

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA – ÊNFASE EM ANÁLISES
MICOTOXICOLÓGICAS E PATOLOGIA AVIÁRIA**

**ANÁLISE DE DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM
PRODUTOS DE ORIGEM INTEGRAL E NÃO INTEGRAL:
ESTUDO COMPARATIVO**

MONOGRAFIA DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA

Bharbara Guilhermina Marques Coelho

Santa Maria, RS, Brasil.

2020

ANÁLISE DE DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM
PRODUTOS DE ORIGEM INTEGRAL E NÃO INTEGRAL:
ESTUDO COMPARATIVO

por

Bharbara Guilhermina Marques Coelho

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária/Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva**.

Orientador: Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS, Brasil.

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL
DA SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Monografia do Programa de Residência

**ANÁLISE DE DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM
PRODUTOS DE ORIGEM INTEGRAL E NÃO INTEGRAL:
ESTUDO COMPARATIVO**

Elaborada por
Bharbara Guilhermina Marques Coelho

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Especialista em Medicina Veterinária Preventiva

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Augusto Mallmann, Dr.
(Presidente/Orientador)

Camila Tonini, Msc. (UFSM)

Juliana Felipetto Cargnelutti, PhD. (UFSM)

Santa Maria, fevereiro de 2020.

RESUMO

Monografia do Programa de Residência Médica
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde
Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

ANÁLISE DE DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM PRODUTOS DE ORIGEM INTEGRAL E NÃO INTEGRAL: ESTUDO COMPARATIVO

AUTORA: BHARBARA GUILHERMINA MARQUES COELHO

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO MALLMANN

Data e local da defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2020.

A palavra micotoxina deriva da palavra grega “*mykes*”, que significa fungo e também do latim “*toxican*”, significando toxinas. A presença da micotoxina no alimento depende de inúmeros fatores, incluindo aqui os nutrientes, luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar, umidade relativa do substrato, não desconsiderando também os métodos de produção, processamento e armazenamento. No atual cenário brasileiro, devido às suas condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de fungos produtores desses metabólitos, a comercialização de alimentos isentos da presença de micotoxinas tornou-se assunto com grande prioridade no quesito saúde humana, exigindo controle rigoroso. A contaminação possui relatos em todas as partes do mundo, onde destaca-se maior suscetibilidade em grãos e cereais, e, quando contaminados, costumam se localizar nas camadas mais externas do grão, onde o processo de beneficiamento pode aumentar a contaminação no produto final. Os processos de fabricação de alimentos à base desse cereal, os quais obtenham resultados satisfatórios em relação aos níveis de contaminação, são considerados de extrema importância para diminuir a exposição humana à micotoxina.

Palavras-chave: micotoxinas; cereais; contaminação.

ABSTRACT

Monografia do Programa de Residência Médica
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde
Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

ANALYSIS OF DEOXINIVALENOL AND ZEARALENONE IN PRODUCTS OF INTEGRAL AND NON-INTEGRAL ORIGIN: A COMPARATIVE STUDY

AUTHOR: BHARBARA GUILHERMINA MARQUES COELHO
ADVISOR: CARLOS AUGUSTO MALLMANN
Santa Maria February, 27, 2020.

The word mycotoxin derives from the greek word "mykes", which means fungus and also from the Latin "toxican", meaning toxins. The presence of mycotoxin in food depends on numerous factors, including here the nutrients, light, oxygen, temperature, pH, relative humidity, relative humidity of the substrate, not disregarding also the methods of production, processing and storage. In the current brazilian scenario, due to its favorable climatic conditions for the development of fungi that produce these metabolites, the commercialization of food free from the presence of mycotoxins has become a subject of great priority in the area of human health, requiring strict control. Contamination has been reported in all parts of the world, where there is greater susceptibility to grains and cereals, and, when contaminated, they are usually located in the outermost layers of the grain, where the beneficiation process can increase contamination in the final product. The food manufacturing processes based on this cereal, which obtain satisfactory results in relation to the levels of contamination, are considered of extreme importance to reduce human exposure to mycotoxin.

