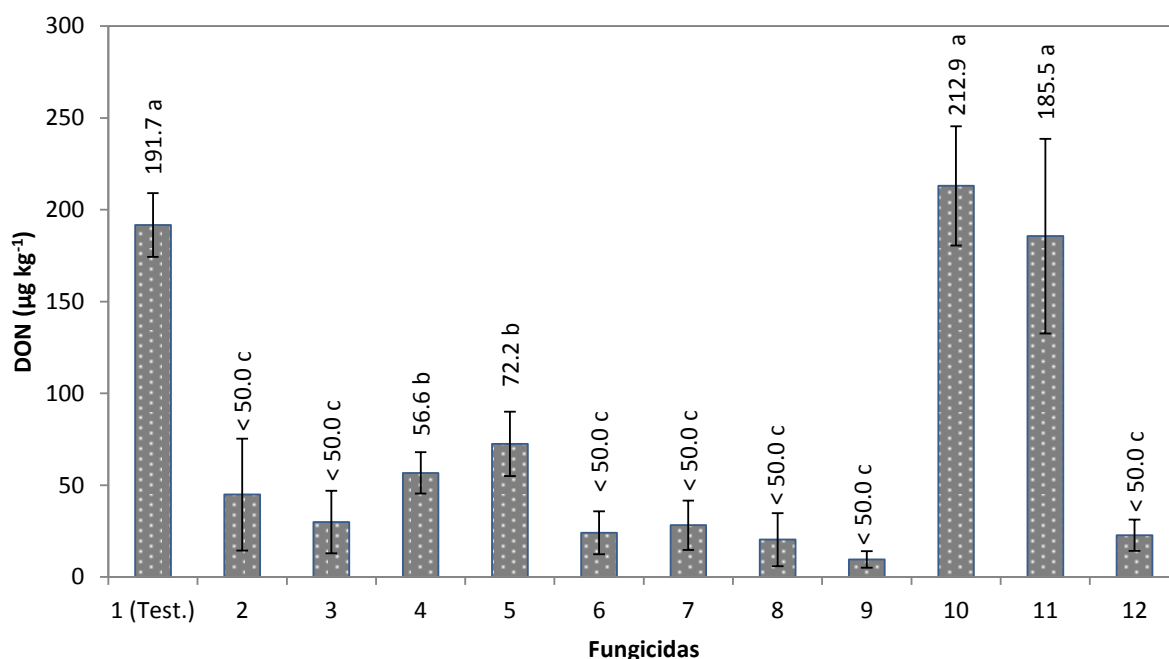


Figura 35. Concentração de DON para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada. Médias com letras minúsculas iguais não diferem quanto ao fungicida aplicado pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). A barra de erro representa o desvio padrão médio entre as repetições.

Siranidou e Buchenauer²¹¹ também estudaram o efeito de dois fungicidas do grupo químico estrobilurina. Eles notaram que a aplicação de azoxistrobina reduziu os índices de giberela, embora a concentração de DON tenha sido semelhante ao do controle não tratado. Estudo conduzido por Cromey e colaboradores²¹² obtiveram dados semelhantes a este estudo, onde a utilização dos fungicidas tebuconazole (Triazol) e carbendazim (Benzimidazol) reduziram significativamente as concentrações de micotoxinas. No entanto, quando se empregou azoxistrobina (Estrobilurina) as concentrações de micotoxinas não foram afetadas em comparação ao tratamento testemunha. Blandino e Reyneri¹⁰⁸ observaram redução da concentração de DON com a utilização de fungicidas do grupo triazóis, os quais incluem Metconazol.

Em contraste, outros estudos tem demonstrado que o uso de fungicidas estrobilurina podem resultar em aumento nas concentrações de DON em cereais.²¹³ Em pesquisa desenvolvida por Mesterházy et al.,²¹⁴ foi observado um incremento nas concentrações de DON quando se fez tratamento com fungicida azoxistrobina

(Estrobilurina). Baturó-Cieśniewska et. al.,¹⁸⁷ Zhang et al.,¹⁹⁸ Pirgozliev et. al.,²¹⁵ Blandino et. al.²¹⁶ e Blandino e Reyneri¹⁰⁸ obtiveram resultados semelhantes.

Em trabalho desenvolvido por Simpson et al.,¹¹¹ a hipótese para justificar o aumento nas concentrações de DON com a aplicação de estrobilurina, é de que provavelmente devido a um aumento a infecção da espécie *Fusarium*, na sequência da redução da presença de *Microdochium nivale*, um patógeno que, ao contrário de outras espécies de *Fusarium*, está envolvido na sintomatologia da doença, mas que não é capaz de sintetizar DON. Os autores sugerem que a remoção de fungos não produtores de toxina da espiga pode ter o efeito global de alívio da competição e levar ao aumento do estabelecimento de quaisquer agentes patogênicos produtores de toxinas que são menos sensíveis ao fungicida aplicado.

O grupo de pesquisa de Wegulo²¹⁷ também evidenciou aumento nas concentrações de DON em tratamentos com fungicidas do grupo químico estrobilurinas. Porém, não tiveram evidências suficientes para explicar tal fato. O grupo levanta a hipótese de que o fungicida causou um atraso no desenvolvimento da doença, permitindo o desenvolvimento dos grãos, que apresentaram peso superior, e por serem mais pesados ficaram retidos, enquanto aqueles não tratados, ficaram enrugados e leves, sendo expelidos na colheita.

Tal hipótese foi discutida por Spolt e Del Ponte²¹⁸ que explicaram o fato de não haver correlação positiva entre a redução dos níveis da doença a campo com menores valores de micotoxinas avaliadas em estudo realizado pelos mesmos, devido aos grãos giberelados de espigas tratadas com fungicida apresentar peso superior aos grãos giberelados sem tratamento.

A aplicação de fungicidas demonstrou ser eficaz na redução da doença, uma vez que todos os tratamentos apresentaram redução no IG comparado ao tratamento testemunha, que foi estatisticamente superior aos demais tratamentos com fungicidas (Figura 36). Em relação ao índice de giberela e as concentrações de DON, não foi observada correlação significativa (0,44). Ou seja, esse estudo sugere que nos menores índices da doença não estão necessariamente as menores concentrações de DON.

Apesar de vários fungicidas reduzirem a gravidade da doença, contaminação por micotoxinas não está necessariamente relacionada com os sintomas visíveis da doença.²¹⁹ Observações feitas por Tibola et al.⁸ estão em concordância com estes

resultados, onde afirmam que de uma forma geral não há uma correlação consistente entre níveis de grãos danificados por giberela e a concentração de micotoxinas. Segundo Paul et al.²²⁰ a relação entre grãos giberelados e concentração de tricotecenos é complexa e envolve fatores ambientais e agronômicos.

O rendimento de grãos variou de 3996 kg ha⁻¹ a 4809 kg ha⁻¹, ranqueando os tratamentos fungicidas em três grupos homogêneos pelo teste de Scott & Knott (p<0,05). Os tratamentos 2 e 3 foram os únicos incluídos no grupo de rendimento superior. Não foi observada correlação das concentrações de DON com o rendimento (-0,10) (Figura 37). Spolti et al.²¹⁸ observaram que não houve consistência nos resultados de produtividade e redução de micotoxinas, o que pode estar relacionado à complexidade da interação de diversos fatores como o princípio ativo utilizado, o momento e número de aplicações, a tecnologia de aplicação, além da variabilidade da população local de *F. graminearum* e condições ambientais entre o florescimento e a colheita, as quais influenciam nas concentrações de micotoxinas.

Não foi evidenciado associação significativa entre índices de giberela e rendimento, mostrando que não houve uma relação direta entre estas duas variáveis (Figura 38).

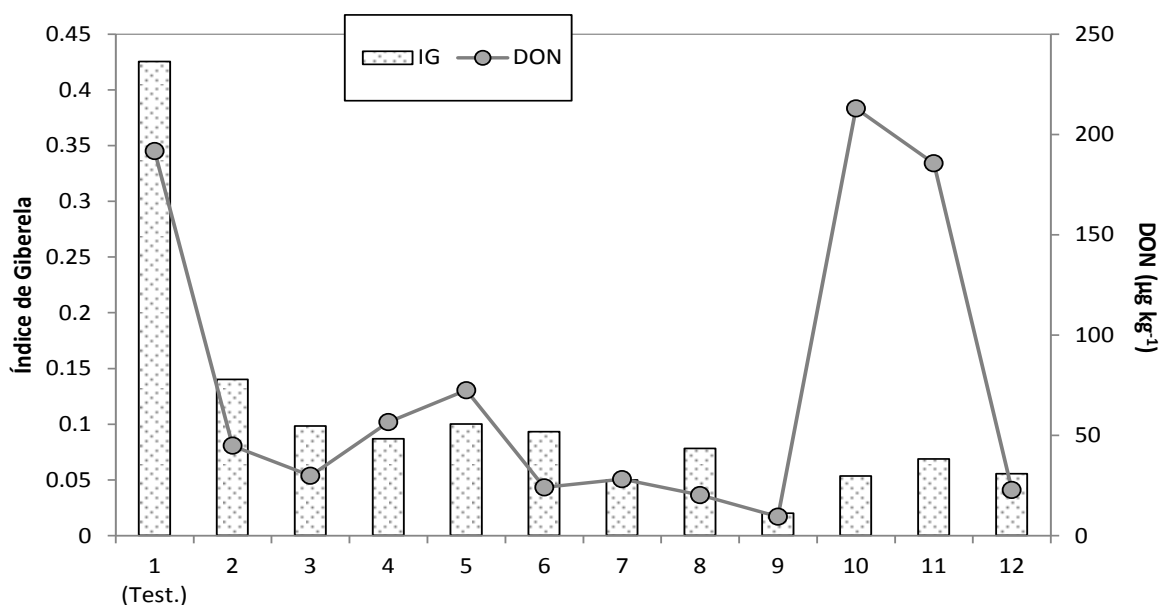


Figura 36. Índice de giberela e concentrações de DON para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada.

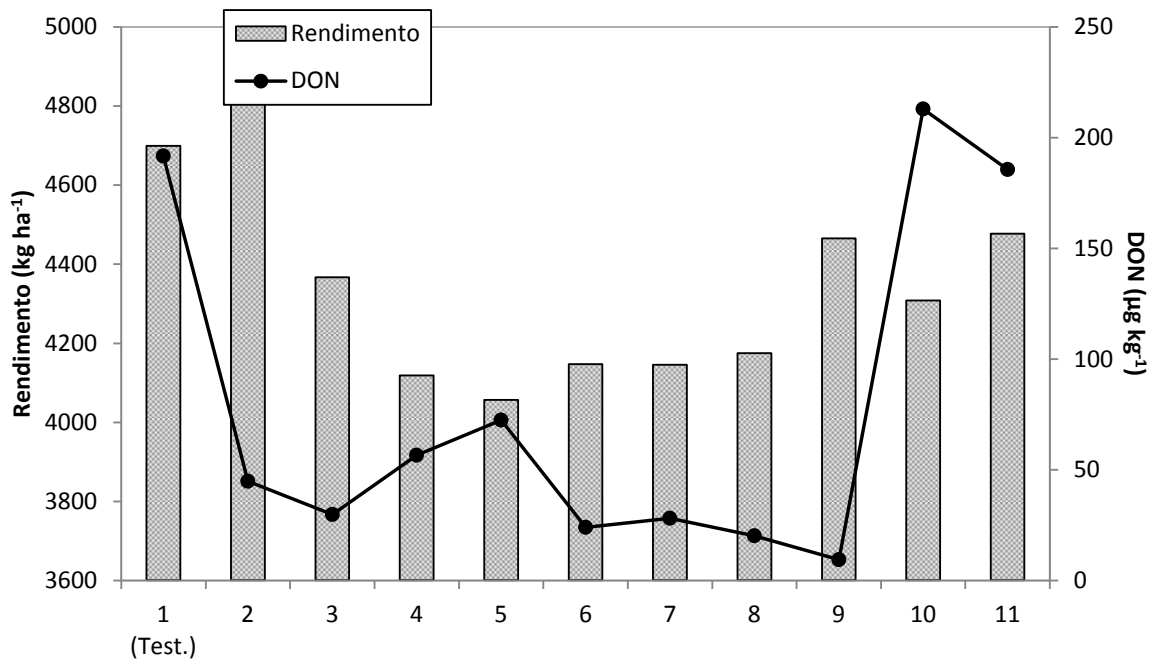


Figura 37. Rendimento de grãos e concentrações de DON para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada.

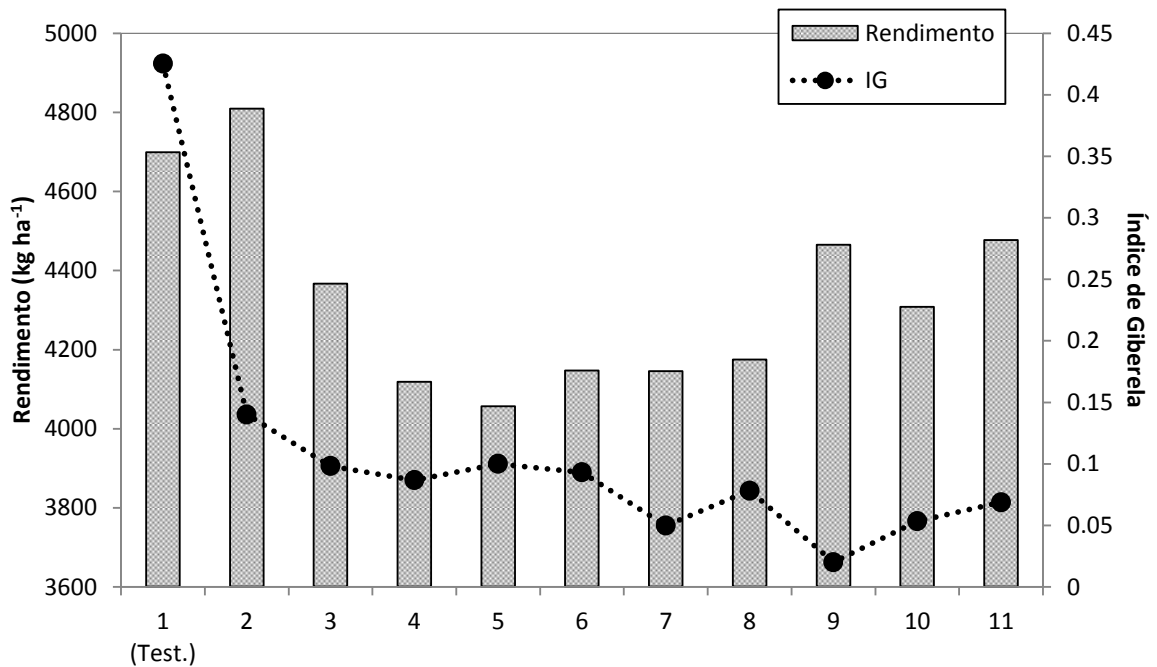


Figura 38. Rendimento de grãos e índice de giberela para cada tratamento fungicida e a testemunha não tratada.

A relação entre giberela e controle de micotoxinas não é consistente e parece ser muito dependente de uma complexa interação de fatores biológicos e ambientais.

Pouco se sabe sobre os fatores complexos (por exemplo, fungicidas, competição de fungos, umidade e fatores nutricionais) que podem influenciar a regulação da biossíntese de micotoxinas em grãos infectados.

5.2.2 Amostras de trigo importado e destinado a exportação

5.2.2.1 Amostras de trigo importado

Contaminação por DON foi evidenciada nas cinco amostras de grãos de trigo importadas da Argentina através do Porto de Bahia Blanca, em concentrações que variaram de 289 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 554 $\mu\text{g kg}^{-1}$, conforme pode ser visualizado na Figura 39 e no Apêndice 8. Estas concentrações são inferiores aos valores máximos estabelecidos pela legislação brasileira que estabelece de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para trigo integral e 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para grãos de trigo para posterior processamento.¹¹⁴

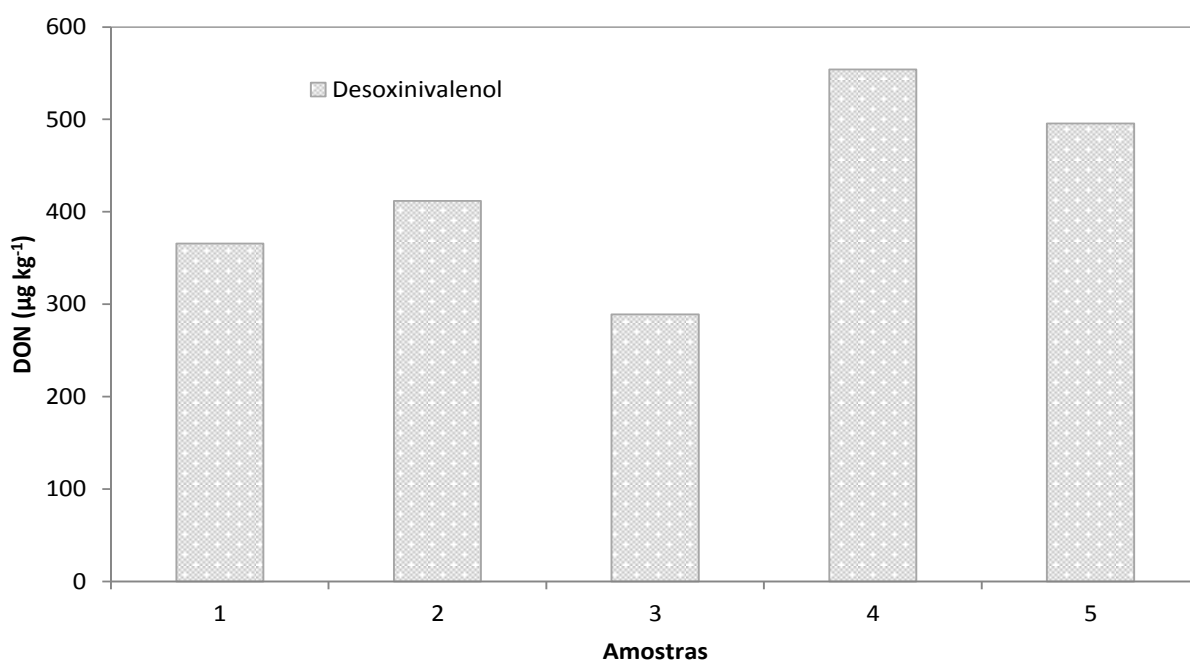


Figura 39. Contaminação por DON em amostras de grãos de trigo, importadas da Argentina através do Porto de Bahia Blanca, coletadas no ano de 2013.

Estudo semelhante realizado por Calori-Domingues⁴¹ indicaram que, do total de amostras avaliadas, 88% das amostras de trigo importado da Argentina e do Uruguai apresentaram-se positivas quanto a presença de DON. A concentração média de DON foi $90 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esses valores são inferiores aos encontrados neste estudo, cuja média foi $423 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Em vários estudos com trigo argentino a presença de micotoxinas tem sido evidenciada, sendo que a presença de DON é a micotoxina prevalente. No estudo de Quiroga e colaboradores,²²¹ de um total de 1056 amostras analisadas, 524 (49,62%) estavam contaminados com tricotecenos e ZEN, sendo que DON foi determinada em 100% das amostras. Além de DON, foi evidenciada contaminação com ZEN (78 amostras), T-2 (20 amostras), HT-2 (18 amostras) e DAS (26 amostras). Tais micotoxinas também foram monitoradas neste estudo, mas somente DON foi determinada. Estudo realizado por Azcarate et al.²²² em 20 amostras de trigo argentino também indicou contaminação de todas as amostras com a micotoxina DON em concentrações que variaram de 58 a $1970 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Outros trabalhos que avaliaram trigo argentino também têm encontrado a micotoxina DON, no entanto com menor frequência que neste trabalho. O grupo de pesquisa de Lori²²³ em avaliação de duas safras agrícolas evidenciaram contaminação por DON em 40 amostras (55%) do total de 147 amostras. Na segunda safra, DON foi determinada em 47 (78,2%) das 60 amostras analisadas. Já em estudo realizado por Roigé e colaboradores²²⁴ constataram que 45% de 56 amostras de trigo estavam contaminados com a micotoxina DON.

DON tem sido detectada em vários outros estudos com trigo argentino. Como no trabalho realizado por Pacin e colaboradores²²⁵ que analisaram 60 amostras de trigo das quais 93,3% estavam contaminadas pela micotoxina DON, com valores mínimo e máximo de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $9250 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Em trabalho realizado por Dalcerro e colaboradores²²⁶ com 40 amostras, também foi evidenciada a contaminação por DON em 80%, em concentrações entre 300 e $4500 \mu\text{g kg}^{-1}$. Outro estudo que relata a presença de DON, foi o de Pinto et al.²²⁷ com 19 amostras de trigo, sendo que 13 estavam contaminadas com DON entre 300 a $7000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Gonzáles et al.²²⁸ também evidenciaram contaminação por DON em concentrações de $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $2788 \mu\text{g kg}^{-1}$ em 85% de 120 amostras.