Keywords: mycotoxins; cereals; contamination.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol e Zearalenona em alimentos à base de trigo.	12
TABELA 2 - Resultado das análises de DON para pães integrais e pães não integrais	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Desoxinivalenol	10
2.2 Zearalenona	11
2.3 Legislação	12
2.4 Micotoxinas e Saúde Pública	13
3. MANUSCRITO – Análise de Desoxinivalenol e Zearalenona em produtos de origem integral e não integral: estudo comparativo	15
Resumo	15
Abstract	16
Introdução	16
Material e métodos	19
Resultados e discussão	20
Conclusão	23
Referências	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

A palavra micotoxina deriva da palavra grega “*mykes*”, que significa fungo e também do latim “*toxican*”, significando toxinas. Derivam do metabolismo de fungos filamentosos, constituindo um conjunto complexo de substâncias tóxicas (IAMANAKA et al., 2010). Os fungos são microorganismos eucarióticos que costumam ocasionar alterações no sabor e qualidade dos alimentos sendo algumas delas desejáveis, como no caso dos queijos, por exemplo. Diferentes espécies podem produzir a mesma micotoxina, onde algumas apresentam a característica de termorresistência (MAZIERO & BERSOT, 2010). Estudos comprovam que tais metabólitos não apresentam nenhuma função no metabolismo do fungo, sendo produzidas quando este atinge a sua maturidade, desenvolvendo-se em todo o tipo de alimento, sendo alguns considerados melhores substratos do que outros (EMBRAPA, 2010). Sabe-se que diferenciam-se das toxinas de bactérias e outros microorganismos por não serem de natureza proteica ou imunogênica. Sua estrutura pode variar, como por exemplo, o peso molecular (IAMANAKA et al., 2010; EMBRAPA, 2010).

A presença da micotoxina no alimento depende de inúmeros fatores, incluindo aqui os nutrientes, luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar, umidade relativa do substrato, não desconsiderando também os métodos de produção, processamento e armazenamento (EMBRAPA, 2010). Podem ainda contaminar cultivos em decorrência de danos aos grãos, como a quebra, causada por insetos e outros animais. A ocorrência dos metabólitos costuma afetar a exportação de alimentos, produção animal e saúde humana. Entram na cadeia alimentar humana ou animal por meio do consumo de cereais, oleaginosas e derivados, incluindo-se aqui também o consumo de produtos de origem animal como carne, leite e ovos, quando os animais são alimentados com alimento contendo a micotoxina (MAZIERO & BERSOT, 2010).

A ocorrência da micotoxina no alimento pode ocorrer por duas maneiras: contaminação direta e contaminação indireta. A primeira ocorre quando o alimento ou ração sofre contaminação pelo fungo e esse produz a toxina, e a segunda ocorre quando algum dos ingredientes utilizados para a produção do alimento ou ração é contaminado de maneira prévia, permanecendo assim no produto final destinado ao público consumidor ou aos animais (EMBRAPA 2010; SAKATA et al., 2011).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No atual cenário brasileiro, devido às suas condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de fungos produtores desses metabólitos, a comercialização de alimentos isentos da presença de micotoxinas tornou-se assunto com grande prioridade no quesito saúde humana, exigindo controle rigoroso (SANTOS et al., 2010; MAZIERO & BERSOT, 2010). Os efeitos sistêmicos destas dependem de variantes como quantidade de toxina que é ingerida, duração da exposição e sensibilidade animal e humana, apresentando na maioria das vezes, afinidade por órgãos específicos (LUCIOLI, 2011; MAZIERO & BERSOT, 2010).

Estudos constatam que as micotoxinas são os contaminantes de controle mais difícil em alimentos, permanecendo nestes independente da destruição do fungo (IAMANAKA et al., 2010). A contaminação possui relatos em todas as partes do mundo, onde destaca-se maior suscetibilidade em grãos e cereais, e, quando contaminados, costumam se localizar nas camadas mais externas do grão, onde o processo de beneficiamento pode aumentar a contaminação no produto final (PINHEIRO, R.; STEFANON, 2013; COELHO et al., 1999). Algumas das características que promovem a presença da micotoxina no alimento é a quantidade de substrato presente no grão, como aqueles que possuem maior teor de carboidratos. Cita-se ainda a predileção dos fungos a um determinado tipo de alimento, como por exemplo, alguns preferem estar em oleaginosas como o amendoim e castanhas (IAMANAKA et al., 2010). As culturas agrícolas, com destaque para os cereais, são extremamente suscetíveis ao ataque fúngico principalmente nas fases de estocagem e armazenamento. No grupo dos cereais, os fungos que se destacam são do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, cujas principais micotoxinas produzidas são os tricotecenos (com destaque para o desoxinivalenol (DON)), zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), fumonisinas e aflatoxinas dos grupos B e G (TROMBETE, 2016).

O trigo no cenário atual, vem com uma crescente importância em nível mundial, uma vez que a demanda da população por derivados desse cereal só tende a aumentar, pois constitui uma das principais fontes de nutrientes na dieta humana (NEVES, 2013; BELLUCO, 2014). As farinhas de trigo que são utilizadas com frequência em preparos tanto industriais quanto domésticos podem servir de veículo na maioria das vezes para alguns contaminantes, inclusive para as micotoxinas (VIEIRA et al., 1996). Este é um alimento com importância significativa como componente alimentício, requerendo controle de qualidade com alta eficiência quanto à contaminação micotoxicológica, mesmo que sejam submetidos à tratamento térmico específico,

uma vez que as micotoxinas se apresentam como termorresistentes (NEVES, 2013). Constitui matéria-prima para a elaboração dos alimentos de consumo diário como pães, biscoitos e massas, sendo base para a pirâmide da cadeia alimentar (BELLUCO, 2014; SANTOS et al., 2016). Seu consumo ocorre nas mais diferentes formas como farelo, farinha e gérmen (BELLUCO, 2014).

Os fungos do gênero *Fusarium* são encontrados com maior frequência na cultura do trigo, e além de causar doenças à planta, podem desencadear danos à saúde humana e animal por meio da contaminação. Os processos de fabricação de alimentos à base desse cereal, os quais obtenham resultados satisfatórios em relação aos níveis de contaminação, são considerados de extrema importância para diminuir a exposição humana à micotoxina (NIEVINSKI, 2009).

2.1 Desoxinivalenol

A micotoxina Desoxinivalenol (DON), classifica-se nos tricotecenos do grupo B e é produzida por fungos do gênero *Fusarium graminearum*, cuja ocorrência é considerada ampla nas culturas de trigo durante o cultivo no campo (SIFUENTES et al., 2011; MACHADO et al., 2016). A produção de desoxinivalenol (DON) durante o cultivo do trigo no campo depende de fatores como: susceptibilidade da cultivar, práticas culturais e condições meteorológicas (SANTOS et al., 2011). Conhecida também como vomitoxina, comumente encontrada em cereais com grãos pequenos. A ocorrência em cereais é prevalente no arroz, trigo, milho, aveia, sorgo e triticale, com menor incidência no primeiro, ocorrendo antes ou depois da colheita. Condições ambientais adequadas como 35°C e umidade de 80-90% favorecem a contaminação (FOODSAFETY BRASIL, 2013; MACHADO et al., 2016)). O Desoxinivalenol provavelmente é o metabólito mais amplamente disseminado em alimentos e rações, onde a espécie animal mais afetada é o suíno, salientando-se também que esta tem sido a toxina de *Fusarium spp.* detectada com mais frequência no mundo, bem como em maior concentração (IAMANAKA et al., 2010; SIFUENTES et al., 2011). Os tricotecenos são considerados micotoxinas do campo, produzidas na lavoura e inseridas na alimentação animal através de matérias-primas contaminadas (NIEVINSKI, 2009). Em relação ao trigo e demais cereais, a