Em pesquisa mais recente realizada por Cendoya e colaboradores²²⁹ a contaminação com DON esteve presente em 24 das 25 amostras de trigo, e as concentrações variaram de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 15141 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que nove amostras de trigo atingiram valores superiores a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, que é o valor máximo permitido pela legislação brasileira para a concentração de DON em trigo integral.¹¹⁴

Estes estudos mostram a presença de DON em amostras de grãos de trigo argentino. Diferentemente deste estudo, no qual foi evidenciada contaminação por DON em todas as amostras, em alguns casos, não foi detectado a presença de nenhuma micotoxina, de acordo com os autores citados.

5.2.2.2 Amostras de trigo para exportação

Contaminação por micotoxinas foi evidenciado em 100% das amostras de grãos de trigo tipo exportação analisadas (30 amostras), incluindo co-ocorrência de micotoxinas (Figura 40 e Apêndice 9).

Co-ocorrência de micotoxinas foi observada em 97% das amostras de trigo analisadas. Contaminação por duas micotoxinas foi evidenciado em 70% das amostras, enquanto 7% e 20% das amostras apresentaram contaminação por 3 e 4 micotoxinas, respectivamente. Das 12 micotoxinas monitoradas foi encontrada DON em 30 amostras (100%), FB₁ em 8 amostras, FB₂ em 13 amostras, ZEN em 21 amostras e OTA em uma única amostra.

As concentrações da micotoxina DON variaram de 663 a 1743 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com média de 1060 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Das 30 amostras em estudo, 14 apresentaram concentrações superior a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valor máximo permitido pela legislação brasileira a partir de 2017 para grãos de trigo.^{115,116} Das amostras destinadas à exportação, 8 apresentaram concentrações de DON acima o valores máximos tolerados pela legislação da Comunidade Européia (CE),²³⁰ que estabelece concentrações máximas de DON em trigo de 1250 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

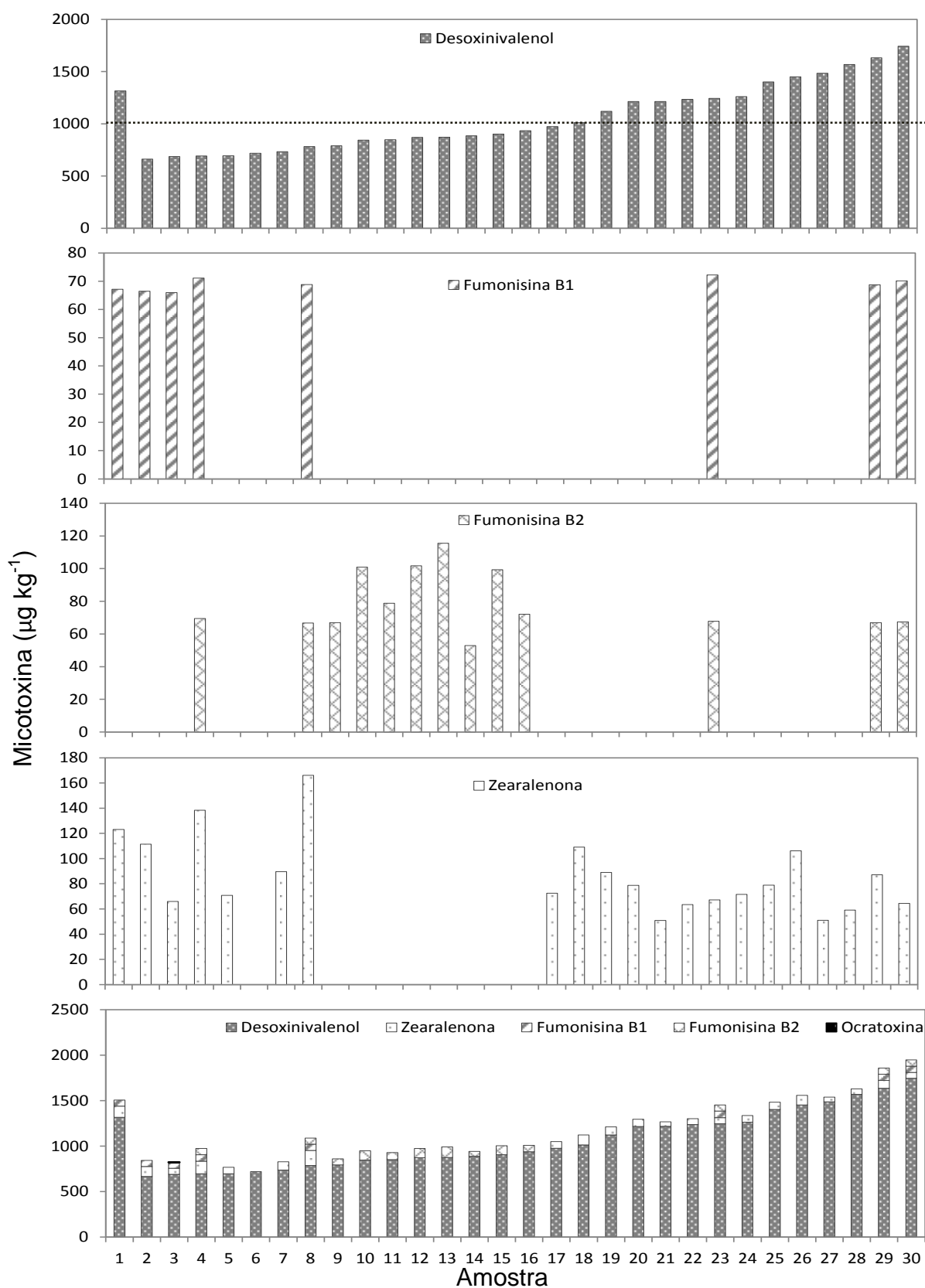


Figura 40. Contaminação por micotoxinas em 30 amostras de trigo para exportação no sul do Brasil.

Zearalenona foi determinada em 21 amostras em concentrações de até 166 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estes valores estão em concordância com a legislação nacional. OTA foi determinada em uma única amostra na concentração de 1,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esta concentração atende as especificações da legislação brasileira, que estabelece como limite máximo tolerado a concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ desta micotoxina em cereais para posterior processamento.

Calori-Domingues et al.⁴¹ detectaram 94% de positividade para DON, com contaminação média 332 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Lamardo et al.²³¹ detectaram DON em 33% das amostras com média de 753 $\mu\text{g kg}^{-1}$, inferior as concentrações de DON determinadas no presente trabalho. Grãos de trigo brasileiro foram avaliados em outros trabalhos desenvolvidos por Santos et al.,²³² Furlong et al.,²³³ Tibola et al.,⁸ Furlong et al.,²³⁴ Santos et al.²³⁵ e Del Ponte et al.²³⁶ Estes trabalhos também evidenciaram a presença de micotoxinas, em que DON foi a micotoxina predominantemente encontrada, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

No entanto, em nenhum destes estudos foi evidenciado a presença de fumonisinas. No presente trabalho estas micotoxinas foram encontradas em 18 das 30 amostras de trigo analisadas. Destas, 8 apresentaram contaminação por FB₁ em concentrações de 66 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 72 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto FB₂ foi detectada em 15 amostras, em concentrações de até 101 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Não há limites máximos estabelecidos na legislação brasileira quanto à presença de fumonisinas em trigo. Em busca na literatura, não foi encontrado nenhum outro relato da detecção e determinação destes compostos em trigo brasileiro, evidenciando ser este o primeiro trabalho a relatar.

Marin et al.²³⁷ concluíram que o motivo para pouca incidência ou ausência de fumonisinas em trigo e cevada possa ser microflora concorrentes (que são bastante diferentes no milho, onde há bastante incidência) e estes podem inibir a síntese das fumonisinas por *Fusarium* isolados, ou podem degradar a micotoxina tão logo que esta é produzida. Além disso, um ou vários componentes nutricionais do trigo poderiam agir como inibidores de biossíntese de fumonisina, ou um componente presente apenas no milho pode ter a capacidade para a iniciação da biossíntese da fumonisina, conforme explicado pelos autores.

Existem relatos, quanto a contaminação natural por fumonisinas em trigo em outras partes do mundo. Nos Estados Unidos, Busman et al.²³⁸ estudaram 43 amostras de trigo. Na maioria das amostras (34), as concentrações das três fumonisinas (FB₁, FB₂ e FB₃) estavam abaixo do limite de quantificação (1 µg kg⁻¹). Três amostras apresentaram concentrações elevadas de fumonisinas (4500 µg kg⁻¹).

No Irã, Chehri et al.²³⁹ avaliaram 84 amostras de trigo, sendo FB₁ foi detectada em 56 amostras, variando 15 a 155 µg kg⁻¹, FB₂ em 35 amostras variando 12 a 86 µg kg⁻¹ e FB₃ em 26 amostras variando 13 a 64 µg kg⁻¹. Na Sérvia, Stanković et al.²⁴⁰ investigaram 103 amostras ao longo de dois anos, que foram todas positivas quanto a presença de micotoxinas. FB₁ foi determinada em 82,1% e 92,0% de todas as amostras com intervalos de 750 µg kg⁻¹ a 5400 µg kg⁻¹ e 750 µg kg⁻¹ a 4900 µg kg⁻¹. A ocorrência simultânea com ZEN e DON também foi relatada pelos autores, se assemelhando a resultados obtidos neste estudo. Porém, as concentrações de fumonisinas foram superiores as aqui determinadas.

A presença de fumonisinas também foi evidenciada em trabalhos realizados na Espanha por Castellá et al.,²⁴¹ na Itália por Cirillo et al.,²⁴² no Japão por Kushiro et al.,²⁴³ na Argentina por Palacios et al.²⁴⁴ Em estudo mais recente, também na Argentina, 93% das amostras avaliadas por Cendoya et al.,²²⁹ apresentaram contaminação por fumonisinas, com níveis variando, de 16 a 680 µg kg⁻¹ em trigo comum e 0,15 a 1304 µg kg⁻¹ em amostras de trigo duro.

Métodos não cromatográficos podem produzir resultados falsos positivos.²⁴⁵ Por este motivo, Palacios et al.²⁴⁴ ressaltam que a descoberta de fumonisinas em trigo e produtos a base de trigo é bastante questionável, o que requer uma avaliação cuidadosa dos métodos analíticos utilizados e uma confirmação por um método apropriado. Destaca-se que durante este estudo, todas as amostras foram realizadas com repetições, utilizando cromatografia hifenada a espectrometria de massas sequencial. Além disto, o método cromatográfico foi validado conforme todas as figuras de mérito, conforme discutido no item 5.1 deste trabalho .

No entanto, mais estudos são necessários para analisar todas as micotoxinas que têm impacto na saúde humana e animal em um grande número de produtos de trigo disponíveis, afim de desenvolver estratégias de gestão adequadas.

5.2.3 Amostras de trigo e seus subprodutos do processo de moagem

A micotoxina DON foi encontrada em 100% das amostras em concentrações de 165 a 990 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Esta micotoxina foi avaliada em grãos antes e após etapa de limpeza. Em alguns casos, foi observado redução da concentração da micotoxina, em outras amostras, as concentrações de DON foram similares antes e após etapa de limpeza (Figura 41 e Apêndice 10). Masson e Cecatto²⁴⁶ obtiveram resultados distintos deste estudo. Os autores observaram redução nas concentrações de DON após a etapa de limpeza.

Nas amostras de grãos limpos, foram avaliados 12 micotoxinas. Além de DON, contaminação por FB₁ (2 amostras), FB₂ (1 amostra) e ZEN (7 amostras) foram constatadas (Figura 42). Após moagem, foram obtidas duas frações, a farinha branca e o farelo, que novamente foram analisadas quanto a presença de 12 micotoxinas, cujos resultados encontram-se na Figura 43 e Tabela 22.

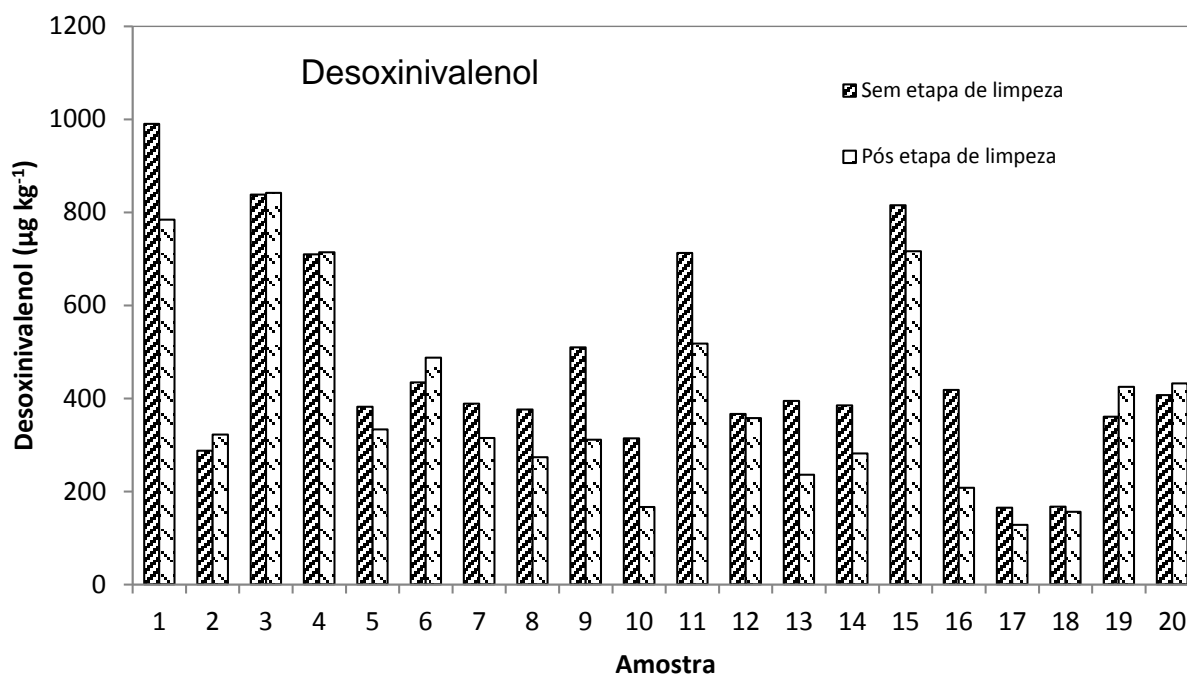


Figura 41. Desoxinivalenol em grãos de trigo antes e após etapa de limpeza e remoção de impurezas.

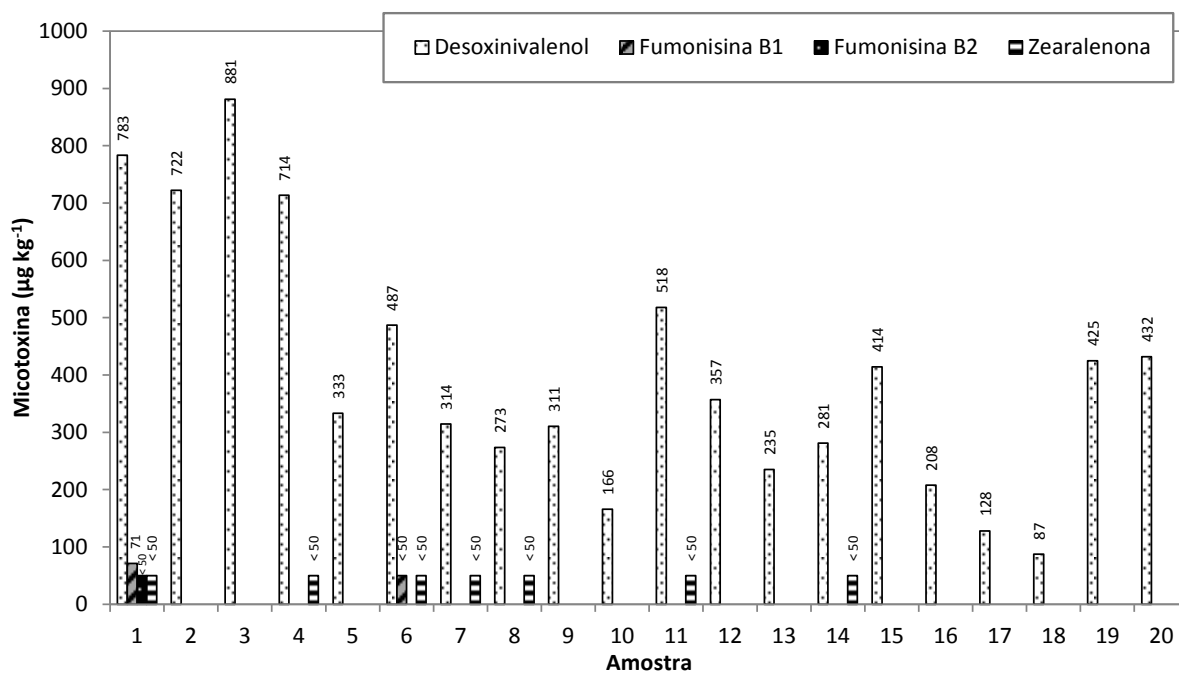


Figura 42. Micotoxinas em grãos de trigo após a etapa de limpeza e antes da moagem.

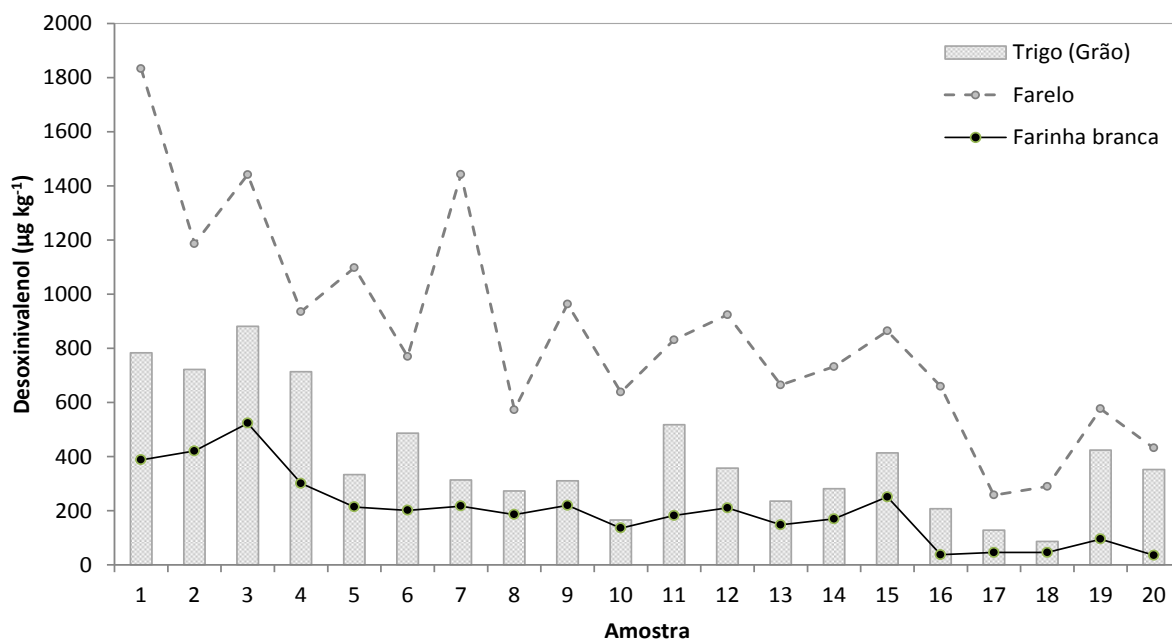


Figura 43. Concentração de DON nas frações obtidas dos grãos de trigo após a moagem: farinha branca e farelo.

Tabela 22. Concentração de micotoxinas determinadas na fração farelo.

	Micotoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	Desoxinivalenol	Fumonisina B ₁	Fumonisina B ₂	Zearalenona
1	1832	<LOQ	<LOQ	n.d.
2	1186	<LOQ	<LOQ	<LOQ
3	1441	<LOQ	<LOQ	<LOQ
4	765	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5	1097	<LOQ	<LOQ	<LOQ
6	769	<LOQ	<LOQ	<LOQ
7	1442	<LOQ	<LOQ	n.d.
8	573	<LOQ	<LOQ	<LOQ
9	963	<LOQ	<LOQ	<LOQ
10	637	<LOQ	<LOQ	<LOQ
11	831	<LOQ	<LOQ	<LOQ
12	923	<LOQ	<LOQ	<LOQ
13	664	<LOQ	<LOQ	n.d.
14	732	<LOQ	<LOQ	<LOQ
15	863	<LOQ	<LOQ	<LOQ
16	659	n.d.	n.d.	n.d.
17	258	<LOQ	n.d.	n.d.
18	289	<LOQ	<LOQ	n.d.
19	576	<LOQ	n.d.	n.d.
20	538	<LOQ	n.d.	n.d.

n.d.= menor que o limite de detecção (não detectado)

<LOQ = menor que o limite de quantificação do método ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$)

Na fração da farinha branca, pode ser notado uma redução nas concentrações de DON. A amostra 20 apresentou redução cerca de 90% da concentração de DON na farinha, comparado ao valor contido no grão ($538 \mu\text{g kg}^{-1}$). Por outro lado, a amostra 10 apresentou menos de 20% de redução na concentração, ou seja, a concentração de DON na farinha foi de 81,6% da concentração da micotoxina no grão (Figura 44).