contaminação com esses agentes produtores de DON está relacionada intimamente com a condição ambiental no campo, e esta permanece no grão mesmo após a colheita. Ainda pode-se afirmar que eventualmente haja um aumento dos níveis de contaminação no alimento durante seu armazenamento (PEREIRA, 2014). Estudos constatam que a ingestão dessa micotoxina não é considerada uma ameaça em potencial à saúde pública, com registros apenas da ocorrência de náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, cefaleia e imunossupressão. Tais sinais podem ainda se desenvolver em até 30 minutos após a exposição, com condições gastrointestinais semelhantes às que ocorrem na ingestão de toxinas de *Bacillus cereus* (LUCIOLI, 2011; SANTOS et al., 2011; LAMARDO et al., 2006). Segundo a International Agency for Research on Cancer, esta é classificada dentro do Grupo 3, considerada não carcinogênica para humanos (SANTOS et al, 2011).

2.2 Zearalenona

A Zearalenona é produzida principalmente por fungos do gênero *Fusarium graminearum*, com ocorrência principal em trigo e milho, durante os períodos prolongados de frio, alta umidade e nas épocas de colheita dos grãos (MAZIERO & BERSOT, 2010; BARBOSA, 2014). Denominar esta como toxina talvez possa ser um equívoco, uma vez que, de acordo com sua toxicidade, raramente gera micotoxicoses. A estrutura é semelhante ao 7 β -estradiol, o que justifica que seria muito mais bem classificada como um estrógeno não esteroide (EMBRAPA, 2007). Esta e seus derivados desencadeiam efeitos estrogênicos em diversas espécies animais, pela sua afinidade elevada pelos receptores de estrogênio tanto destes, quanto de humanos (MAZIERO & BERSOT, 2010; TRALAMAZZA, 2015). Como análogo do estrógeno, pode-se observar danos sérios em órgãos reprodutivos, incluindo aqui carcinomas, hiperplasias uterinas, baixa fertilidade, entre outros (TRALAMAZZA, 2015). Estudos relataram inúmeros incidentes na puberdade de crianças, sendo também um possível carcinógeno para a espécie humana (IAMANAKA et al., 2010). É importante ressaltar que a ocorrência dessa micotoxina pode ser simultânea com o desoxinivalenol (MAZIERO & BERSOT, 2010).

2.3 Legislação

A contaminação dos alimentos, independente de qual seja o destino desses é considerada um dos aspectos principais com relação à segurança do consumidor (NIEVINSKI, 2009). No território brasileiro, atualmente há legislação específica para determinar os níveis máximos de micotoxinas em diversos alimentos (MAZIERO & BERSOT, 2010). A Resolução de Diretoria Colegiada 138, de 08 de fevereiro de 2017 traz o limite máximo tolerado (LMT) em micotoxinas para os alimentos. O regulamento estabelece os limites para aflatoxinas, ocratoxina A, desoxinivalenol, fumonisinas, patulinas e zearalenona que são admitidos em alimentos tanto para a oferta ao consumidor, quanto para o fornecimento de matérias-primas. Segundo a resolução, os níveis de contaminação deverão ser tão baixos quanto possível, visando as melhores práticas na obtenção e beneficiamento dos produtos (ANVISA, 2017). A Tabela 1 mostra os valores máximos tolerados na contaminação por desoxinivalenol e zearalenona.

TABELA 1 – Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol e Zearalenona em alimentos à base de trigo.

Micotoxina	Alimento	LMT ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Zearalenona (ZEA)	Milho em grão e trigo para posterior processamento.	400
	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo.	200
Desoxinivalenol (DON)	Arroz beneficiado e derivados.	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil.	200

TABELA 1 continuação – Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol e Zearalenona em alimentos à base de trigo.

Micotoxina	Alimento	LMT (µg/Kg)
Desoxinivalenol (DON)	Trigo e milho em grãos para posterior processamento.	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1250
	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.	1000

Adaptado de: ANVISA, 2017.

2.4 Micotoxinas e Saúde Pública

No contexto atual, a evidência de micotoxinas em alimentos é correlacionada com inúmeras patologias humanas (CALDAS et al., 2002). Desta maneira, a ingestão desses alimentos contaminados gera efeitos conhecidos como micotoxicoses, que são alterações patológicas ou até funcionais causadas pela micotoxina (FERREIRA et al., 2006). A entrada no organismo humano se dá pela via oral, onde a absorção desta pode causar reações geralmente por meio de formas hemorrágicas, bem como necróticas. Geralmente possuem afinidade por determinado órgão ou tecido, com destaque para fígado, rins, cérebro, músculos e sistema nervoso. Induz a várias patologias como neoplasia, mutagênese, teratogênese, bem como imunossupressão, podendo levar a óbito (MAZIERO & BERSOT, 2010; FERREIRA et al., 2006). Neoplasias são consideradas a segunda maior causa de morte da população, consideradas assim um problema em saúde pública, uma vez que o potencial carcinógeno de metabólitos

como as micotoxinas é alto. Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer – IARC, a zearalenona e o desoxinivalenol estão classificados como carcinógenos do grupo 3, ou seja, são considerados carcinógenos animais confirmados, porém com relevância desconhecida para humanos. A ingestão a longo prazo destes costuma resultar em um desses quatro tipos de micotoxicoses: aguda, crônica, mutagênica ou teratogênica (PEREIRA & SANTOS, 2011). Ainda como um carcinógeno do grupo 3, o desoxinivalenol é uma micotoxina imunossupressora e imunotóxica, inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas, levando a síndromes hemáticas e anoréxicas em seres humanos. Alguns dos sintomas característicos do efeitos tóxicos dessa micotoxina são vômitos, diarreia, anorexia, destruição da medula óssea, entre outros, podendo ou não levar à óbito (GOES, 2013; SOUZA et al., 2017). Quanto à zearalenona, estudos já constatam que possui atividade estrogênica e anabólica, apresentando assim efeitos sobre a reprodução e também indução ao hiperestrogenismo (BOEIRA, 2012). Alguns dos efeitos mais observados incluem infertilidade, redução dos níveis de testosterona do soro, redução e incidência de gravidez, desenvolvimento precoce das mamas, prolapso vaginal, atrofia testicular e ainda edema vulvar (SOUZA et al., 2017).

Observa-se atualmente, uma preocupação crescente em relação à contaminação de alimentos com micotoxinas, incluindo estas duas que serão abordadas tanto em nível mundial quando no território brasileiro (CALORI-DOMINGUES et al., 2007). Embora ainda não existam métodos para eliminar completamente a presença dessas substâncias em alimentos e suas matérias-primas, o monitoramento torna-se instrumento essencial para a redução do teor na alimentação humana e animal. O objetivo mundial dos produtores atualmente é o conhecimento e controle da contaminação, devido ao seu impacto econômico e à necessidade de se aumentar a segurança alimentar. O trigo e seus derivados são alimentos de amplo consumo no país, tornando o controle da contaminação algo de suma importância dependendo portanto, de monitoramento contínuo aliado ao emprego de métodos caracterizados por alta sensibilidade e baixo custo, visando assim a saúde do consumidor independente da espécie (SANTOS et al., 2010).

1 **Análise de Desoxinivalenol e Zearalenona em produtos de origem integral e não-**
2 **integral: estudo comparativo.**

3 **Analysis of Deoxinivalenol and Zearalenone in products of integral and non-integral**
4 **origin: a comparative study.**

5 **Bharbara Guilhermina Marques Coelho¹ Carlos Augusto Mallmann²**

6 **RESUMO**

7 A palavra micotoxina deriva da palavra grega “*mykes*”, que significa fungo e também do latim
8 “*toxican*”, significando toxinas. A presença da micotoxina no alimento depende de inúmeros
9 fatores, incluindo aqui os nutrientes, luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar,
10 umidade relativa do substrato, não desconsiderando também os métodos de produção,
11 processamento e armazenamento. Para esse trabalho, foram obtidas no período de março de
12 2018 a dezembro de 2019, um total de 10 amostras de pães de origem integral e, 10 pães de
13 origem não integral para quantificação das micotoxinas Desoxinivalenol e Zearalenona por
14 meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE- *LC Liquid Chromatography*)
15 acoplada a espectrometria de massas (*MS – Mass Spectrometry*) (LC – MS/MS). Os resultados
16 obtidos constatam que a média geral para os pães identificados como PB e PI de 01 a 10 não
17 ultrapassa o limite máximo tolerado esperado para tais produtos, e somente dois destes com
18 níveis em média de até 26,5% além do LMT. O controle dos grãos desde o cultivo até a
19 realização do armazenamento, com o intuito de reduzir essa ocorrência e fornecer alimentos
20 adequados ao consumidor, torna-se necessário.