Na fração farelo, foi observado o oposto. As concentrações de DON foram superiores às aquelas de DON encontradas no grão, variando de 122,5% a 458,7% em comparação com a concentração inicial no grão. Dados semelhantes foram obtidos por Lancova et al.²⁴⁷

Além disto, micotoxinas como as fumonisinas e zearalenona, que não haviam sido determinadas em certas amostras, ou seja, estavam presentes no grão em concentrações abaixo do limite de detecção do método, após o processamento,

passaram a ser detectadas no farelo, demonstrando que ocorre concentração das micotoxinas nesta fração.

Samar e colaboradores²⁴⁸ avaliaram as concentrações de DON em trigo e em suas frações após a moagem. Os autores relatam que concentrações superiores de DON foram encontradas em farelo ($4680 \mu\text{g kg}^{-1}$) em relação ao grão ($1928 \mu\text{g kg}^{-1}$). Já na farinha branca foram determinadas as menores concentrações de contaminação ($994 \mu\text{g kg}^{-1}$).

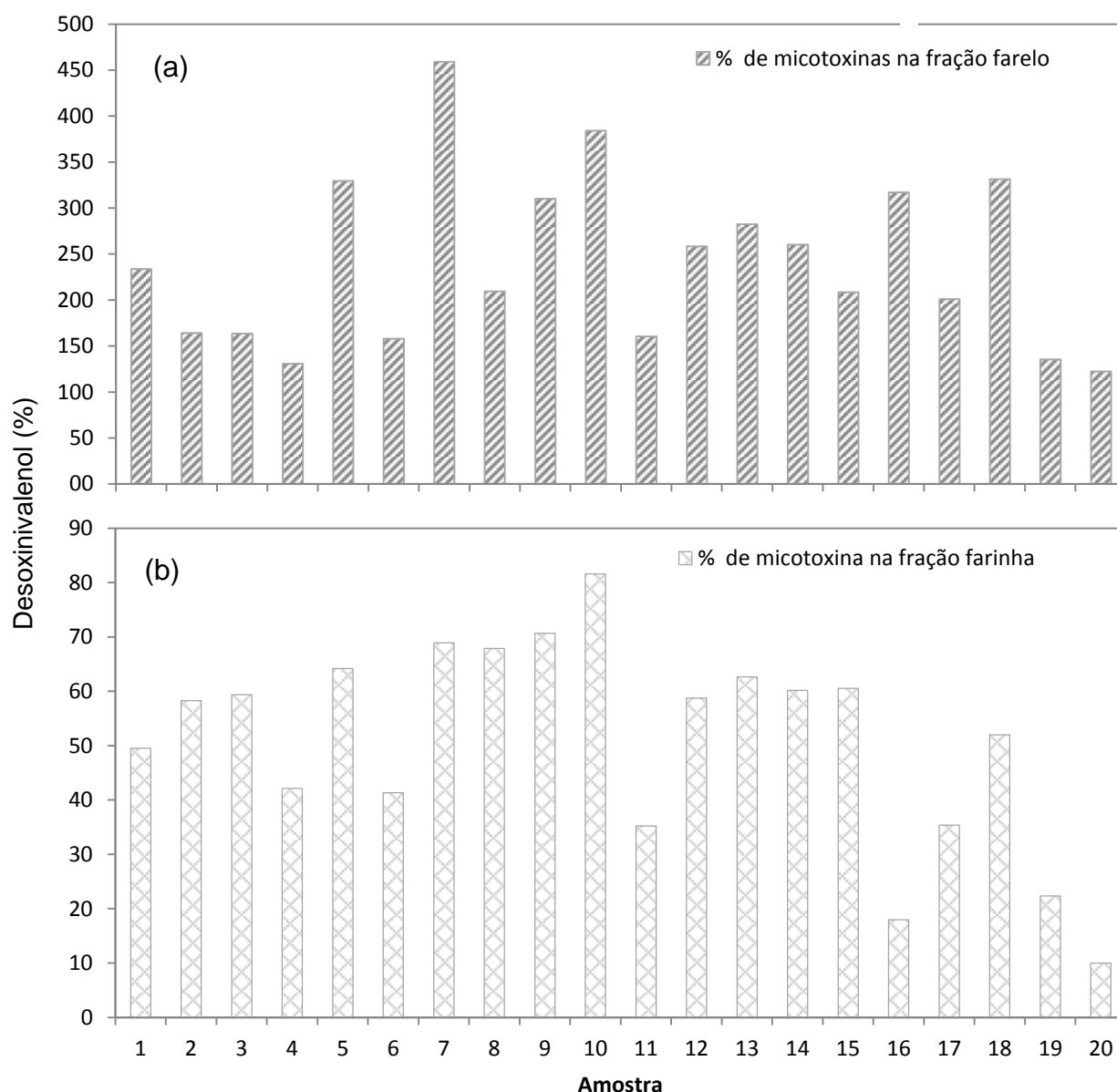


Figura 44. Porcentagem da concentração de DON comparado a contaminação inicial do grão: (a) Na fração farelo; (b) Na fração farinha.

Os resultados obtidos por Thammawong et al.²⁴⁹ indicam que a distribuição de desoxinivalenol e nivalenol em trigo e seus subprodutos da moagem pode ser influenciada pelo nível de contaminação do grão original, sendo que este processo nem sempre é eficaz para a remoção de toxinas a partir de grãos de trigo.

Ríos et al.²⁵⁰ sugerem duas hipóteses que poderiam explicar esta diferença na distribuição de DON. Uma seria devido a friabilidade mais elevada das camadas exteriores das amostras mais contaminadas ou então, devido a uma quantidade mais elevada de toxina no endosperma dos grãos.

No entanto, os fatores que causam a variabilidade na redução das concentrações de micotoxinas não foram completamente determinados.²⁵¹ A alta concentração de micotoxinas no farelo pode indicar a presença de toxinas na parte externa do grão.²⁴⁷ Tecidos periféricos, tais como o pericarpo, são as partes do grão primeiramente colonizadas pelos fungos e, muitas vezes contaminadas por micro-organismos²⁵²

Nowicki e colaboradores²⁵³ afirmaram que a distribuição de DON nas frações de grãos de trigo moído é dependente do grau de penetração fúngica no endosperma do grão e que esta suscetibilidade é dependente da variedade da planta. Os autores verificaram que quando a penetração era baixa, maiores níveis de infecção e DON eram encontrados na superfície do grão e conseqüentemente baixas concentrações de DON na farinha.

Tal como na limpeza, no processo de moagem não existe etapa que degrade as micotoxinas. No entanto, estas toxinas podem ser redistribuídas e concentradas em determinadas frações de moagem.

A moagem reduz a concentração das micotoxinas nas frações utilizadas para consumo humano mas, concentra-se em frações comumente usadas como ração animal. No entanto, estas frações podem representar promissores ingredientes alimentares como fonte de fibras, comumente utilizados em dietas.

5.2.4 Avaliação de farinhas de trigo coletadas em supermercados

Todas as amostras de farinha de trigo, tanto as adquiridas na cidade de Cruz Alta quanto aquelas adquiridas na cidade de Santa Maria apresentaram contaminação por DON e ZEN (Figura 45, Apêndice 11 e Apêndice 12).

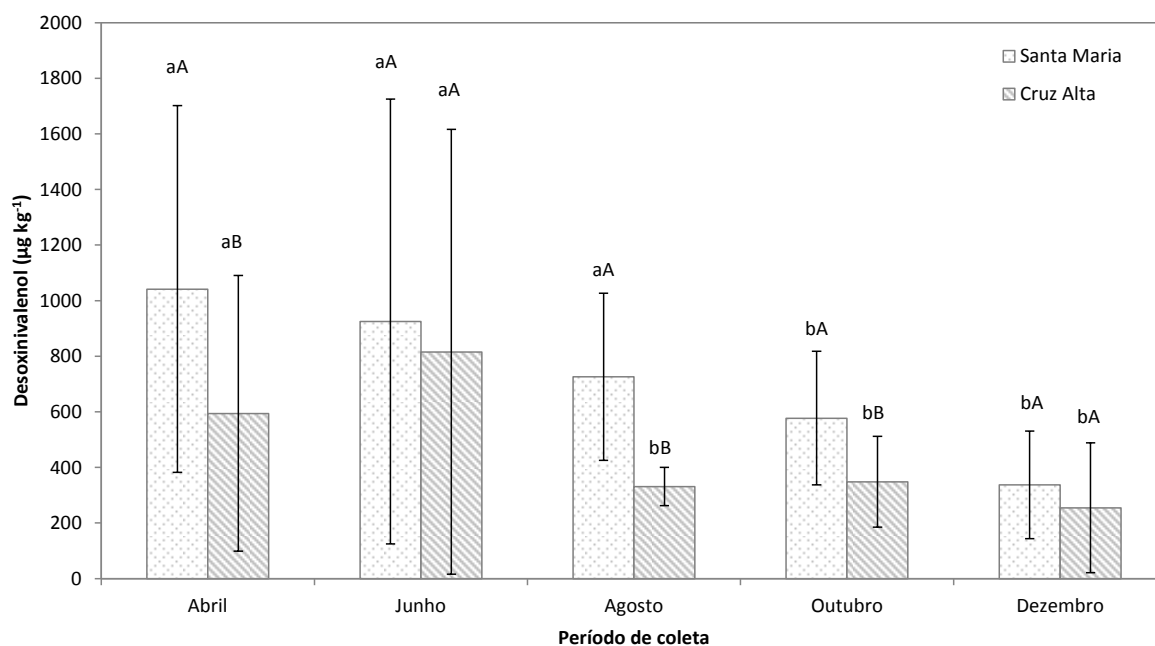


Figura 45. Comparação de médias pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro para presença da micotoxina DON em amostras de farinha de trigo. Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre locais de coleta, enquanto que letras minúsculas indicam diferença estatística entre amostras oriundas do mesmo local. A barra de erro representa o desvio padrão médio da médio entre as repetições.

Concentrações de DON de 53 a 1754 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram encontradas nas amostras coletadas na cidade de Cruz Alta, assim como ZEN foi detectada em todas amostras. Diferença estatística entre as concentrações de DON foi verificada entre os meses de coleta. A média das concentrações de DON foi superior nas amostras coletadas nos meses de abril e junho, formando um grupo homogêneo pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro. As menores concentrações de DON foram evidenciadas nos meses de agosto, outubro e dezembro de 2013, sendo que as médias de concentração não apresentaram diferença estatística. Porém, no mês de agosto houve menor variação nas concentrações da micotoxina DON comparado as concentrações determinadas no mês de dezembro. O mês de agosto, apresentou média de concentração de DON superior aos demais meses (816 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Já, na cidade de Santa Maria, as amostras coletadas apresentaram contaminação por DON que variaram de 134 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 1834 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foi evidenciado diferença estatística para as médias de concentração de DON entre os meses de

coleta. Os meses de abril, junho e agosto formaram o primeiro grupo homogêneo formado pelo teste estatístico Scott Knott. A presença da micotoxina ZEN também foi detectada em todas as amostras de farinha, em concentrações inferiores ao LOQ_m (50 µg kg⁻¹).

Houve diferença estatística nas concentrações de DON entre os locais de coleta. A média das concentrações de DON nas amostras coletadas nos meses de junho e dezembro de 2013 não diferiram estatisticamente entre os locais de coleta. Já, os meses de abril, agosto e outubro, a média das concentrações nas farinhas coletadas na cidade de Cruz Alta, foram estatisticamente inferiores comparadas àquelas coletadas na cidade de Santa Maria. Estas informações podem ser visualizadas mais detalhadamente na Figura 45. A coleta realizada no mês de dezembro de 2013 se caracterizou por apresentar as menores concentrações de DON, tanto nas amostras provenientes da cidade de Cruz Alta quanto naquelas de Santa Maria.

A legislação brasileira prevê que em 2017 as concentrações máximas de DON em farinha de trigo sejam de 750 µg kg⁻¹.^{114,115} Considerando os valores de referência da legislação vigentes no período de desenvolvimento desta pesquisa (1750 µg kg⁻¹ de DON para farinha de trigo), apenas duas amostras não estavam em conformidade com a legislação brasileira. Porém, ao comparar os dados obtidos com os valores estabelecidos para 2017, o número de amostras não conformes aumenta para 8 amostras.

A contaminação por DON depende das condições meteorológicas, da cultivar, da aplicação ou não de fungicidas, do local de cultivo, dentre outros, conforme discutido em tópicos anteriores. A variação destes parâmetros, podem propiciar condições mais ou menos favoráveis à produção de micotoxinas. Consequentemente, podem causar variações nas concentrações de DON a cada lote, a cada safra, o que justifica as diferenças observadas neste estudo entre amostras de farinha, assim como entre as coletas destas.

Um aumento de positividade bem como das concentrações de DON tem sido observado em trigo brasileiro nos últimos anos.^{41,231,254} Em análise realizada por Mallmann et. al.²⁵⁵ em 297 amostras de farinhas de trigo provenientes da região sul, destinadas ao consumo humano, 74 (24,91%) estavam contaminadas com DON, com concentração de 603 µg kg⁻¹ e máximo de 8504 µg kg⁻¹. Baraj e Furlong²⁵⁶

avaliaram 112 amostras de farinha de trigo comercializadas na cidade de Rio Grande (RS) e verificaram que apenas 2 amostras (1,8%) estavam contaminadas com DON em concentrações de 128 e 323 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Já, o estudo de Araújo et al.²⁵⁷ em 78 de amostras de trigo provenientes de fábricas e armazéns de todo Brasil apresentaram contaminação por DON em 27 (34,61%) com concentração média e máxima de 284 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 794 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

O percentual de amostras contaminadas nos estudos citados anteriormente foi menor do que os obtidos neste trabalho, o qual evidenciou contaminação de 100% das amostras. No entanto, além do fato da contaminação por DON ser dependente de diversos fatores, pode-se destacar que em alguns casos, o limite de detecção era de 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON, ou seja, quatro vezes maior que o limite de detecção do método empregado neste estudo. Isto ressalta a necessidade da utilização de métodos analíticos com maior detectabilidade e confiança.

5.2.5 Amostras de milho para exportação

A co-ocorrência de micotoxinas afeta a toxicidade dos grãos contaminados resultando em efeitos sinérgicos. Figueira et al.²⁵⁸ ressaltam que a incidência de micotoxinas em milho, tanto no Brasil como em outras partes do mundo, costuma ser alta e variada, pois este é um produto muito suscetível à contaminação fúngica.

Co-ocorrência de micotoxinas foi evidenciada. DON, ZEN, FB₁ e FB₂ e AFLA B₁ foram encontradas nas amostras de milho analisadas (Figura 46 e Apêndice 13). Do total de 30 amostras avaliadas neste estudo, em 21 amostras DON foi detectada em concentrações inferiores ao LOQ_m (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) enquanto nas outras 9 amostras, a média da concentração DON foi de 92 $\mu\text{g kg}^{-1}$. ZEN foi detectada em concentrações inferiores ao LOQ_m (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e fumonisinas em valores que variaram de 142 a 1468 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para FB₁ e 84 a 878 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para FB₂. Estes valores são inferiores aos estabelecidos pela legislação brasileira quanto a presença de DON, ZEN e fumonisinas em milho.

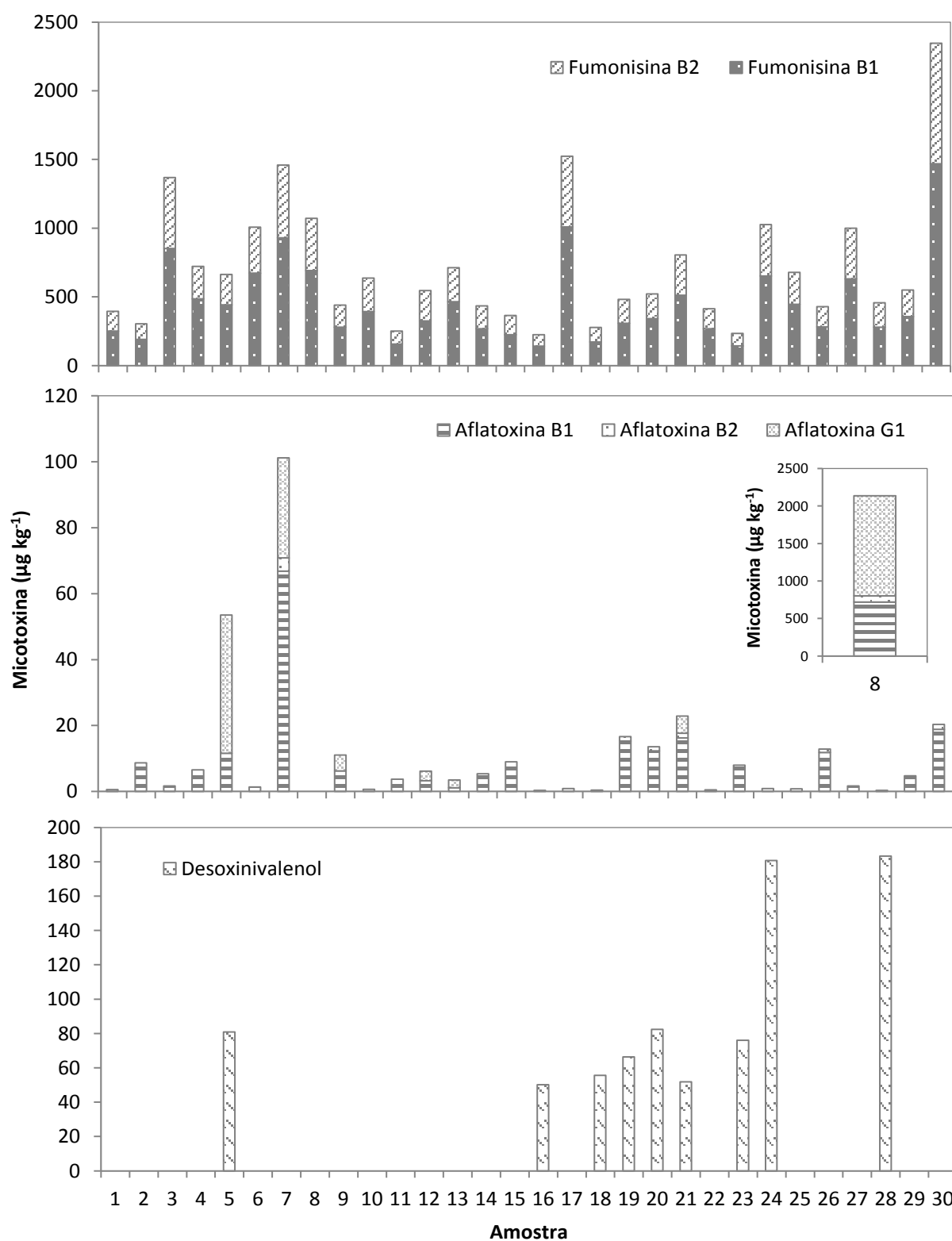


Figura 46. Ocorrência de micotoxinas em amostras de grãos de milho destinadas à exportação, coletadas no ano de 2013.

AFLA B₁ foi detectada em todas as amostras de grãos de milho, em concentrações de até 722 µg kg⁻¹. AFLA B₂ foi detectada em 9 amostras em concentrações de até 82 µg kg⁻¹ e AFLA G₁ em 7 amostras variando de concentrações de 2,4 a 1334 µg kg⁻¹ (Apêndice 13). Em 5 amostras, a soma das concentrações de aflatoxinas foi superior aos valores estabelecidos pela legislação brasileira (20 µg kg⁻¹ para milho em grãos), sendo elas: amostra 5 (54 µg kg⁻¹), amostra 8 (2137 µg kg⁻¹), amostra 21 (23 µg kg⁻¹) e amostra 30 (20 µg kg⁻¹). A amostra 8 apresentou valores cerca de 100 vezes maiores que aquelas permitidas quanto a presença de aflatoxinas em grãos de milho.

De acordo com IARC⁷¹, existe evidência suficiente de que a mistura de todas as aflatoxinas produzidas naturalmente (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) é carcinogênica para os seres humanos. A co-ocorrência de DON e aflatoxina pode aumentar a carcinogenicidade da aflatoxina, apesar de DON não apresentar risco à indução de câncer. Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer em seres humanos estejam diretamente relacionados à dieta, e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente em países tropicais.²⁵⁹

A ocorrência de micotoxinas em milho e produtos a base de milho no Brasil tem sido reportada por vários autores, principalmente em se tratando de aflatoxinas e fumonisinas.²⁵⁹⁻²⁶⁴ Comparado com outros grãos, a contaminação por fumonisinas em milho não é apenas mais frequente, como também apresenta esta toxina em maiores concentrações.²⁶⁵⁻²⁶⁷ Tal afirmação corrobora com os dados obtidos neste estudo, em que foi determinada a presença de fumonisinas em todas as amostras de milho, em concentrações que variaram de 142 a 1568 µg kg⁻¹ para FB₁ e 83 a 878 µg kg⁻¹ para FB₂. A legislação brasileira estabelece o limite máximo tolerável de 5000 µg kg⁻¹ de fumonisinas em grãos de milho para posterior processamento. Desta forma, todas as amostras de grãos de milho avaliadas estão em conformidade quanto a presença de fumonisinas.

A pesquisa de Kawashima et al.²⁶⁴ também evidencia a alta incidência de fumonisinas e aflatoxinas. Os autores evidenciaram FB₁ em 94,6% das amostras em concentrações variando de 20 a 8600 µg kg⁻¹. Co-ocorrência com AFLA B₁ em concentração máxima de 20 µg kg⁻¹. Caldas e Silva²⁶⁸ também evidenciaram

contaminação por FB₁ e FB₂ em 80,7 e 71,6% de 208 amostras avaliadas, respectivamente.

Aflatoxinas foram determinadas no estudo de Machinski et al.,²⁶³ cujas concentrações encontradas variaram de 6 a 1600 µg kg⁻¹. Assim no presente estudo, amostras de milho excederam os limites máximos tolerados pela legislação brasileira para a cultura (20 µg kg⁻¹). No mesmo estudo, os autores determinaram OTA em 2 amostras (206 e 128 µg kg⁻¹) e zearalenona em uma amostra (4640 µg kg⁻¹). Neste trabalho estas micotoxinas também foram monitoradas, mas não foram detectadas em nenhuma das amostras em estudo.

A presença de fumonisinas em amostras de milho também têm sido relatada em inúmeros trabalhos, como nos desenvolvidos por Yamagushi et al.²⁶⁹ em amostras do Paraná, Hirooka et al.²⁷⁰ em amostras oriundas de Goiás, Paraná e Mato Grosso do Sul, Orsi et al.²⁷¹ em amostras de São Paulo, Mallmann et al.²⁷² em amostras no Rio Grande do Sul. Estes trabalhos determinaram fumonisinas em concentrações superiores aos estabelecidos pela legislação brasileira para esta micotoxina em grão de milho, sendo encontrada concentrações de 12600 µg kg⁻¹ de FB₁ e 10400 µg kg⁻¹ de FB₂, como relatados por Yamagushi e colaboradores.²⁶⁹ Esses valores são superiores ao dobro da concentração máxima tolerada pela legislação brasileira.

Aflatoxinas também têm sido determinadas com frequência em amostras de milho oriundas diversas regiões do Brasil, assim como de países vizinhos, como nos estudos realizados por Caldas et al.²⁵⁹ em amostras no Distrito Federal, Farias et al.²⁷³ em amostras do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Argentina e Paraguai, Hennigen e Dick²⁷⁴ em amostras do Rio Grande do Sul, Ramos et al.²⁷⁵ em amostras de Goiás, Salay e Mercadante²⁷⁶ em amostras do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás. Concentrações de aflatoxinas na ordem de 50 vezes superiores aos estabelecidos pela legislação brasileira (906 µg kg⁻¹) foram relatados por Hennigen e Dick.²⁷⁴

A micotoxina DON, assim como relatada neste trabalho, foi evidenciada no estudo realizado por Prado et al.,²⁷⁷ onde cerca de 6% de milho apresentou contaminação variando de 102 a 542 µg kg⁻¹. Esses valores são superiores aos aqui reportados.

5.2.6 Amostras destinadas à ração animal

Co-ocorrência de micotoxinas foram evidenciadas em todas as amostras de grãos de milho (Figura 47 e Apêndice 14) e de quirera de milho (Figura 48 e Apêndice 17).

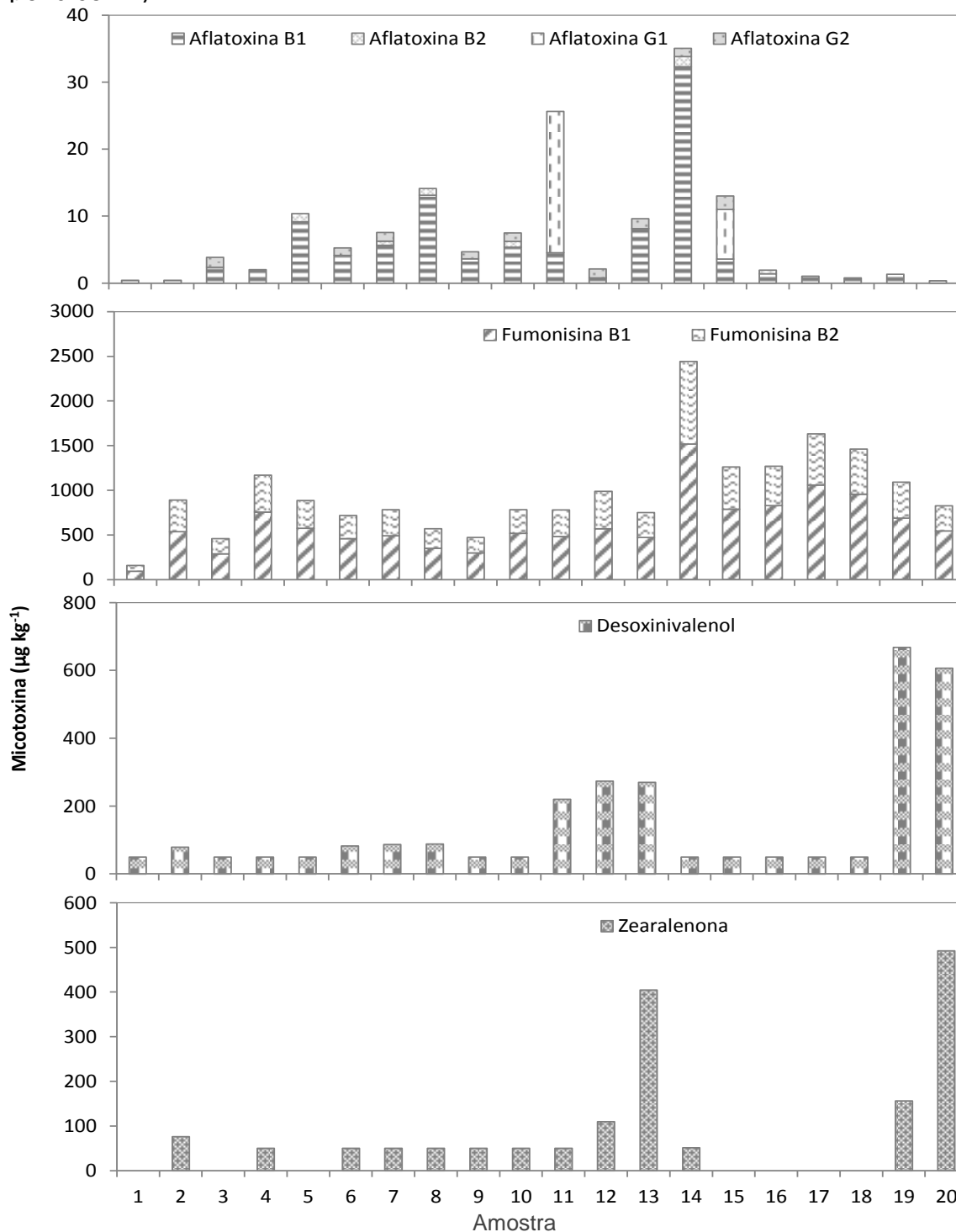


Figura 47. Concentração de micotoxinas presentes em amostras de grãos de milho utilizadas como matéria prima para fabricação de ração animal.

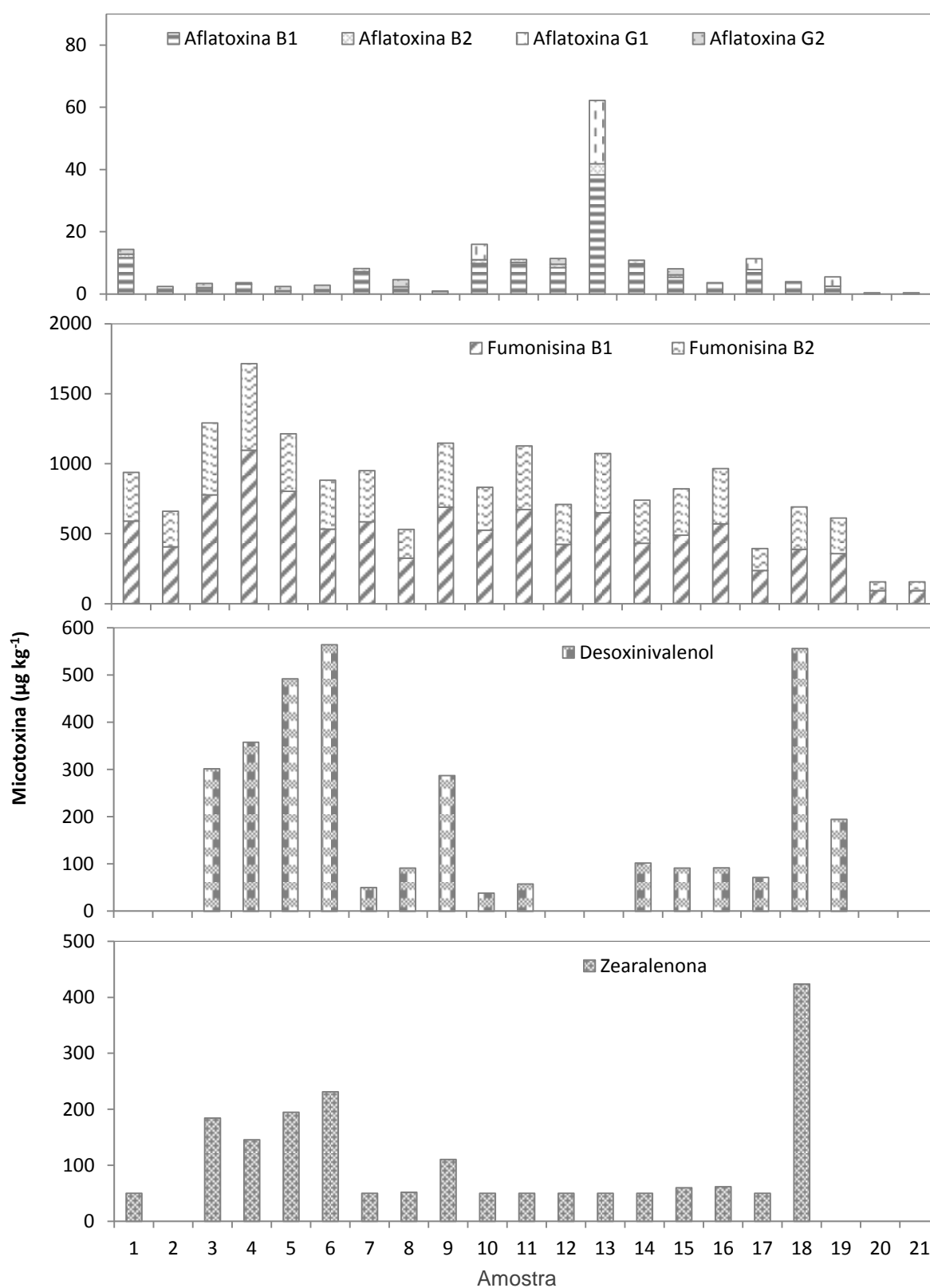


Figura 48. Concentração de micotoxinas presentes em amostras de quirera de milho utilizadas como matéria prima para fabricação de ração animal.

Foram determinadas aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) e fumonisinas (B_1+B_2) em todas as amostras de grãos e quirera de milho. DON foi determinada em 100% das amostras de grãos de milho e em 75% das amostras de quirera de milho, enquanto ZEN foi determinada em 65% e 85% de amostras de grão e quirera de milho, respectivamente.

Em grãos de milho destinados à ração animal, as concentrações de FB_1 variaram entre 92 e 1517 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com concentração média de 612 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As concentrações de FB_2 variaram de 64 a 927 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com concentração média de 356 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nas amostras de quirera de milho as concentrações encontradas de FB_1 variaram de 92 a 1096 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com concentração média de 510 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de FB_2 64 a 619 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com concentração média de 327 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Todos estes valores são inferiores aos estabelecidos pela legislação brasileira quanto à presença de fumonisinas em grãos de milho para posterior processamento.

Conforme relatado por Soriano e Dragacci,²⁷⁸ Silva et al.,²⁶⁶ e Rodriguez-Amaya e Sabino,²⁷⁹ a distribuição de fumonisinas é generalizada. Em comparação com outros grãos, a contaminação do milho por fumonisinas não é só a mais frequente, mas também apresentam as maiores concentrações de toxina. Geralmente as concentrações de FB_1 são superiores às concentrações FB_2 e FB_3 . As concentrações de fumonisinas determinadas no estudo estão em acordo com tal afirmação.

Os resultados obtidos nesta pesquisa com relação a frequência e faixa de contaminações de FB_1 e FB_2 em milho, são comparáveis aos estudos realizados por Moreno et al.²⁸⁰ com amostras de milho no Brasil, no qual os autores evidenciaram contaminação por fumonisinas em 100% das amostras oriundas da safra de 2003 e em 98,9% das amostras da safra de 2004. Sydenham et al.²⁸¹ relataram uma incidência de fumonisinas em vários produtos a base de milho nos EUA, na África do Sul, em Gana, na Argentina e em Honduras.

Aflatoxinas foram determinadas em todas as amostras de grãos e quirera de milho neste estudo. Em grãos de milho, contaminação por AFLA B_1 , AFLA B_2 , AFLA G_1 e AFLA G_2 foram determinadas respectivamente em 100%, 30%, 10% e 45% das amostras analisadas. Em amostras de quirera de milho, a contaminação por AFLA B_1 , AFLA B_2 , AFLA G_1 e AFLA G_2 foram verificadas em 100%, 45%, 20% e 35% das amostras, respectivamente.

Duas amostras de grãos e uma amostra de quirera de milho excederam os limites máximos estabelecidos pela ANVISA, apresentando concentrações totais de aflatoxinas ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) de 26; 35 e 62 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente.

Sassahara et al.²⁸² também avaliaram a presença de aflatoxinas em 272 amostras a base de milho destinadas a nutrição animal coletadas no Paraná. Destas, 17 amostras apresentaram contaminação por aflatoxina, sendo que destas, 8 amostras estavam em concentrações acima dos limites permitidos pela legislação brasileira.

Resultados de Santurio²⁸³ no Rio Grande do Sul, com cerca de 15600 amostras de alimentos destinados principalmente ao consumo animal, evidenciaram contaminação por aflatoxinas em 41,9% das amostras de milho e em 36,9% das amostras de ração destinadas ao consumo animal.

A ingestão de rações contaminadas com AFLA B_1 e AFLA B_2 por mamíferos, pode ocasionar o aparecimento no leite de metabólitos hidroxilados e também tóxicos, a aflatoxina M_1 e a aflatoxina M_2 (micotoxinas do leite).²⁸⁴ Assim, quando o gado leiteiro consome ração contaminada com aflatoxinas precursoras, há degradação parcial destas no rúmem e o animal pode se intoxicar ou transmitir as micotoxinas através do leite.²⁸⁵⁻²⁸⁷

O presente estudo também avaliou a presença de outras toxinas de *Fusarium*, em que DON foi encontrada em todas as amostras de grãos de milho em concentrações de até 668 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e em 65% das amostras de quirera de milho em concentrações de até 564 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Tais concentrações de DON não excederam os limites máximos estabelecidos pela ANVISA.

A presença de ZEN foi evidenciada em 55% das amostras de milho com concentração máxima de 493 $\mu\text{g kg}^{-1}$, assim como em 65% das amostras de quirera de milho com concentração máxima de 424 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores estabelecidos pela legislação brasileira quanto a presença da micotoxina ZEN ainda não estão em vigor.¹¹⁵ Porém, duas amostras de grãos de milho (405 e 495 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e uma amostra de quirera de milho (424 $\mu\text{g kg}^{-1}$) apresentaram valores superiores ao qual a legislação brasileira restringirá, que é de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para grãos de milho para posterior processamento.

Souza et al.²⁸⁸ avaliaram 119 amostras de milho e ração animal quanto a ocorrência de micotoxinas, dentre as quais, destaca-se os analitos que também

foram monitorados e detectados neste estudo: aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), fumonisinas (B₁ e B₂), ZEN e DON. A maioria das amostras, assim como no presente trabalho, apresentaram contaminação com mais do que uma micotoxina, sendo que todas as amostras apresentaram contaminação com fumonisinas. Ono et al.²⁸⁹ também evidenciaram a co-ocorrência natural de fumonisinas e aflatoxinas em 150 amostras de grãos de milho do Paraná.

Scudamore et al.²⁹⁰ em estudo com 330 amostras de ingredientes para rações, onde o milho apresentou maior co-ocorrência de micotoxinas, semelhante aos dados obtidos neste estudo. Concomitância de micotoxinas foi relatada no estudo de Vargas et al.²⁹¹ em 214 amostras de milho de diferentes regiões do Brasil. O autor reporta a ocorrência de AFLA B₁, ZEN e FB₁ em 38,3%, 30,4% e 99,1% das amostras, respectivamente.

Outros estudos também relataram a co-ocorrência de micotoxinas em produtos destinados a alimentação animal, como relatados por Labuda et al.,²⁹² Griessler et al.,²⁹³ Almeida et al.,²⁹⁴ Driehuis et al.,²⁹⁵ Monbaliu et al.,²⁹⁶ Scudamore et al.²⁹⁷ e Rafai et al.²⁹⁸ A frequente co-ocorrência de micotoxinas reforça a importância da realização de monitoramentos utilizando métodos multimicotoxinas.

5.2.7 Amostras de farinhas de milho coletadas em supermercados

Co-ocorrência por micotoxinas foi evidenciada tanto nas amostras de farinha de milho coletadas na cidade de Cruz Alta (Figura 49 e Apêndice 16) quanto aquelas coletadas na cidade de Santa Maria (Figura 50 e Apêndice 17). DON, ZEN, FB₁, FB₂ foram encontradas em amostras de ambos os locais, enquanto contaminação por AFLA B₁ foi encontrada somente em amostras coletadas na cidade de Santa Maria.

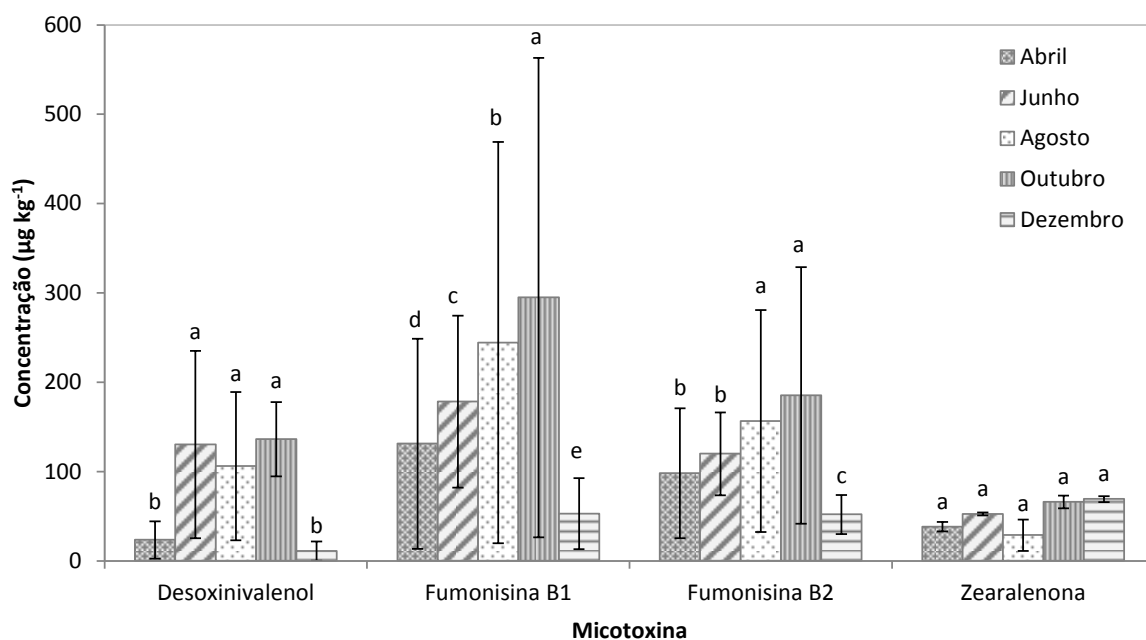


Figura 49. Co-ocorrência de micotoxinas em amostras de farinha de milho coletadas na cidade de Cruz Alta – RS. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os meses de coleta para ocorrência de determinada micotoxina. A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as coletas realizadas no mês.