21 **Palavras – chave:** micotoxinas, DON, trigo.

22

23

24 ABSTRACT

25 The word mycotoxin derives from the Greek word "mykes", which means fungus and also from
26 the Latin "toxican", meaning toxins. The presence of mycotoxin in food depends on numerous
27 factors, including here the nutrients, light, oxygen, temperature, pH, relative humidity, relative
28 humidity of the substrate, not disregarding also the methods of production, processing and
29 storage. For this work, from March 2018 to December 2019, a total of 10 samples of whole-
30 grain bread and 10 breads of non-whole origin were obtained to quantify the mycotoxins
31 Deoxynivalenol and Zearalenone by means of high-performance liquid chromatography.
32 (CLAE-LC Liquid Chromatography) coupled to mass spectrometry (MS - MassSpectrometry)
33 (LC - MS / MS). The results obtained show that the general average for breads identified as PB
34 and PI from 01 to 10 does not exceed the maximum tolerated limit expected for such products,
35 and only two of them with levels on average of up to 26.5% in addition to the LMT. the control
36 of grains from cultivation to storage, in order to reduce this occurrence and provide adequate
37 food to the consumer, is necessary.

38 **Keywords:** mycotoxins, DON, wheat.

39

40 INTRODUÇÃO

41

42 A palavra micotoxina deriva da palavra grega "*mykes*", que significa fungo e também do
43 latim "*toxican*", significando toxinas. Derivam do metabolismo de fungos filamentosos,
44 constituindo um conjunto complexo de substâncias tóxicas (IAMANAKA et al., 2010). Os
45 fungos são microorganismos eucarióticos que costumam ocasionar alterações no sabor e
46 qualidade dos alimentos sendo algumas delas desejáveis, como no caso dos queijos, por
47 exemplo. Diferentes espécies podem produzir a mesma micotoxina, onde algumas apresentam

48 a característica de termorresistência (MAZIERO & BERSOT, 2010). Estudos comprovam que
49 tais metabólitos não apresentam nenhuma função no metabolismo do fungo, sendo produzidas
50 quando este atinge a sua maturidade, desenvolvendo-se em todo o tipo de alimento, sendo
51 alguns considerados melhores substratos do que outros (EMBRAPA, 2010). Sabe-se que
52 diferenciam-se das toxinas de bactérias e outros microorganismos por não serem de natureza
53 proteica ou imunogênica. Sua estrutura pode variar, como por exemplo, o peso molecular
54 (IAMANAKA et al., 2010; EMBRAPA, 2010).

55 A presença da micotoxina no alimento depende de inúmeros fatores, incluindo aqui os
56 nutrientes, luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar, umidade relativa do
57 substrato, não desconsiderando também os métodos de produção, processamento e
58 armazenamento (EMBRAPA, 2010). Podem ainda contaminar cultivos em decorrência de
59 danos aos grãos, como a quebra, causada por insetos e outros animais. A ocorrência dos
60 metabólitos costuma afetar a exportação de alimentos, produção animal e saúde humana.
61 Entram na cadeia alimentar humana ou animal por meio do consumo de cereais, oleaginosas e
62 derivados, incluindo-se aqui também o consumo de produtos de origem animal como carne,
63 leite e ovos, quando os animais são alimentados com alimento contendo a micotoxina
64 (MAZIERO & BERSOT, 2010).

65 A ocorrência da micotoxina no alimento pode ocorrer por duas maneiras: contaminação
66 direta e contaminação indireta. A primeira ocorre quando o alimento ou ração sofre
67 contaminação pelo fungo e esse produz a toxina, e a segunda ocorre quando algum dos
68 ingredientes utilizados para a produção do alimento ou ração é contaminado de maneira prévia,
69 permanecendo assim no produto final destinado ao público consumidor ou aos animais
70 (EMBRAPA 2010; SAKATA et al., 2011).