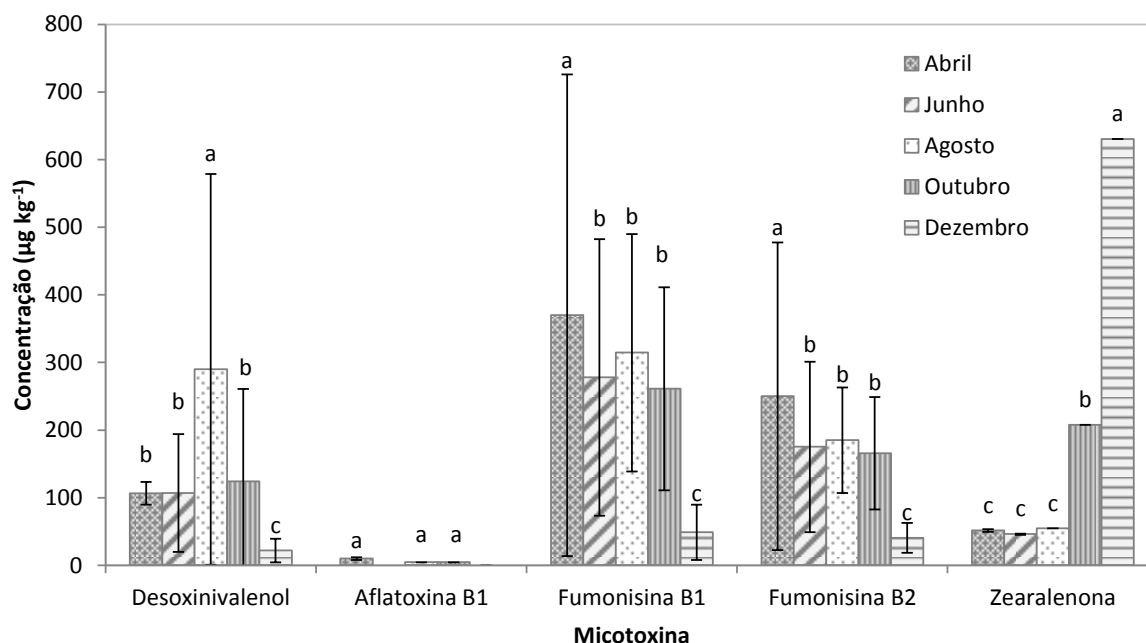


Figura 50. Co-ocorrência de micotoxinas em amostras de farinha de milho coletadas na cidade de Santa Maria – RS. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os meses de coleta para ocorrência de determinada micotoxina. A barra de erro representa o desvio padrão médio da média entre as coletas realizadas no mês.

Fumonisinias foram evidenciadas em todas as amostras. Diferença estatística entre as concentrações de fumonisinias nas diferentes coletas foi observada. Concentrações significativamente diferentes de micotoxina FB₁ durante todos os meses de coleta foram observados para as amostras coletadas na cidade de Cruz Alta. A média das concentrações de fumonisinias foram significativamente inferiores nas amostras coletadas no mês de dezembro em ambas as cidades em estudo. Os maiores valores foram encontrados no mês de outubro na cidade de Cruz Alta e em Santa Maria no mês de abril.

Nas amostras provenientes da cidade de Cruz Alta, a concentração máxima determinada de FB₁+ FB₂ foi de 1245,6 µg kg⁻¹. Valores superiores a estes foram determinados nas amostras coletadas na cidade de Santa Maria, com concentrações de até 2047 µg kg⁻¹ de FB₁+ FB₂. A legislação brasileira, estabelece concentrações máximas de fumonisinias de até 1500 µg kg⁻¹. Estes valores entrarão em vigor somente a partir de 2017. Desta forma, apenas uma amostra coletada na cidade de Santa Maria não estaria em conformidade com este valor.

A micotoxina DON foi detectada em 52% das amostras coletadas na cidade de Santa Maria e em 60% daquelas coletadas na cidade de Cruz alta, em concentrações de até de 534 µg kg⁻¹ (Santa Maria) e 298 µg kg⁻¹ (Cruz Alta).

ZEN foi determinada em 38% das amostras coletadas em Santa Maria em concentrações de até 630 µg kg⁻¹ Já na cidade de Cruz Alta, 36% das amostras apresentaram contaminação pela micotoxina ZEN e os valores determinados foram de até 72 µg kg⁻¹. Em 2017 entrará em vigor o valor máximo tolerado para produtos e subprodutos à base de milho, que será de 150 µg kg⁻¹. Considerando estes valores, duas amostras coletadas na cidade de Santa Maria apresentaram valores superiores a estes (208 e 630 µg kg⁻¹), enquanto as amostras coletadas na cidade de Cruz Alta se apresentaram em conformidade com tal legislação quanto a presença de ZEN.

A presença de aflatoxinas foi determinada em três amostras coletadas na cidade de Santa Maria, com valor médio de 1,4 µg kg⁻¹. O valor máximo permitido pela legislação brasileira para aflatoxinas e farinhas de milho é de 20 µg kg⁻¹. Portanto, tais amostras estão em conformidade com a legislação em vigor.

Pesquisa em 74 amostras de produtos a base de milho adquiridas no comércio da cidade de Recife-PE, durante o período de 1999 a 2001, encontrou

contaminação por FB₁ em 71 das 74 amostras analisadas em concentrações, variando de 20 a 8600 µg kg⁻¹.²⁶⁴ Em levantamento realizado na cidade de Campinas – SP²⁹⁹ e São Paulo - SP³⁰⁰ os níveis de FB₁ encontrados também foram elevados. Os valores reportados foram de 2290 µg kg⁻¹ e 5200 µg kg⁻¹, respectivamente.

Estudo no Paraná, conduzido por Almeida-Ferreira et. al.³⁰¹, foram coletadas amostras comerciais de milho (*gritz*), trigo e pipoca, entre 2007 e 2008, sendo que foi observado contaminação por ZEN apenas em amostras de *gritz* de milho (64 µg kg⁻¹). Resultado similar quanto as concentrações de ZEN foi encontrado na Bulgária por Manova e Mladenova.³⁰² No mesmo estudo, os autores relataram contaminação por fumonisinas em 94,7% das amostras de milho analisadas.

Tendo como objetivo conhecer o grau de contaminação de alimentos consumidos pela população de Pirassununga e São Paulo, Bordin et al.³⁰³ coletaram nas casas de moradores, 120 amostras de farinha de milho e produtos derivados. FB₁ foi encontrada em amostras de farinha de milho em uma concentração média de 475 µg kg⁻¹. Essa concentração é semelhante a relatada neste estudo, e também está em conformidade com as normas que entrarão em vigência a partir de 2017.

Outros estudos obtiveram resultados semelhantes. O grupo de Rocha,³⁰⁴ pesquisou a contaminação por fumonisinas e aflatoxinas em amostras de milho oriundas de 4 regiões brasileiras. A contaminação com FB₁ foi observado em 98% da amostras de milho recém colhidas (196 amostras) e contaminação com FB₁ + FB₂ em 74,5% (149 amostras). Das amostras oriundas do Rio Grande do Sul, 100% destas apresentaram contaminação por FB₁.

Ferreira et al.³⁰⁵ analisaram produtos de milho consumidos em Minas Gerais verificaram que todas as marcas de fubá analisadas apresentaram contaminação, com valores que variaram entre 0,04 µg kg⁻¹ e 1,6 µg kg⁻¹ para aflatoxinas e entre 55 e 985 µg kg⁻¹ para fumonisinas. Estes valores são próximos aos valores encontrados neste estudo.

Machinsky e Soares³⁰⁶ avaliaram 81 alimentos à base de milho comercializados na cidade de Campinas, SP, e detectaram contaminação com as FB₁ em 40 e FB₂ em 44 amostras. Por outro lado, Scaff e Scussel³⁰⁷ analisaram a incidência de FB₁ e FB₂ em farinha de milho, em milho de pipoca e em canjica,

comercializados em Santa Catarina, e verificaram fumonisinas 92,68% das amostras analisadas. Em estudo mais recente (2014), Peluque et al.³⁰⁸ analisaram 104 amostras de misturas de cereais. Oitenta e oito amostras (83,8%) estavam contaminadas com FB₁.

No que tange à presença de tricotecenos, Milanez et al.³⁰⁹ avaliaram 78 amostras e evidenciaram traços de DON em uma amostra. No presente estudo tal micotoxina foi detectada em praticamente metade das amostras analisadas em concentrações inferiores ao permitido pela legislação.

Segundo Cruz³¹⁰, os produtos de milho como a farinha, são obtidos a partir do processo de moagem do milho a seco, no qual o endosperma, o pericarpo e o gérmen do milho são separados por meio mecanizado e o pericarpo se transforma em um resíduo farináceo, utilizado principalmente para alimentação animal. O pericarpo é a parte mais externa do grão e, por possuir estrutura mais rígida, constitui barreira física contra a entrada de fungos no endosperma, podendo contribuir para redução das concentrações de micotoxinas nos produtos processados em relação aos grãos inteiros. Essa pode ser uma possível explicação para as baixas concentrações das micotoxinas detectadas nos produtos analisados no presente trabalho. Corroborando com esse argumento, Scudamore e Patel³¹¹ observaram que uma limpeza inicial das amostras de milho realizada após moagem dos grãos permitiu redução de 40% na concentração de aflatoxinas e de 32% de fumonisinas em relação aos valores iniciais observados nessas mesmas amostras.

6 CONCLUSÃO

É de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para determinação de contaminantes naturais em alimentos, como a determinação de micotoxinas em milho e trigo provenientes de vários pontos da cadeia produtiva.

Neste trabalho foi validado *in house* um método analítico multirresidual para determinação de 12 micotoxinas em matrizes de milho e trigo. Todas as figuras de mérito avaliadas durante a validação do método (linearidade, curva analítica, efeito matriz, limites de detecção e de quantificação, e estudos de exatidão e precisão) apresentaram valores dentro dos limites desejáveis, em concordância com os órgãos governamentais que regulamentam métodos para análise de contaminantes.

No método validado para a matriz trigo, as 12 micotoxinas em estudo apresentaram coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,98 e destas, 10 apresentaram coeficiente de determinação maior que 0,99. A Toxina T-2 não apresentou sinal analítico nas concentrações de 5 a 50 ng mL⁻¹ quando em extrato de trigo e por este motivo foi adicionada ao método para *screening* das amostras. Já para a matriz milho, todos os coeficientes de determinação obtidos para as 12 micotoxinas em estudo foram superiores a 0,99.

Considerando o efeito matriz, 50% das micotoxinas estudadas para a matriz trigo apresentaram valores de efeito matriz situados na faixa entre +20% e -20%. Já para a matriz milho, 83,4% das micotoxinas em estudo apresentaram valores de efeito matriz situados nesta faixa. O efeito matriz pronunciado para alguns analitos foi compensado pela calibração por superposição da matriz.

Os limites de quantificação para todas as micotoxinas estudadas atendem tanto aos limites estabelecidos pela legislação brasileira, bem como àqueles estabelecidos pela União Europeia para as matrizes em estudo. Para as micotoxinas Toxina T-2, Toxina HT-2 e DAS não há legislação vigente no Brasil. Porém, estas foram incluídas no escopo dos métodos validados devido a sua alta toxicidade.

Os valores de RSD%, para todas as micotoxinas estudadas, situaram-se dentro da faixa aceitável ($\leq 20\%$) para a matriz milho e para 11 das micotoxinas em estudo para trigo. Isso demonstra a satisfatória precisão do método analítico multirresíduo.

O método analítico multimicotoxinas validado e usado neste estudo se constituiu numa alternativa viável para análise de micotoxinas mostrando boa sensibilidade, rapidez e aplicabilidade em matrizes complexas como milho e trigo. A grande vantagem deste método, é permitir a análise simultânea de 12 micotoxinas de diferentes classes químicas e em curto tempo (~12 min), sem purificação do extrato da amostra ou necessidade de reação de derivatização, além da confirmação segura do analito através da espectrometria de massas.

O monitoramento de amostras de trigo evidenciou a presença de micotoxinas desde o cultivo no campo até o produto final disponibilizado nas prateleiras de supermercados. Nas amostras de trigo, 100% destas apresentaram contaminação por DON, enquanto, contaminação por Fumonisinias foi determinada em 100% das amostras de milho.

Diferença significativa foi observada nas concentrações de DON entre distintos genótipos no mesmo local de cultivo assim como entre os diferentes locais de cultivo para um mesmo genótipo. Linhagens, ambientes e interação linhagens x ambientes apresentaram efeitos significativos sobre as concentrações de DON.

Da mesma forma, quando avaliados distintos genótipos de trigo com diferentes reações de resistência a giberela quando receberam um, dois ou nenhum tratamento fungicida, a micotoxina DON foi determinada em todas as amostras. Uma aplicação fungicida causou redução significativa em 4 cultivares de trigo, porém em uma das cultivares em estudo foi notado um incremento nas concentrações de DON. A complexidade do patossistema exige maior investigação, a ponto de se obter um melhor manejo da doença, assim como menores níveis de acúmulo de micotoxinas. Medidas de controle, como o uso de fungicidas têm sido preconizadas, entretanto, a dificuldade reside em se conhecer a necessidade e o momento ideal de aplicação e na tecnologia empregada para obtenção de bons resultados, além das interações que podem ocorrer.

Apesar de vários fungicidas reduzirem a gravidade da doença, a contaminação por micotoxinas não está necessariamente relacionada com os

sintomas visíveis da doença. A utilização de fungicidas triazóis, benzimidazóis, e misturas de triazóis + estrobilurina, assim como triazóis, estrobilurina + benzimidazóis reduziram as concentrações de DON comparado ao ensaio que não recebeu nenhum tratamento fungicida. Porém, a aplicação de fungicidas do grupo químico estrobilurina em mistura com fungicida carboxamida não diferiram significativamente do tratamento testemunha. Pouco se sabe sobre os fatores complexos que influenciam a regulação da biossíntese de micotoxinas em grãos infectados. Portanto, devem ser tomados cuidados para garantir a segurança das culturas de cereais tratadas com fungicidas.

Assim como no campo, foi determinada a micotoxina DON em 100% dos grãos de trigo para comércio de importação e exportação. Destaca-se a presença fumonisinas em amostras de trigo tipo exportação. Este vem a ser o primeiro relato da ocorrência desta micotoxina em trigo brasileiro. Além destas, outras micotoxinas como ZEN e OTA foram determinadas em amostras de trigo para exportação.

Nos grãos de trigo para posterior processamento, DON também foi a micotoxina presente em todas as amostras. Na fração da farinha branca, pode ser notada uma redução nas concentrações de DON, enquanto na fração farelo, foi observado o oposto, ou seja, as concentrações de DON foram superiores às aquelas encontradas no grão. O que ocorre de fato é uma redistribuição das micotoxinas nas distintas frações. Porém, todas as frações apresentaram contaminação por micotoxinas, e como consequência do processamento de moagem não eliminar esses compostos tóxicos, foi determinado DON em todas as amostras de farinha de trigo coletadas em supermercados das cidades de Cruz Alta e Santa Maria no Rio Grande do Sul. Apesar das diferenças observadas entre os meses de coleta, a presença de DON foi determinada em todas as amostras coletadas.

Os grãos de milho avaliados apresentaram 100% de contaminação por fumonisinas. Os grãos de milho destinados à exportação apresentaram ocorrência de micotoxinas em todas as amostras de milho analisadas. Além de Fumonisininas, foram determinadas as micotoxinas DON, ZEN, FB₁ e FB₂ e AFLA B₁. Nas amostras de farinha de milho adquiridas em supermercados na cidade de Cruz Alta, DON, ZEN, FB₁ e FB₂ foram determinadas. O mesmo foi verificado nas amostras coletadas em Santa Maria, em que estas micotoxinas também foram determinadas, assim como também a ocorrência de AFLA B₁. Por fim, foram

determinadas aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), fumonisinas (B₁ e B₂), DON e ZEN nas amostras destinadas à alimentação animal.

Pode-se evidenciar que nenhuma das amostras estava isenta de micotoxinas, independente da origem. Este estudo mostrou que mesmo em concentrações abaixo dos limites legais, a exposição humana a estas toxinas podem ocorrer constantemente.

O monitoramento de micotoxinas em alimentos é de extrema importância para a saúde pública, visando a obtenção de produtos de qualidade desde o campo, visto que os processamentos convencionais não são capazes de degradar as micotoxinas.

Por outro lado, a falta de estudos e de informações a respeito do grau de contaminação em todas as etapas envolvidas é um fator de preocupação, visto que para que se obtenham menores níveis de micotoxinas, há necessidade do envolvimento conjunto de toda cadeia produtiva de grãos, desde o campo até a mesa do consumidor.

Uma avaliação completa da ocorrência de micotoxinas em determinado produto somente pode ser estabelecida após a realização de levantamentos em diferentes anos/safras de produção. Por isto, os dados obtidos neste estudo servem como indicativo. No entanto, há necessidade de que haja a continuidade do monitoramento, assim como se faz necessário que os ensaios de campo sejam realizados em distintos anos agrícolas devido as diversidades climáticas entre os anos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHEUER, P. M. et al. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 211–222, 2011.
2. DEWETTINCK, K. et al. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 2, p. 243–257, 2008.
3. CHELI, F. et al. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 307–314, 2013.
4. CHELI, F. et al. Rapid methods as analytical tools for food and feed contaminant evaluation: Methodological implications for mycotoxin analysis in cereals. **Food production - Approaches, challenges and tasks**. First ed. Roma - Italy: InTech Published, 2012. p. 185–204.
5. RAZZAGHI-ABYANEH, M. **Aflatoxins - Recent advances and future prospects**. First ed. Croatia: InTech, 2013. p. 406
6. INSTITUTE OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY. **Cereals**. Disponível em: <<http://www.ifst.org/learninghome/helpforteachers/lessonplantopics/cereals/>>. Acesso em: 23 out. 2013.
7. LEÓN, A. E. e ROSELL, C. **De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica**. 1ª ed. Córdoba: Hugo Baéz Editor, 2007. p. 480
8. TIBOLA, C. S. et al. **Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 11. Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo, 2013. p. 40
9. MINAMI, L. et al. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n. 3, p. 207–224, 2004.

10. USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Wheat Production, Consumption, and Stocks**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>>. Acesso em: 18 set. 2013.
11. OLIVEIRA, M. A.; LORINI, I. e MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n.01, p. 87–91, 2010.
12. SCUSSEL, V. M.; BEBER, M. e TONON, K. M. Efeitos da infecção por Fusarium/Gibberella na qualidade e segurança de grãos, farinhas e produtos derivados. **Seminário Sobre Giberela em Cereais de Inverno: coletânea de trabalhos**. 1a. ed. Passo Fundo: Berthier, 2011. p. 131–175.
13. CRUZ, V. J. R. D. La e VILLANUEVA, M. C. **Micotoxinas, el reto de controlarlas**. Lima: Universidad Nacional del Centro del Perú, 2008. p. 125
14. RAHMANI, A.; JINAP, S. e SOLEIMANY, F. Qualitative and Quantitative Mycotoxins. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 8, p. 202–251, 2009.
15. TIBOLA, C. S. et al. Micotoxinas em trigo no Brasil: causas, panorama atual e perspectivas para o manejo. **Revista Plantio Direto**, p. 1–5, 2011.
16. MIRANDA, M. Z.; MORI, C. DE e LORINI, I. Qualidade e segurança alimentar no complexo tritícola. In: CUNHA, G. R. (Ed.). **Trigo no Brasil: temas e debates do século 21**. Passo Fundo: O Nacional, 2005. p. 26–27.
17. GONZÁLEZ, R. R.; VIDAL, J. L. M. e FRENICH, A. G. **Liquid chromatography for the determination of mycotoxins in food**. 1^a. ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2010. p. 74
18. MAGAN, N. e OLSEN, M. **Mycotoxins in food: Detection and control**. 1a. ed. Cambridge - England: Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 488
19. TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S. e PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica chimica acta**, v. 632, p. 168–80, 2009.
20. SAEGER, S. De. **Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed**. First ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, 2011. p. 415
21. CASTILLO, J. M. S. Del e ET AL. **Micotoxinas en alimentos**. Spain: Diaz de Santos, 2007. p. 393

22. CARRILLO, L. Micotoxinas. **Microbiología Agrícola**. Salta - Argentina: Universidade Nacional de Salta, 2003. p. 1–7.
23. SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 144
24. BOSCO, F. e MOLLEA, C. Mycotoxins in food. In: VALDEZ, B. (Ed.). **Food industrial processes - Methods and equipment**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 160–200.
25. TRUCKSESS, M. W. e POHLAND, A. E. **Mycotoxin Protocols**. Série: Methods in molecular Biology, vol 157. Totowa, New Jersey - USA: Humana Press, 2001. v. 157p. 221
26. VRIES, J. De. **Food safety and toxicity**. Heerlen, Netherlands: CRC Press, 1997. p. 334
27. SCUDAMORE, K. A. Mycotoxins. In: GILBERT, J.; SENYUVA, H. Z. (Eds.). **Bioactive Compounds in Foods**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2008. p. 134–172.
28. BENNETT, J. . W. e KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microviewsbiology Re**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.
29. GIMENO, A. e MARTINS, M. L. **Mycotoxins and mycotoxicosis in animal and humans**. 1ª ed. Miami - USA: Special nutrients, Inc., 2006. p. 127
30. GROMADZKA, K. et al. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 209–220, 2008.
31. HERMANNNS, G. et al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 7–10, 2006.
32. BIANCHINI, A. **Estudo comparativo entre manejos de secagem e armazenamento de arroz na incidência de fungos toxigênicos e micotoxinas**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - S.I... 2003.
33. PIÑEIRO, M. et al. **Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas**. 1ª ed. Roma: FAO, 2003. p. 136
34. RAI, M. e VARMA, A. **Mycotoxins in food, feed and bioweapons**. 1ª ed. Heidelberg, Germany: Springer, 2010.

35. BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 265–282, 2007.
36. SHOLTEN, O. E. et al. **Food safety of cereals: A chain-wide approach to reduce Fusarium Mycotoxins**. European Union: s.n., 2002. p. 108
37. MAZIERO, M. T. e BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.
38. TANIWAKI, M. H. e SILVA, N. F. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL: Núcleo de microbiologia, 2001. p. 82
39. BULLERMAN, L. B.; RYU, D. e JACKSON, L. S. Stability of Fumonisin in Food Processing. In: DEVRIES, W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Eds.). **Mycotoxins and Food Safety**. First ed. New York: Springer-Science + Business Media, LLC, 2002. p. 195–204.
40. PARK, D. L. Effect of Processing on Aflatoxin. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Eds.). **Mycotoxins and Food Safety**. First ed. New York: Springer-Science + Business Media, LLC, 2002. p. 173–179.
41. CALORI-DOMINGUES, M. A. et al. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 181–185, 2007.
42. RYU, D.; JACKSON, L. S. e BULLERMAN, L. B. Effects of Processing on Zearalenone. In: DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. (Eds.). **Mycotoxins and Food Safety**. New York: Springer-Science + Business Media, LLC, 2002. p. 205–216.
43. MAKUN, H. A. **Mycotoxin and food safety in developing countries**. First ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 265
44. PIOTROWSKA, M.; ŚLIŻEWSKA, K. e BIERNASIAK, J. Mycotoxins in cereal and soybean - Based food and feed. In: EL-SHEMY, H. A. (Ed.). **Soybean - Pest resistance**. First ed. Rijeka, Croatia: InTech, p. 185-230, 2013.
45. MACHADO, A. P. da S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho - Braga, Portugal, 2006.

46. PITT, J. I. e HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3ª. ed. USA: Springer, 2009. p. 519
47. BHATNAGAR, D. et al. Mycotoxins contaminating cereal grain crops: Their occurrence and toxicity. In: KHACHATOURIANS, G. G.; ARORA, D. K. (Eds.). **Applied Mycology and Biotechnology**. First edit ed. Amsterdam - Netherlands: Elsevier Science B. V., 2002. p. 171–196.
48. PEREIRA, L. J. A. **Estratégias para o controlo de Ocratoxina A em alimentos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho - Braga, Portugal - 2008.
49. MÉNDEZ-ALBORES, A. e MORENO-MARTÍNEZ, E. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. **Ciencia**, v. julio-sept, p. 1–7, 2009.
50. BARKAI-GOLAN, R. e PASTER, N. **Mycotoxin in fruits and vegetables**. First ed. San Diego - USA: Elsevier, 2008. p. 395
51. CALVO, A. M. Mycotoxins. In: DABROWSKI, W. M.; SIKORSKI, Z. E. (Eds.). **Toxins in food**. Boca Raton, Florida - USA: CRC Press, 2005. p. 220–240.
52. SAMSON, R. A. et al. **Food and Indoor Fungi. CBS Laboratory Manual Series 2**. Netherlands: CBS -Knav Fungal Biodiversity Centre: Utrecht, 2010. p. 390
53. PINTO, N. F. J. A. **Cultivo do milho: qualidade sanitária dos grãos**. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/dsanitaria.htm>>. Acesso em: 24 set. 2013.
54. MAGAN, N. et al. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species , biocides and environment. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 685–690, 2002.
55. IMATHIU, S. M. et al. *Fusarium langsethiae* - a HT-2 and T-2 toxins producer that needs more attention. **Journal of Phytopathology**, v. 161, p. 1–10, 2013.
56. RAN, R. et al. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. **Food Control**, v. 34, p. 138–148, 2013.
57. CARISSE, O. **Fungicides**. First ed. Rijeka, Croatia: InTech Published, 2010. p. 548
58. SAHARAN, M. S. et al. *Fusarium* Head Blight (FHB) or Head Scab of Wheat - A review. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad.**, v. b70, n. 3, p. 255–268, 2004.

-
59. PARRY, D. W.; JENKINSON, P. e MCLEOD, L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. **Plant Pathology**, v. 44, n. 2, p. 207–238, 2007.
60. IOOS, R. et al. The effects of fungicides on Fusarium spp. and Microdochium nivale and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 894–902, 2005.
61. EDWARDS, S. G. e GODLEY, N. P. Reduction of Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. **Food Additives and Contaminants**, v. 05, p. 629–635, 2010.
62. GUTERRES, C. W. Giberela do trigo, inimigo nem sempre perceptível. **CCGL Info**, v. Ano IV, n. 23, Cruz Alta - RS, p. 22, 2013.
63. KLAHR, A. et al. Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat cross. **Euphytica**, v. 154, p. 17–28, 2006.
64. MUNKVOLD, G. P. e DESJARDINS, A. E. Fumonisin in Maize. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556–564, 1997.
65. FILHO, J. A. W. **Fusariose ou podridão-de-fusarium na cultura do milho. Revista P. S.l: s.n., 2012.**
66. SANTANA, F. M. et al. **Eficiência de fungicidas para controle de giberela em trigo: resultados dos ensaios cooperativos - safra 2011**. 1a. ed. Comunicado Técnico 23. Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo, 2011. p. 1–12
67. VIANA, E. e DEUNER, C. C. Sobrevivência. In: REIS, E. M. (Ed.). **Seminário Sobre Giberela em Cereais de Inverno: coletânea de trabalhos**. 1a. ed. Passo Fundo: Berthier, 2011. p. 43–54.
68. ELMHOLT, S. Mycotoxins in the soil environment. In: KARLOVSKY, P. (Ed.). **Secondary metabolites in soil ecology**. 14. ed. Berlin: Springer - Verlag, 2008. p. 166–203.
69. OLIVEIRA, C. A. F. De e GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417–424, 1997.
70. KÖPPEN, R. et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, p. 1595–612, 2010.

71. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: **Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene**, v. 82, p. 169–345, 2002.
72. RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview. **International journal of food microbiology**, v. 119, p. 3–10, 2007.
73. KRŠKA, R. et al. **Romer Labs Guide to Mycotoxins**. First ed. Austria: Romer Labs, 2012. p. 127
74. IARC. IARC(International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 56. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins.**, p. 489–521, 1993.
75. ANASTASSIADES, M. e LEHOTAY, S. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.
76. FREIRE, F. das C. O. et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Documentos 110. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. p. 110
77. DÖLL, S. e DÄNICKE, S. The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive veterinary medicine**, v. 102, p. 132–45, 2011.
78. DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M. e MCCORMICK, S. P. Trichothecene biosynthesis in Fusarium species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 3, p. 595–604, 1993.
79. PESTKA, J. J. Mechanisms of Deoxynivalenol-Induced Gene Expression and Apoptosis. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 25, n. 9, p. 1128–1140, 2008.
80. MCCORMICK, S. P. et al. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. **Toxins**, v. 3, p. 802–814, 2011.
81. SOBROVA, P. et al. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary toxicology**, v. 3, n. 3, p. 94–99, 2010.
82. SABINO, M. et al. Micotoxinas. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2004. p. 742–785.

83. AFSAH-HEJRI, L. et al. A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 629–651, 2013.
84. MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 218–37, 2013.
85. WEGULO, S. N. Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. **Toxins**, v. 4, p. 1157–1180, doi:10.3390/toxins4111157, 2012.
86. BONNET, M. S. et al. Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: the brain as a target. **Toxins**, v. 4, p. 1120–1138, 2012.
87. PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 9, p. 663–679, 2010.
88. CAST. Council for Agricultural Science and Technology - Task force report. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems Council for Agricultural Science and Technology**, p. 217, 2003.
89. PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 283–298, 2007.
90. FOKUNANG, C. N. et Al. Micotoxins: Quality management, prevention, metabolism, toxicity and biomonitoring. In: SMIGÓRSKI, K. (Ed.). **Health management - Different approaches and solutions**. Republic of Cameroon: InTech, 2011. p. 117–142.
91. VOSS, K. a.; SMITH, G. W. e HASCHEK, W. M. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 299–325, 2007.
92. STOCKMANN-JUVALA, H. e SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. **Human & experimental toxicology**, v. 27, n. 11, p. 799–809, 2008.
93. LINO, C. M.; SILVA, L. J. G. e PENA, A. S. Fumonisinas: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 1988, p. 181–192, 2001.
94. SORIANO, J. M. e DRAGACCI, S. Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 985–1000, 2004.

95. XIAO, H. et al. Metabolites of ochratoxinas in rat urine and a culture of *Aspergillus ochraceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 648–655, 1996.
96. JECFA. Evaluation of certain additives and contaminants — sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. In: WHO Food Additives Series 59. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2008.
97. AMÉZQUETA, S. et al. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 326–333, 2009.
98. STUDER-ROHR, I.; SCHLATTER, J. e DIETRICH, D. R. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. **Archives of**, v. 74, n. 9, p. 499–510, 2000.
99. SCHLATTER, C.; STUDER-ROHR, J. e RÁSONYI, T. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, n. 13, 1996.
100. ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and chemical toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.
101. **Zearalenona**. Disponível em: <<http://www.food-info.net/es/tox/zear.htm>>.
102. SPEIJERS, G. J. A. e SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology letters**, v. 153, p. 91–98, 2004.
103. PEDROSA, K. e BORUTOVA, R. Synergistic effects of mycotoxins discussed. **Feedstuffs Reprint**, v. 83, n. 19, p. 1–3, 2011.
104. ŠEGVIĆ KLARIĆ, M. Adverse effects of combined mycotoxins. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 63, n. 4, p. 519–530, 2012.
105. KOLBERG, D. I. S. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo empregando GC-MS (NCI-SIM) para determinação de pesticidas em grãos de trigo e seus produtos processados**. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS - S.I... 2008.
106. AUDENAERT, K. et al. Impact of Fungicide Timing on the Composition of the *Fusarium* Head Blight Disease Complex and the Presence of Deoxynivalenol

- (DON) in Wheat. In: THAJUDDIN, N. (Ed.). **Fungicides – Beneficial and Harmful Aspects**. First ed. Ghent, Belgium: InTech China, 2009. p. 79–98.
107. CHALA, A.; WEINERT, J. e WOLF, G. A. An Integrated Approach to the Evaluation of the Efficacy of Fungicides Against *Fusarium culmorum*, the Cause of Head Blight of Wheat. **Journal Phytopathology**, p. 673–678, 2003.
108. BLANDINO, M. e REYNERI, A. Effect of fungicide and foliar fertilizer application to winter wheat at anthesis on flag leaf senescence, grain yield, flour bread-making quality and DON contamination. **European Journal of Agronomy**, v. 30, p. 275–282, 2009.
109. D’MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. e RINNA, R. Effects of Azoxystrobin on Mycotoxin Production in a Carbendazim-Resistant Strain of *Fusarium sporotrichioides*. **Phytoparasitica**, v. 29, n. 5, p. 431–440, 2001.
110. PIRGOZLIEV, S. R. et al. Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 469–478, 2002.
111. SIMPSON, D. R. et al. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 421–431, 2001.
112. SPOLTI, P. et al. Single and sequential applications of metconazole alone or in mixture with pyraclostrobin to improve *Fusarium* head blight control and wheat yield in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 85–96, 2013.
113. REIS, E. M.; CASA, R. T. e TONIN, R. B. O processo infeccioso. **Seminário Sobre Giberela em Cereais de Inverno: coletânea de trabalhos**2. 1a. ed. Passo Fundo: Berthier, 2011. p. 55–72.
114. ANVISA. **Resolução - RDC no7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.** . Brasília - DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2011.
115. ANVISA. **Resolução - RDC no59, de 26 de dezembro de 2013. Dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos para os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos.** . Brasília - DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2013.

116. ANVISA. **Nota Técnica no.226/2013**. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2014-01/nota-tecnica-alimentos--arquivo.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2014.
117. PITTET, A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. **Mitt. Lebensm. Hyg**, v. 96, p. 424–444, 2005.
118. WHITAKER, T. B. et al. **Sampling procedures to detect mycotoxins in agricultural commodities**. First ed. London: Springer, 2010. p. 57
119. CAPRIOTTI, A. L. et al. Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography / Mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 31, p. 466–503, 2012.
120. NJAPAU, H. et al. **Mycotoxin contamination and control**. First ed. Maryland - USA: Author House, S.d...
121. RICHARD, J. **Sampling and sample preparation for mycotoxin analysis**. USA: Romer Labs, 2006. v. 2, p. 32
122. LATTANZIO, V. M. T. et al. Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 25, p. 1869–1880, 2011.
123. PIZZUTTI, I. R. et al. Fully Integrated Sample Preparation Method for the GC-MS (MS) and LC-MS/MS Multi-residue Analysis of 221 Pesticides and 26 Mycotoxins in Rice. In: 1ST LATIN AMERICAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP - LAPRW - FOOD AND ENVIROMENT. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.
124. SFORZA, S.; DALL'ASTA, C. e MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 25, p. 54–76, 2006.
125. KRALJ CIGIĆ, I. e PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 62–115, 2009.
126. HAJŠLOVA, J.; ZACHARIASOVA, M. e CAJKA, T. Analysis of Multiple Mycotoxins in Food. In: ZWEIGENBAUM, J. (Ed.). **Mass Spectrometry in**

- Food Safety: Methods and Protocolsty, Methods in Molecular Biology, vol. 747.** First ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 747p. 233–258.
127. SHEPHARD, G. S. et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2011-2012. **World Mycotoxin Journal**, v. 6, n. 1, p. 3–30, 2013.
128. LATTANZIO, V. M. T.; PASCALE, M. e VISCONTI, A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 758–768, 2009.
129. KLOEPFER, A.; QUINTANA, J. B. e REEMTSMA, T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 153, 2005.
130. SOLEIMANY, F. et al. A UPLC–MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. **Food Control**, v. 25, p. 647–653, 2012.
131. BŁAJET-KOSICKA, A. et al. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. **Food Control**, v. 38, p. 61–66, 2014.
132. SCHENZEL, J. et al. Development , validation and application of a multi-mycotoxin method for the analysis of whole wheat plants. **Mycotoxin Research**, v. 28, p. 135–147, 2012.
133. ŞENYUVA, H. et al. Rapid LC and LC/MS for routine analysis of mycotoxins in foods. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 229–235, 2008.
134. REN, Y. et al. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1143, p. 48–64, 2007.
135. SERRANO, A. B. et al. Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging Fusarium mycotoxins in pasta by LC-MS/MS. **Food Control**, v. 32, p. 105–114, 2013.
136. ABIA, W. a. et al. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Control**, v. 31, p. 438–453, 2013.

137. JUAN, C.; RITIENI, A. e MAÑES, J. Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. **Food chemistry**, v. 141, p. 1747–55, 2013.
138. OUESLATI, S. et al. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Food and chemical toxicology**, v. 50, p. 2376–2381, 2012.
139. SUMAN, M. et al. Development and validation of a liquid chromatography/linear ion trap mass spectrometry method for the quantitative determination of deoxynivalenol-3-glucoside in processed cereal-derived products. **Food chemistry**, v. 136, p. 1568–1576, 2013.
140. NESHEIM, S.; TRUCKSESS, M. W. e PAGE, S. W. Molar Absorptivities of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in acetonitrile, methanol, and Toluene-Acetonitrile (9+1) (Modification of AOAC Official Method 971.22): Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 2, p. 251–259, 1999.
141. SPANJER, M.; RENSEN, P. e SHOLTEN, J. LC-MS/MS multimethod for mycotoxins after single extractin and validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflake, raisin and fig. **Food Additives and Contaminants**, v. 04, p. 1–50, 2008.
142. INMETRO. **Orientação sobre a validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 4, 2011.
143. EURACHEM. EURACHEM/CITAC Guide CG 4. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, v. Third Edit, n. Ed. ELISON, S.L.R.; WILLIAMS, A., 2012.
144. EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. First ed. S.l: s.n., 1998.
145. ELMASHNI, D. **HPLC Carryover – Decreased Sample Carryover Using the Surveyor Autosampler**. Thermo Fisher Scientific. San Jose, USA: s.n., 2000.
146. MAPA. **Validação e Controle de Qualidade Analítica**. 1^a. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011. p. 78
147. RIGHI, L. W. **Método multirresíduo para determinação de micotoxinas em vinho por UPLC-MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS - 2013.

148. DG SANCO (Directorate-General for Health and Consumer Protection). **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, p. 46, 2013.
149. PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS**. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS - 2006.
150. COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Regulamento (CE) Nº 401/2006 da comissão de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios**. . L 70 p.12-34. Feito em Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia, 2006.
151. CANTERI, M. G. et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18–24, 2001.
152. LIPPOLIS, V. et al. Comparison of slurry mixing and dry milling in laboratory sample preparation for determination of ochratoxin A and deoxynivalenol in wheat. **AOAC International**, v. 2, n. 95, p. 452–458, 2012.
153. SPANJER, M. J. et al. Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling ou slurry mixing? **Food Additives and Contaminants**, v. 1, n. 23, p. 78–83, 2006.
154. MAŠTOVSKÁ, K. e LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259–272, 2004.
155. SEEFELDER, W.; GOSSMANN, M. e HUMPF, H.-U. Analysis of fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 2778–2781, 2002.
156. RAZZAZI-FAZELI, E. et al. Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 968, p. 129–142, 2002.

157. CAVALIERE, C. et al. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. **Food Chemistry**, v. 92, p. 559–568, 2005.
158. MONBALIU, S. et al. Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 23, p. 3–11, 2009.
159. PRESTES, O. D. et al. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.
160. RASMUSSEN, R. . R. et al. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, p. 765–776, 2010.
161. ZACHARIASOVA, M. et al. Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 662, p. 51–61, 2010.
162. JUAN, C.; RITIENI, A. e MAÑES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal , flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2389–2397, 2012.
163. DESMARCHELIER, A. et al. Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 7510–7519, 2010.
164. MOL, H. G. J. et al. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrix. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9450–9459, 2008.
165. PLATTNER, R. D. e MARAGOS, C. M. Determination of deoxynivalenol and nivalenol in corn and wheat by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 1, p. 61–65, 2003.
166. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. e GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. Second ed. New York: John Wiley and sons, 1997. p. 542
167. SULYOK, M. et al. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in

- wheat and maize. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 20, p. 2649–2659, 2006.
168. RUBERT, J.; SOLER, C. e MAÑES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC-MS/MS. **Talanta**, v. 85, p. 206–215, 2011.
169. ZINEDINE, A. et al. Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. **Food Control**, v. 21, p. 132–135, 2010.
170. BELTRÁN, E. et al. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 23, p. 1801–1809, 2009.
171. RUBERT, J. et al. Applicability of hybrid linear ion trap-high resolution mass spectrometry and quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry for mycotoxin analysis in baby food. **Journal of chromatography. A**, v. 1223, p. 84–92, 2012.
172. SULYOK, M.; KRŠKA, R. e SCHUHMACHER, R. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. **Food additives and contaminants**, v. 24, n. 10, p. 1184–1195, 2007.
173. RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J. e LUF, W. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. **Journal of Chromatography A**, v. 854, p. 45–55, 1999.
174. LAGANÀ, A. et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification and determination of trichothecenes in maize. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 17, p. 1037–1043, 2003.
175. BISELLI, S. et al. Analysis of Fusarium Toxins Using LC-MS/MS: Application to Various Food and Feed Matrices. **Spectroscopy**, p. 20–26, 2005.
176. PINHO, G. P. De et al. Influência dos constituintes químicos dos extrato de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 909–913, 2010.