71 No atual cenário brasileiro, devido às suas condições climáticas favoráveis ao
72 desenvolvimento de fungos produtores desses metabólitos, a comercialização de alimentos

73 isentos da presença de micotoxinas tornou-se assunto com grande prioridade no quesito saúde
74 humana, exigindo controle rigoroso (SANTOS et al., 2010; MAZIERO & BERSOT, 2010). A
75 contaminação possui relatos em todas as partes do mundo, onde destaca-se maior
76 suscetibilidade em grãos e cereais, e, quando contaminados, costumam se localizar nas camadas
77 mais externas do grão, onde o processo de beneficiamento pode aumentar a contaminação no
78 produto final (PINHEIRO, R.; STEFANON, 2013; COELHO et al., 1999).

79 No grupo dos cereais, os fungos que se destacam são do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e
80 *Fusarium*, cujas principais micotoxinas produzidas são os tricotecenos (com destaque para o
81 desoxinivalenol (DON)), zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), fumonisinas e aflatoxinas
82 dos grupos B e G (TROMBETE, 2016).

83 O trigo no cenário atual, vem com uma crescente importância em nível mundial, uma vez
84 que a demanda da população por derivados desse cereal só tende a aumentar, pois constitui uma
85 das principais fontes de nutrientes na dieta humana (NEVES, 2013; BELLUCO, 2014). Sendo
86 assim, apresenta-se como matéria-prima para a elaboração dos alimentos de consumo diário
87 como pães, biscoitos e massas, sendo base para a pirâmide da cadeia alimentar (BELLUCO,
88 2014; SANTOS et al., 2010). Seu consumo ocorre nas mais diferentes formas como farelo,
89 farinha e gérmen (BELLUCO, 2014).

90 Os fungos do gênero *Fusarium* são encontrados com maior frequência na cultura do trigo,
91 e além de causar doenças à planta, podem desencadear danos à saúde humana e animal por meio
92 da contaminação. Os processos de fabricação de alimentos à base desse cereal, os quais
93 obtenham resultados satisfatórios em relação aos níveis de contaminação, são considerados de
94 extrema importância para diminuir a exposição humana à micotoxina (NIEVINSKI, 2009).

95 O objetivo do presente trabalho, tendo em vista a grande probabilidade de contaminação
96 dos grãos por este fungo, foi avaliar a presença de Desoxinivalenol e Zearalenona em produtos

97 de origem integral e não integral, realizando assim um estudo comparativo, bem como, visa-se
98 obter dados a respeito da exposição humana à estes metabólitos.

99

100 **MATERIAL E MÉTODOS**

101 **Amostras**

102 Foram obtidas no período de março de 2018 a dezembro de 2019, um total de 10 amostras
103 de pães de origem integral e, 10 pães de origem não integral em diversos hipermercados da
104 cidade de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul. As análises de Desoxinivalenol e de
105 Zearalenona nestas foram realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC),
106 na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

107

108 **Padrões e Solventes**

109 Os padrões de DON (Dom -1) e de ZEA (Z-lanol 50 ppm) são fabricados no laboratório
110 pela profissional responsável formada em Química. O metanol utilizado foi fornecido pela J.T.
111 Baker (Deventer, The Netherlands). Todos os solventes foram de grau HPLC. A água ultrapura
112 utilizada foi obtida a partir de um aparelho de Milli-Q.

113 **Preparo da Amostra**

114 As amostras obtidas foram encaminhadas sob condições de armazenamento adequadas
115 para o laboratório, onde deram entrada e primeiramente passaram por um processo de secagem
116 na estufa. Após o processo de secagem, a mesma foi triturada e homogeneizada. Três gramas
117 dessa amostra foram extraídos em agitadores tipo vórtex com 24ml da mistura de solventes
118 contendo metanol:água (70:30, v/v). Tais extratos foram diluídos em uma mistura de fase

119 aquosa (água: acetato de amônio), fase orgânica (água: acetato de amônio: metanol) (50:50,
120 v/v).