177. HEREBIAN, D. et al. Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. **Journal of separation science**, v. 32, p. 939–948, 2009.
178. FERRER, C. et al. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 42, p. 7634–9, 2011.
179. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
180. SILVA, C. L. Da. **Caracterização de genótipos brasileiros de trigo para eficiência de uso do nitrogênio e qualidade industrial em multi-ambientes**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco-PR - S.l... 2013.
181. BLANDINO, M. et al. Integrated strategies for the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. **Field Crops Research**, v. 133, p. 139–149, 2012.
182. INMET - INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em: 1 fev. 2014.
183. SCHAAF SMA, A. W.; MILLER, J. D. e HOOKER, D. C. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. **Molecular and physiological pathology**, v. 23, p. 279–285, 2001.
184. FUMONISIN B1 AND ITS CO-OCCURRENCE WITH OTHER FUSARIOTOXINS GRAIN, N. contaminated wheat. STANKOVIC´, S., LEVIC´, J., IVANOVIC´, D., KRNJAJA, V., STANKOVIC´, G., TANCIC, S. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 384–388, 2012.
185. ALKADRI, D. et al. Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. **Food chemistry**, v. 157, p. 111–118, 2014.
186. PERKOWSKI, J.; KIECANA, I. e KACZMAREK, Z. Natural occurrence and distribution of Fusarium toxins in contaminated barley cultivars. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 331–339, 2003.
187. BATURO-CIEŚNIEWSKA, A.; LUKANOWSKI, A. e KOLENDA, M. Effect of fungicide application on Wheat Head Blight, occurrence of Fusarium spp. and

- mycotoxin production. **Plant Breeding and Seed Science**, v. 63, p. 29–38, 2011.
188. MATTHIES, A.; WALKER, F. e BUCHENAUER, H. Interference of selected fungicides, plant growth retardants as well as piperonyl butoxide and 1-aminobenzotriazole in trichothecene production of *Fusarium graminearum* (strain 4528) in vitro. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v. 106, p. 198–212, 1999.
189. RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S. e MAGAN, N. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. **Crop Protection**, v. 23, n. 2, p. 117–125, 2004.
190. MESTERHÁZY, A. et al. Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, p. 267–281, 2005.
191. MESTERHAZY, A. et al. Nature of wheat resistance to fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. **Plant Breeding**, v. 118, n. 2, p. 97–119, 1999.
192. MESTERHAZY, A. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. **Plant Breeding**, v. 114, p. 377–386, 1995.
193. MILLER, J. D. . e ARNISON, P. G. Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. **Canadian Journal Of Plant Patology**, v. 8, p. 147–159, 1986.
194. MIEDANER, T. et al. Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. **Plant Breeding**, v. 120, p. 97–105, 2001.
195. GROTH, J. . V.; OZMON, E. A. e BUSCH, R. H. Repeatability and Relationship of Incidence and Severity Measures of Scab of Wheat Caused by *Fusarium graminearum* in Inoculated Nurseries. **Plant Disease**, v. 83, n. 11, p. 1033–1038, 1999.
196. XU, X. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 683–689, 2003.
197. XU, X.-M. et al. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin

- concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. **Plant Pathology**, v. 56, p. 943–956, 2007.
198. ZHANG, Y. J. et al. Quantification of *Fusarium graminearum* in harvested grain by real-time polymerase chain reaction to assess efficacies of fungicides on *Fusarium* head blight, deoxynivalenol contamination, and yield of winter wheat. **Phytopathology**, v. 99, p. 95–100, 2009.
199. MÜLLER, M. E. H. et al. Multifactorial spatial analysis of mycotoxin contamination of winter wheat at the field and landscape scale. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 139, p. 245–254, 2010.
200. BAI, G. e SHANER, G. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 42, p. 135–161, 2004.
201. KOCH, H. J.; PRINGAS, C. e MAERLAENDER, B. Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. **Eur. J. Agronomy**, v. 24, p. 357–366, 2006.
202. BRENNAN, J. M. et al. Comparison of commercial European wheat cultivars to *Fusarium* infection of head and seedling tissue. **Plant Pathology**, v. 56, p. 55–64, 2007.
203. PAUL, P. A. et al. A quantitative review of tebuconazole effect on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in wheat. **Phytopathology**, v. 97, p. 211–220, 2007.
204. BAI, G.; DESJARDINS, A. E. e PLATTNER, R. D. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause Disease Spread in wheat spikes. **Mycopathologia**, v. 153, n. 2, p. 91–98, 2001.
205. ARSENIUK, E. et al. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 10, p. 577–590, 1999.
206. EDWARDS, S. G. et al. Quantification of Trichothecene-Producing *Fusarium* Species in Harvested Grain by Competitive PCR To Determine Efficacies of Fungicides against *Fusarium* Head Blight of Winter Wheat Quantification of Trichothecene-Producing *Fusarium* Species in Harvested Gra. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 4, n. 67, p. 1575–1580, 2001.

-
207. CHAMPEIL, A. et al. Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. **Crop Protection**, v. 23, n. 6, p. 531–537, 2004.
208. YUEN, G. Y. e SCHONEWEIS, S. D. Strategies for managing Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. **International journal of food microbiology**, v. 119, p. 126–130, 2007.
209. PASINATO, A. e CUNHA, G. R. Da. **Informações metereológicas de Passo Fundo, RS: outubro de 2013**. Comunicado Técnico 335. Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo., 2014. p. 5
210. HAIDUKOWSKI, M. et al. Effect of fungicides on the development of Fusarium head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 191–198, 2005.
211. SIRANIDOU, E. e BUCHENAUER, H. Chemical control of Fusarium head blight on wheat. **Journal Plant Dis. Protect**, v. 108, p. 231–243, 2001.
212. CROMEY, M. G. et al. Control of Fusarium head blight of wheat with fungicides. **Australasian Plant Pathology**, v. 30, p. 301–308, 2001.
213. SMITH, D. Disease Profile: Fusarium Head Blight (Scab) of Wheat. **Plant Pathology, UW-Madison/Extension**, n. 608, p. 10–11, 2013.
214. MESTERHÁZY, Á.; BARTOK, T. e LAMPER, C. Influence of wheat cultivar, species of Fusarium, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of Fusarium head blight. **Plant Disease**, v. 87, p. 1107–1115, 2003.
215. PIRGOZLIEV, S. R. et al. Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 731–742, 2003.
216. BLANDINO, M.; MINELLI, L. e REYNERI, A. Strategies for the chemical control of Fusarium head blight: Effect on yield, allelopathic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. **European Journal of Agronomy**, v. 25, p. 193–201, 2006.
217. WEGULO, S. N. et al. Effects of integrating cultivar resistance and fungicide application on Fusarium head blight and deoxynivalenol in winter wheat. **Plant Disease**, v. 95, n. 554-560, 2011.
218. SPOLTI, P. e PONTE, E. M. DEL. Agressividade diferencial de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em interação com o fungicida tebuconazole

- na redução do rendimento de trigo. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1569–1575, 2013.
219. KIMURA, M. et al. Molecular biology and biotechnology for reduction of Fusarium mycotoxin contamination. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 3, p. 117–123, 2006.
220. PAUL, P. A. et al. Efficacy of triazole-based fungicides for Fusarium head blight and deoxynivalenol control in wheat: a multivariate meta-analysis. **Phytopathology**, v. 98, p. 999–1011, 2008.
221. QUIROGA, N. et al. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. **Food chemistry**, v. 6, n. 4, p. 201–204, 1995.
222. AZCARATE, P. M.; VAAMONDE, G.; FERNANDEZ-PINTO, V. Toxinas de Fusarium e Alternaria em trigo cultivado em La provincia de La Pampa e sudeste de Buenos Aires, Argentina. In: SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL “QUALIDADE TOTAL.” **Anais...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
223. LORI, G. A. et al. Fusarium graminearum and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiological research**, v. 158, p. 29–35, 2003.
224. ROIGÉ, M. B. et al. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 233–237, 2009.
225. PACIN, A. M. et al. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. **Food Additives & Contaminants**, v. 14, n. 4, p. 327–331, 1997.
226. DALCERO, A. et al. Occurrence of deoxynivalenol and Fusarium graminearum in Argentinian wheat. **Food Additives & Contaminants**, v. 14, n. 1, p. 11–14, 1997.
227. PINTO, V. E. F. et al. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of Fusarium graminearum strains in wheat affected by head blight in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 157–162, 2008.
228. GONZÁLEZ, H. H. L. et al. Trichothecenes and Mycoflora in Wheat Harvested in Nine Locations in Buenos Aires Province, Argentina. **Mycopathologia**, v. 165, n. 2, 2008.

229. CENDOYA, E. et al. Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina. **Food Control**, v. 37, p. 56–61, 2014.
230. COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Regulamento (CE) No 856/2005 da comissão de 6 de Junho de 2005 que altera o Regulamento (CE) No 466/2001, no que diz respeito às toxinas Fusarium**. . L 143 p.3-8. Feito em Bruxelas: s.n., 2005.
231. LAMARDO, L. C. A. .; NAVAS, S. . e SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 32–35, 2006.
232. SANTOS, J. S. Dos et al. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1439–1450, 2011.
233. E.B., F. et al. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food additives and contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683–688, 1995.
234. FURLONG, E. B. et al. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**1, v. 131, n. 3, p. 185–190, 1995.
235. SANTOS, J. S. dos. et al. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Parana State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 90–95, 2013.
236. PONTE, E. M. DEL.; GARDA-BUFFON, J. e BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1087–1091, 2012.
237. MARIN, S. et al. Fumonisin B1 production and growth of Fusarium moniliforme and Fusarium proliferatum on maize, wheat, and barley grain. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 921–924, 1999.
238. BUSMAN, M.; DESJARDINS, A. E. e PROCTOR, R. H. Analysis of fumonisin contamination and the presence of Fusarium in wheat with kernel black point disease in the United States. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 7, p. 1092–1100, 2012.
239. CHEHRI, K. et al. Occurrence of Fusarium spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. **Toxins**, v. 2, p. 2816–2823, 2010.

-
240. STANKOVIĆ, S. et al. Fumonisin B1 and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. **Food Control**, v. 23, p. 384–388, 2012.
241. CASTELLÁ, G.; BRAGULAT, M. R. e CABAÑES, F. J. Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, p. 4707–10, 1999.
242. CIRILLO, T. et al. Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B(1) and B(2). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 8128–8131, 2003.
243. KUSHIRO, M. et al. Limited Surveillance of Fumonisins in Brown Rice and Wheat Harvested in Japan. **Journal of Food Protection**, v. 6, p. 1156–1354, 2009.
244. PALACIOS, S. A. et al. Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisin in durum wheat grains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 22, p. 12264–12269, 2011.
245. SHEPHARD, G. S. et al. Do fumonisin mycotoxins occur in wheat? **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 9293–9296, 2005.
246. MASSON, A. P. e CECATTO, L. Avaliação do processo de limpeza e polimento dos grãos de trigo para eliminação de micotoxina desoxinivalenol. **Tecnologias para competitividade industrial**, p. 172–187, 2012.
247. LANCOVA, K. et al. Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 5, p. 650–659, 2008.
248. SAMAR, M. M. et al. Distribution of deoxynivalenol in wheat, wheat flour, bran, and gluten, and variability associated with the test procedure. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 3, p. 551–556, 2003.
249. THAMMAWONG, M. et al. Distribution of Deoxynivalenol and Nivalenol in Milling Fractions from *Fusarium*-Infected Japanese Wheat Cultivars. **Journal of Food Protection**, n. 10, p. 1780–1955, 2010.
250. RÍOS, G. et al. Impact of durum wheat milling on the deoxynivalenol distribution in the outcoming fractions. **Food additives and contaminants**, v.4, p. 487–495, 2009.

-
251. PINSON-GADAIS, L. et al. Distribution of toxigenic *Fusarium* spp. and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 1, p. 53–62, 2007.
252. BRERA, C. et al. Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenone in Corn-Milling Fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 14, p. 5014–5019, 2006.
253. NOWICKI, T. W. et al. Retention of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. **Journal of Cereal Science**, v. 8, p. 189–202, 1988.
254. OLIVEIRA, M. S. et al. Incidência de aflatoxinas, desoxivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 1–6, 2002.
255. MALLMANN, C. A. et al. Avaliação da contaminação por desoxinivalenol em trigo utilizado na alimentação humana. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMÁCIA. **Anais...** São Paulo, 2003.
256. BARAJ, E. e FURLONG, E. B. Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2. **Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo**, v. 62, n. 2, p. 95–104, 2003.
257. ARAUJO, D. D. F. et al. **Concentrações de deoxinivalenol em farinhas de trigo**. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/146z.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2014.
258. LUIZ, E. et al. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 359–378, 2003.
259. CALDAS, E. D.; SILVA, S. C. e OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319–323, 2002.
260. AMARAL, K. A. S. et al. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 336–342, 2006.

261. SEKIYAMA, B. L. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 289–294, 2005.
262. CAMARGOS, S. M. et al. Fumonisin in corn cultivars in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 225–229, 2000.
263. MACHINSKI JR, M. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Science Food Agriculture**, v. 81, p. 1001–1007, 2001.
264. KAWASHIMA, L. M. e SOARES, L. M. V. Incidência de Fumonisina B1, Aflatoxina B1, B2, G1, e G2, Ocratoxina A e Zearalenona em produtos de milho. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 516–521, 2006.
265. SOLOVEY, M. M. et al. Survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 8, p. 325–329, 1999.
266. SILVA, L. J. G. et al. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based foods intended for human consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 4, p. 381–390, 2007.
267. POLING, S. M. e PLATTNER, R. D. Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, p. 2344–2349, 1999.
268. CALDAS, E. D. e SILVA, A. C. S. Mycotoxins in Corn-Based Food Products consumed in Brazil: An Exposure Assessment for Fumonisin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 7974–7980, 2007.
269. YAMAGUCHI, M. M.; HIROOKA, E. Y. e SHIBATA, T. M. M. Fumonisin em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. **Anais...** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1992.
270. HIROOKA, E. Y. et al. The Natural Occurrence of Fumonisin in Brazilian Corn Kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 2, p. 173–183, 1996.
271. ORSI, R. B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, p. 75–87, 2000.
272. MALLMANN, C.; SANTURIO, J. M. e DILKIN, P. Incidência de fumonisin B1 em milho e rações no Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE

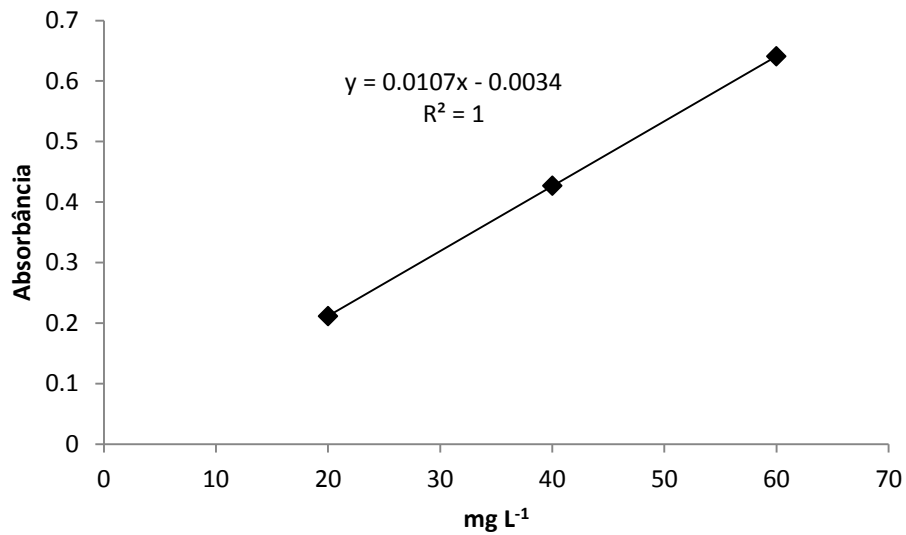
- TOXICOLOGIA. **Anais...** Maracay, Venezuela: Sociedad LatinoAmericana de Micotoxicologia, 1997.
273. FARIAS, A. X. De et al. Contaminação endógena por *aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 617–621, 2000.
274. HENNIGEN, M. R. e DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food additives and contaminants**, v. 12, n. 5, p. 677–681, 1995.
275. RAMOS, C. R. B. A.; BRASIL, E. M. e GERALDINE, R. M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 95–102, 2008.
276. SALAY, E. e MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v. 13, p. 87–92, 2002.
277. PRADO, G. et al. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 259–262, 1997.
278. SORIANO, J. M. e DRAGACCI, S. Review: Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 985–1000, 2004.
279. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. e SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review**, v. 33, n. 1, p. 1–11, 2002.
280. MORENO, E. C. et al. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220–226, 2009.
281. SYDENHAM, E. W. et al. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2014–2018, 1991.
282. SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K. e PONTES NETTO, D. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 63–72, 2003.

-
283. SANTURIO, J. M. et al. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS. **Anais...** São Paulo: Anais., 1992.
284. GALVANO, F.; GALOFARO, V. e GALVANO, G. Occurrence and stability of Aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1079–1090, 1996.
285. RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57–67, 1997.
286. CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 19–28, 2002.
287. GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 149, n. 6, p. 549–554, 1998.
288. SOUZA, M. de L. M. De et al. Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **The Scientific World Journal**, p. 1–9, 2013.
289. ONO, E. Y. et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives & Contaminants**, v. 18, n. 8, p. 719–729, 2001.
290. SCUDAMORE, K. A. et al. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. **Food Additives & Contaminants**, v. 14, p. 157–173, 1997.
291. VARGAS, E. A. et al. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. **Food Additives & Contaminants**, v. 18, p. 981–986, 2001.
292. LABUDA, R. et al. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. **International journal of food microbiology**, v. 105, p. 19–25, 2005.
293. GRIESSLER, K. et al. Occurrence of mycotoxins in Southern Europe. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, p. 301–309, 2010.
294. ALMEIDA, I. et al. Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal. **Mycotoxin Research**, v. 27, p. 177–181, 2011.

-
295. DRIEHUIS, F. et al. Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4261–4271, 2008.
296. MONBALIU, S. et al. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 66–71, 2010.
297. SCUDAMORE, K. A.; NAWAZ, S. e HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Additives & Contaminants**, v. 15, p. 30–55, 1998.
298. RAFAI, P. et al. Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary. **Food Additives & Contaminants**, v. 17, p. 799–808, 2000.
299. MACHINSKI JR, M. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 516–521, 2006.
300. BITTENCOURT, A. B. F. et al. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 2005, n. 16, p. 2, 2005.
301. ALMEIDA-FERREIRA, G. C. et al. Occurrence of zearalenone in wheat- and corn-based products commercialized in the State of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 371–375, 2013.
302. MANOVA, R. e MLADENOVA, R. Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. **Food Control**, v. 20, p. 362–364, 2009.
303. BORDIN, K. et al. Assessment of dietary intake of fumonisin B₁ in São Paulo, Brazil. **Food chemistry**, v. 155, p. 174–8, 2014.
304. ROCHA, L. O. et al. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 11, p. 5090–5103, 2009.
305. FERREIRA, P. et al. Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 1, p. 54–60, 2013.
306. MACHINSKI JR, M. e SOARES, L. M. V. Fumonisins B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food additives and contaminants**, v. 17, p. 875–879, 2000.

-
307. SCAFF, R. M. C. e SCUSSEL, V. M. Fumonisin B1 and B2 in Corn-Based Products Commercialized in the State of Santa Catarina - Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 911–919, 2004.
308. PELUQUE, E. et al. Fumonisin B1 in cereal mixtures marketed in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance**, v. 7, n. 1, p. 46–48, 2014.
309. MILANEZ, T. V.; VALENTE-SOARES, L. M. e BAPTISTA, G. G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. **Food Control**, v. 17, p. 293–298, 2006.
310. CRUZ, J. V. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
311. SCUDAMORE, K. A. e PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives & Contaminants**, v. 17, n. 5, p. 407–416, 2000.

8 APÊNDICES

Apêndice 1. Cálculo do fator de correção do espectrofotômetro UV-VisLeitura da absorbância das soluções de $K_2Cr_2O_7$ 

Concentração (mmol L ⁻¹)	Absorbância (n=5)
0,06798	0,2111
0,13597	0,4264
0,23950	0,6406

$$\varepsilon = \frac{A \times 1000}{\text{Concentração em mM}}$$

$$\varepsilon_1 = \frac{0,2111 \times 1000}{0,06798} \quad \varepsilon_1 = 3105$$

$$\varepsilon_2 = \frac{0,4267 \times 1000}{0,13597} \quad \varepsilon_2 = 3136,7$$

$$\varepsilon_3 = \frac{0,6406 \times 1000}{0,2395} \quad \varepsilon_3 = 3142,9$$

$$\varepsilon_{\text{médio}} = \frac{3105 + 3136,7 + 3142,9}{3}$$

$$\varepsilon_{\text{médio}} = 3128,2$$

$$FC = \frac{3160}{\varepsilon_{\text{médio}}}$$

$$FC = 1,010$$

Apêndice 2. Cálculo para correção da concentração da solução analítica de Aflatoxina B₁

Para demonstração do cálculo, tomou-se como exemplo o cálculo da solução da micotoxina Aflatoxina B₁

$$C = \frac{A \times FC \times PM \times 1000 \times FD}{\varepsilon}$$

$$C = \frac{0,7301 \times 1,010 \times 312 \times 1000 \times 5}{21500}$$

$$C = 53,50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1} \text{ de Aflatoxina B}_1$$

Apêndice 3. Preparo das soluções analíticas de micotoxina utilizadas para confecção da curva analítica.

Concentração Grupo I (ng mL ⁻¹)	Concentração Grupo II (ng mL ⁻¹)	Volume de solução mistura (μL)	Volume final Balão com metanol (mL)
0,2	10	10	25
0,4	20	20	25
1	50	20	10
2	100	40	10
4	200	80	10
10	500	200	10
20	1000	400	10

Volume adicionado da solução preparada em balão volumétrico (mL)	Volume adicionado de acetonitrila ou extrato da matriz (mL)	Concentração antes injeção Grupo I (ng mL ⁻¹)	Concentração antes injeção Grupo II (ng mL ⁻¹)	Fator*
0,5	0,5	0,1	5	4
0,5	0,5	0,2	10	4
0,5	0,5	0,5	25	4
0,5	0,5	1	50	4
0,5	0,5	2	100	4
0,5	0,5	5	250	4
0,5	0,5	10	500	4

*Fator = Nível de fotificação/concentração da micotoxina antes da injeção

Apêndice 4. Concentrações de DON em linhagens cultivadas nas cidades de Cruz Alta, Santa Rosa e São Luiz Gonzaga.

Linhagem	Repetição	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		Cruz Alta	Santa Rosa	São Luiz Gonzaga
2	1	838	80	77
	2	305	79	64
	3	510	80	102
	Média	551	80	81
3	1	118	101	286
	2	11	90	267
	3	12	87	232
	Média	117	93	262
4	1	158	102	347
	2	160	64	168
	3	89	80	266
	Média	136	82	260
5	1	153	59	309
	2	248	115	435
	3	196	80	290
	Média	199	85	345
6	1	195	66	252
	2	164	72	279
	3	157	72	290
	Média	172	70	274
7	1	369	109	154
	2	397	51	289
	3	330	91	190
	Média	365	84	211
9	1	142	73	170
	2	209	80	156
	3	130	56	133
	Média	160	70	153
11	1	311	51	108
	2	315	54	90
	3	238	56	163
	Média	288	53	120
14	1	2142	248	257
	2	868	187	322
	3	1440	368	111
	Média	1483	267	230

Continuação

Linhagem	Repetição	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
		Cruz Alta	Santa Rosa	São Luiz Gonzaga
15	1	554	120	83
	2	752	117	109
	3	370	95	85
	Média	559	111	92
16	1	500	105	265
	2	740	105	232
	3	644	103	150
	Média	628	104	215
17	1	730	165	113
	2	826	285	71
	3	771	254	168
	Média	776	234	117
21	1	140	122	236
	2	131	97	240
	3	130	93	238
	Média	134	104	238
Testemunha	1	186	79	241
	2	352	121	100
	3	202	83	115
	Média	247	94	152

Apêndice 5. Concentrações da micotoxina DON em genótipos de trigo sem e com diferentes manejos de fungicida no florescimento de grãos.

Genótipo	Tratamentos	DON $\mu\text{g kg}^{-1}$
1	Uma aplicação (25-50% floração)	239
		457
		218
		269
		233
	Média	283
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 dias após aplicação anterior)	240
		174
		118
		124
		148
	Média	160
	Testemunha	647
		598
523		
616		
598		
Média	596	
2	Uma aplicação (25-50% floração)	250
		297
		420
		349
		317
	Média	327
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 dias após aplicação anterior)	176
		247
		276
		266
		221
	Média	237
	Testemunha	676
		605
829		
914		
952		
Média	795	

Continuação

Genótipo	Tratamentos	DON $\mu\text{g kg}^{-1}$
3	Uma aplicação (25-50% floração)	122
		146
		192
		207
		198
	Média	173
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 dias após aplicação anterior)	74
		68
		62
		53
		56
	Média	62
	Testemunha	65
54		
55		
53		
58		
Média	57	
4	Uma aplicação (25-50% floração)	361
		281
		294
		376
		292
	Média	321
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 dias após aplicação anterior)	361
		304
		395
		204
		354
	Média	324
	Testemunha	1046
875		
1054		
1010		
846		
Média	966	

Continuação

Genótipo	Tratamentos	DON $\mu\text{g kg}^{-1}$
5	Uma aplicação (25-50% floração)	292
		253
		235
		172
		180
	Média	226
	Duas aplicações (25-50% floração + dias após aplicação anterior)	202
		253
		264
		151
		208
	Média	216
	Testemunha	1020
		838
793		
676		
1435		
Média	952	

Apêndice 6. Rendimento de grãos e índice de giberela em genótipos de trigo sem e com diferentes manejos de fungicida no florescimento de grãos.

Genótipo	Tratamento	Rendimento (kg ha ⁻¹)	Índice de giberela
1	Uma aplicação (25-50% floração)	3908,97 a*	0,51 b
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 AA**)	3731,25 b	0,28 c
	Testemunha	3587,69 b	1,24 a
2	Uma aplicação (25-50% floração)	2588,88 a	1,24 b
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 AA)	2544,92 a	0,54 c
	Testemunha	2341,68 a	2,33 a
3	Uma aplicação (25-50% floração)	3987,89 a	0,094 a
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 AA)	4264,15 a	0,013 b
	Testemunha	4051,69 a	0,079 a
4	Uma aplicação (25-50% floração)	3977,31 b	0,67 b
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 AA)	4348,93 a	0,46 c
	Testemunha	3935,54 b	1,55 a
5	Uma aplicação (25-50% floração)	3804,02 a	0,12 b
	Duas aplicações (25-50% floração + 10 AA)	3748,13 a	0,09 b
	Testemunha	3613,24 a	0,47 a

*Médias com letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

** AA = dias após aplicação anterior.

Apêndice 7. Tratamento fungicida aplicado na cultivar de trigo selecionada para o controle de giberela e concentrações de DON.

Tratamento	Grupo Químico	Dose (L ha ⁻¹)	DON μg kg ⁻¹
1	-----	Sem tratamento	209
			1848
			157
			190
			218
Média			192
2	Triazol (A) + Estrobilurina (B)	0,75	< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
Média			< LOQ
3	Estrobilurina (B) + Triazol (C)	0,50	< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
Média			< LOQ
4	Estrobilurina (D) + Triazol (E)	0,60	62
			52
			64
			53
			51
Média			57
5	Triazol (F)	0,75	62
			82
			59
			63
			95
Média			72
6	Benzimidazol (G)	0,80	< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
Média			< LOQ

Tratamento	Grupo Químico	Dose (L ha ⁻¹)	DON μg kg ⁻¹
7	Estrobilurina (D) + Triazol (E)	0,75	< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
Média			< LOQ
8	Benzimidazol (G)	1,00	< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
Média			< LOQ
9	Estrobilurina (D) + Triazol (E) + Benzimidazol (G)	0,75	< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
Média			< LOQ
10	Estrobilurina (H) + Carboxamida (I)	0,30	177
			288
			219
			210
			170
Média			212
11	Estrobilurina (H) + Carboxamida (I)	0,35	170
			150
			233
			103
			270
Média			186
12	Estrobilurina (H) + Triazol (J)	0,75	< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
			< LOQ
Média			< LOQ

Apêndice 8. Concentrações de DON em amostras de trigo importadas da Argentina através do Porto de Bahia Blanca.

Amostra	DON $\mu\text{g kg}^{-1}$
1	366
2	412
3	289
4	554
5	496

Apêndice 9. Contaminação por micotoxinas em 30 amostras de trigo tipo exportação oriundas do sul do Brasil.

Amostra	DON $\mu\text{g kg}^{-1}$	FB ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	FB ₂ $\mu\text{g kg}^{-1}$	OTA $\mu\text{g kg}^{-1}$	ZEN $\mu\text{g kg}^{-1}$
1	1314	67	n.d.	n.d.	123
2	1235	66	n.d.	n.d.	111
3	848	65	n.d.	2	66
4	1743	71	69	n.d.	138
5	791	n.d.	n.d.	n.d.	70
6	693	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	934	n.d.	n.d.	n.d.	89
8	1567	68	66	n.d.	166
9	974	n.d.	67	n.d.	n.d.
10	886	n.d.	100	n.d.	n.d.
11	873	n.d.	78	n.d.	n.d.
12	844	n.d.	101	n.d.	n.d.
13	870	n.d.	115	n.d.	n.d.
14	1213	n.d.	52	n.d.	n.d.
15	1243	n.d.	99	n.d.	n.d.
16	1215	n.d.	72	n.d.	n.d.
17	1400	n.d.	n.d.	n.d.	72
18	1450	n.d.	n.d.	n.d.	109
19	1633	n.d.	n.d.	n.d.	89
20	1485	n.d.	n.d.	n.d.	78
21	694	n.d.	n.d.	n.d.	50
22	718	n.d.	n.d.	n.d.	63
23	735	72,26	67	n.d.	67
24	1120	n.d.	<LOQ	n.d.	71
25	1011	n.d.	n.d.	n.d.	78
26	1261	n.d.	n.d.	n.d.	106
27	688	n.d.	<LOQ	n.d.	51
28	663	n.d.	n.d.	n.d.	59
29	783	68	66	n.d.	87
30	902	70	67	n.d.	64

n.d. = menor que o limite de detecção do método (não detectado)

<LOQ = menor que o limite de quantificação do método

Apêndice 10. Concentrações de DON em grãos de trigo antes de uma etapa de limpeza, após a etapa de limpeza e em seus sub-produtos da moagem (farelo e farinha)

Amostra	Grãos antes da	Grãos após da	Farelo	Farinha
	etapa de limpeza	etapa de limpeza		
DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
1	990	783	1832	388
2	287	322	1186	421
3	838	841	1441	523
4	709	714	766	300
5	381	333	1097	214
6	434	487	769	201
7	388	314	1442	217
8	376	273	573	185
9	509	311	963	219
10	314	166	637	135
11	712	518	831	182
12	366	357	923	210
13	394	235	664	147
14	384	281	732	169
15	815	716	863	251
16	418	208	659	37
17	165	128	258	45
18	167	156	289	45
19	360	425	576	95
20	407	432	539	92

Apêndice 11. Concentrações de DON em farinhas de trigo coletadas em supermercados na cidade de Cruz Alta – RS, no ano de 2013.

Amostra	Abril	Junho	Agosto	Outubro	Dezembro
1	113	53	284	617	306
2	1144	485	331	492	243
3	331	2453	367	242	804
4	477	335	466	313	139
5	172	1405	193	230	481
6	551	284	333	611	119
7	408	184	358	217	139
8	398	134	329	319	121
9	1754	1672	308	245	232
10	594	1152	344	195	66

Apêndice 12. Concentrações de DON em farinhas de trigo coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria – RS, no ano de 2013.

Amostra	Abril	Junho	Agosto	Outubro	Dezembro
DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
1	1180	199	522	926	404
2	649	482	1261	410	217
3	546	245	300	486	96
4	1757	514	598	471	299
5	676	676	1019	870	187
6	1834	1058	950	495	541
7	134	1214	882	918	78
8	288	1054	571	259	466
9	1565	1507	406	375	426
10	1789	212	750	560	658

Apêndice 13. Concentração de micotoxinas em milho tipo exportação.

Amostra	Micotoxina ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
	DON	AFLA B ₁	AFLA B ₂	AFLA G ₁	FB ₁	FB ₂	ZEN
1	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	252	143	n.d.
2	<LOQ	8.7	n.d.	n.d.	190	114	n.d.
3	<LOQ	1.7	n.d.	n.d.	853	516	<LOQ
4	<LOQ	6.6	n.d.	n.d.	486	236	n.d.
5	81	11.6	<LOQ	42.0	443	220	n.d.
6	<LOQ	1.3	n.d.	n.d.	672	335	<LOQ
7	<LOQ	66.8	4.1	30.3	930	531	n.d.
8	<LOQ	722.2	81.6	1333.4	693	379	n.d.
9	<LOQ	6.3	<LOQ	4.8	280	161	<LOQ
10	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	394	244	n.d.
11	<LOQ	3.7	n.d.	n.d.	157	94	<LOQ
12	<LOQ	3.3	n.d.	2.9	325	221	n.d.
13	<LOQ	1.1	n.d.	2.4	466	248	<LOQ
14	<LOQ	5.3	n.d.	n.d.	268	167	n.d.
15	<LOQ	9.0	n.d.	n.d.	224	141	<LOQ
16	50	<LOQ	n.d.	n.d.	142	83	n.d.
17	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	1010	513	<LOQ
18	56	<LOQ	n.d.	n.d.	173	106	<LOQ
19	66	15.29	1.34	n.d.	308	175	<LOQ
20	82	12.27	1.32	n.d.	342	179	<LOQ
21	52	16.24	1.44	5.2	513	292	<LOQ
22	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	268	146	n.d.
23	76	7.99	<LOQ	n.d.	143	92	<LOQ
24	181	<LOQ	n.d.	n.d.	652	376	<LOQ
25	<LOQ	<LOQ	n.d.	n.d.	446	233	<LOQ
26	<LOQ	11.85	1.02	n.d.	281	147	n.d.
27	<LOQ	1.65	n.d.	n.d.	632	370	n.d.
28	183	<LOQ	n.d.	n.d.	280	178	53
29	<LOQ	4.72	n.d.	n.d.	357	193	n.d.
30	<LOQ	18.81	1.50	n.d.	1469	878	n.d.

n.d. = menor que o limite de detecção do método (não detectado)

<LOQ = menor que o limite de quantificação do método

Apêndice 14. Concentração de micotoxinas em grãos de milho utilizados para fabricação de ração animal.

Amostra	FB ₁	FB ₂	DON	ZEN	Micotoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
					AFLA B ₁	AFLA B ₂	AFLA G ₁	AFLA G ₂
1	92	64	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
2	535	355	79	76	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
3	286	172	<LOQ	n.d.	2.4	n.d.	n.d.	1.5
4	753	414	<LOQ	<LOQ	2.0	n.d.	n.d.	n.d.
5	573	311	<LOQ	n.d.	9.2	1.2	n.d.	n.d.
6	456	259	83	<LOQ	4.2	n.d.	n.d.	1.1
7	489	291	88	<LOQ	5.7	<LOQ	n.d.	1.3
8	349	217	89	<LOQ	13.1	1.0	n.d.	n.d.
9	298	171	<LOQ	<LOQ	3.6	n.d.	n.d.	1.1
10	517	265	<LOQ	<LOQ	5.4	<LOQ	n.d.	1.3
11	480	298	221	<LOQ	4.5	n.d.	21.1	n.d.
12	567	419	274	110	<LOQ	n.d.	n.d.	1.3
13	470	280	271	405	8.2	n.d.	n.d.	1.5
14	1517	927	<LOQ	51	32.3	1.5	n.d.	1.3
15	787	472	<LOQ	n.d.	3.6	n.d.	7.4	2.0
16	827	442	<LOQ	n.d.	1.4	<LOQ	n.d.	n.d.
17	1058	572	<LOQ	n.d.	1.1	n.d.	n.d.	n.d.
18	956	505	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
19	688	402	668	156	1.3	n.d.	n.d.	n.d.
20	544	280	607	493	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = menor que o limite de detecção do método (não detectado)

<LOQ = menor que o limite de quantificação do método

Apêndice 15. Concentração de micotoxinas em quirera de milho utilizada para fabricação de ração animal.

Amostra	FB ₁	FB ₂	DON	ZEN	Micotoxinas (µg kg ⁻¹)			
					AFLA B ₁	AFLA B ₂	AFLA G ₁	AFLA G ₂
1	589	349	n.d.	<LOQ	11.7	1.1	n.d.	1.6
2	406	255	n.d.	n.d.	2.4	n.d.	n.d.	n.d.
3	777	514	302	184	2.0	n.d.	n.d.	1.4
4	1096	619	358	146	3.2	<LOQ	n.d.	n.d.
5	802	412	492	194	1.1	n.d.	n.d.	1.4
6	532	349	564	231	1.3	n.d.	n.d.	1.5
7	584	366	50	50	7.2	<LOQ	n.d.	n.d.
8	324	207	92	52	2.3	n.d.	n.d.	2.3
9	688	459	287	111	0.9	n.d.	n.d.	n.d.
10	524	306	<LOQ	<LOQ	9.8	1.2	5.0	n.d.
11	672	455	58	<LOQ	10.1	1.0	n.d.	n.d.
12	424	284	n.d.	<LOQ	8.5	1.0	n.d.	1.9
13	648	425	n.d.	<LOQ	38.3	3.6	20.3	n.d.
14	431	308	102	<LOQ	9.7	1.1	n.d.	n.d.
15	489	330	92	60	5.5	<LOQ	n.d.	2.0
16	570	394	92	62	3.6	n.d.	n.d.	n.d.
17	235	157	72	<LOQ	7.9	n.d.	3.5	n.d.
18	387	303	556	424	3.9	n.d.	n.d.	n.d.
19	357	253	195	n.d.	2.5	n.d.	3.0	n.d.
20	92	64	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = menor que o limite de detecção do método (não detectado)

<LOQ = menor que o limite de quantificação do método

Apêndice 16. Concentração de micotoxinas em farinha de milho coletadas em supermercados na cidade de Cruz Alta – RS, no ano de 2013.

Coleta	Amostra	Desoxinivalenol $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₂ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Zearalenona $\mu\text{g kg}^{-1}$
Abril	1	<LOQ	114	83	<LOQ
	2	n.d.	71	65	n.d.
	3	n.d.	120	88	n.d.
	4	n.d.	93	75	n.d.
	5	n.d.	459	302	n.d.
	6	53	778	8	<LOQ
	7	<LOQ	135	978	<LOQ
	8	<LOQ	90	72	<LOQ
	9	<LOQ	61	58	n.d.
	10	n,d,	90	71	n.d.
Junho	1	n.d.	210	150	n.d.
	2	<LOQ	190	133	n.d.
	3	n.d.	78	70	n.d.
	4	n.d.	79	70	n.d.
	5	n.d.	210	122	n.d.
	6	n.d.	83	74	n.d.
	7	128	340	199	<LOQ
	8	n.d.	339	188	n.d.
	9	80	82	70	<LOQ
	10	298	170	122	<LOQ
Agosto	1	n.d.	153	107	n.d.
	2	n.d.	471	270	n.d.
	3	88	241	161	<LOQ
	4	104	68	62	<LOQ
	5	28	121	81	n.d.
	6	n.d.	274	160	n.d.
	7	n.d.	77	68	n.d.
	8	n.d.	150	113	n.d.
	9	64	783	462	<LOQ
	10	245	105	81	<LOQ

Continuação

Coleta	Amostra	Desoxinivalenol $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₂ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Zearalenona $\mu\text{g kg}^{-1}$
Outubro	1	n.d.	452	250	n.d.
	2	102	714	421	<LOQ
	3	n.d.	263	150	n.d.
	4	n.d.	193	121	<LOQ
	5	138	795	457	60
	6	111	182	122	LOQ
	7	194	107	85	<LOQ
	8	<LOQ	74	85	n.d.
	9	n.d.	64	61	n.d.
	10	<LOQ	104	100	n.d.
Dezembro	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	2	<LOQ	96	75	n.d.
	3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	4	<LOQ	<LOQ	50	n.d.
	5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	6	<LOQ	116	75	n.d.
	7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	8	<LOQ	<LOQ	60	n.d.
	9	<LOQ	<LOQ	56	67
	10	<LOQ	116	85	71

n.d. = menor que o limite de detecção do método (não detectado)

<LOQ = menor que o limite de quantificação do método

Apêndice 17. Concentração de micotoxinas em farinha de milho coletadas em supermercados na cidade de Santa Maria – RS, no ano de 2013.

Amostra	Desoxinivalenol $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₂ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Zearalenona $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Abril	1	n.d.	1239	808	n.d.
	2	n.d.	160	114	n.d.
	3	n.d.	148	104	n.d.
	4	n.d.	83	72	n.d.
	5	n.d.	66	61	n.d.
	6	n.d.	117	94	n.d.
	7	118	84	70	53
	8	94	100	82	<LOQ
	9	n.d.	118	93	n.d.
	10	n.d.	226	157	n.d.
Junho	1	n.d.	188	125	n.d.
	2	n.d.	206	137	n.d.
	3	n.d.	724	459	n.d.
	4	n.d.	210	120	n.d.
	5	n.d.	149	122	n.d.
	6	54	561	353	<LOQ
	7	237	133	103	<LOQ
	8	n.d.	264	150	<LOQ
	9	72	73	68	<LOQ
	10	65	270	115	<LOQ
Agosto	1	534	243	159	55
	2	n.d.	241	148	n.d.
	3	<LOQ	279	165	n.d.
	4	n.d.	739	369	n.d.
	5	n.d.	160	113	n.d.
	6	n.d.	148	110	n.d.
	7	<LOQ	358	213	<LOQ
	8	n.d.	319	176	n.d.
	9	n.d.	343	213	n.d.
	10	290	314	185	n.d.

Continuação

	Amostra	Desoxinivalenol $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₁ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fumonisina B ₂ $\mu\text{g kg}^{-1}$	Zearalenona $\mu\text{g kg}^{-1}$
Outubro	1	55	196	127	<LOQ
	2	n.d.	605	348	n.d.
	3	378	138	99	208
	4	n.d.	264	155	n.d.
	5	247	260	173	<LOQ
	6	63	388	258	<LOQ
	7	93	198	131	<LOQ
	8	<LOQ	69	62	n.d.
	9	<LOQ	308	181	n.d.
	10	n.d.	183	121	n.d.
Dezembro	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
	7	<LOQ	50	<LOQ	<LOQ
	8	<LOQ	53	<LOQ	630
	9	<LOQ	159	101	n.d.
	10	<LOQ	51	<LOQ	n.d.

n.d. = menor que o limite de detecção do método (não detectado)

<LOQ = menor que o limite de quantificação do método