121

122 **Determinação de DON e ZEA**

123 Após a diluição, o extrato diluído será submetido à separação por cromatografia líquida,
124 seguido de detecção por espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). As substâncias Dom
125 -1 (1000 ppb) e Z-lanol (50 ppm) são utilizados como padrão interno. Para a quantificação das
126 micotoxinas, foi preparada uma curva de calibração com sete pontos. O equipamento
127 empregado é um cromatógrafo HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies) acoplado a um
128 Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupólo 4000 TRAP.

129 Para composição das fases móveis foram utilizados metanol, água, acetonitrila, acetato
130 de amônio, ácido fórmico e ácido acético. As colunas para a separação cromatográfica são:
131 Gemini C18 Phenomenex (50 x 4,6 mm 5 µm), Agilent Zorbax Eclipse C8 (4,6 x 150 mm 5
132 µm), Agilent Zorbax Eclipse C18 (4,6 x 150 mm 5 µm), Agilent Zorbax Eclipse C18 (2,1 x 100
133 mm 1,8 µm).

134

135

136 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

137 No período compreendido entre março de 2018 e dezembro de 2019, foram analisadas
138 portanto, 10 amostras de pães brancos e, 10 amostras de pães integrais, todas provenientes de
139 mercados e hipermercados instalados na cidade de Santa Maria, no estado do Rio Grande do
140 Sul, para detecção de Desoxinivalenol (DON) e Zearalenona (ZEA). A entrada destas na cadeia
141 alimentar humana, dá-se pelo consumo de produtos derivados do trigo (MAZIERO &

142 BERSOT, 2010). Na literatura, encontram-se resultados que confirmam a contaminação por
 143 micotoxinas em grãos e derivados deste. O fato de que a cada safra deste cereal a ocorrência do
 144 Desoxinivalenol é em níveis diferentes, confirma, portanto que há relação entre as condições
 145 climáticas e de armazenamento do grão (GOES, 2013).

146 A média de contaminação das amostras analisadas para DON, confirma que há
 147 contaminação tanto para os pães não integrais, quanto para os pães integrais, e estão
 148 apresentadas na tabela abaixo.

149 **TABELA 2 – Resultado das análises de DON para pães integrais e pães não integrais**

PÃO BRANCO	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	PÃO INTEGRAL	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
PB 01	681	PI 01	618
PB 02	908	PI 02	648
PB 03	1260	PI 03	226
PB 04	756	PI 04	218
PB 05	1000	PI 05	581
PB 06	598	PI 06	422
PB 07	863	PI 07	467
PB 08	196	PI 08	512
PB 09	1270	PI 09	1000
PB10	650	PI 10	684
Média ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	818,2	Média ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	537,6

150

151 De acordo com a RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017, os limites máximos tolerados
 152 (LMT) para a contaminação por DON estão fixados como 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em produtos de
 153 panificação (ANVISA, 2017). Como pode-se observar na Tabela 2, a média geral para os pães
 154 identificados como PB e PI de 01 a 10 não ultrapassa o limite máximo tolerado esperado para
 155 tais produtos. Vale ainda ressaltar que dois dos pães analisados (PB 03 e 09) apresentam

156 contaminação levemente aumentada pela micotoxina, situando-se entre uma média de até
157 26,5% além do limite máximo tolerado previsto. De acordo com alguns autores brasileiros, há
158 a ocorrência de desoxinivalenol em trigo e derivados de trigo, com variação de 82 a 600 µg/kg,
159 com média encontrada de 296,3 µg/kg (SANTOS, 2018), o que não se constata nas análises
160 realizadas. Nos últimos anos, observou-se um aumento significativo quanto à presença de DON
161 em trigo brasileiro, isso relacionado às diferentes condições das últimas safras, gerando um
162 favorecimento do crescimento fúngico. É importante mencionar que não somente os pães e
163 massas alimentícias são os responsáveis pela introdução de DON na dieta, porém, são os mais
164 frequentes (SANTOS et al., 2011). As amostras analisadas também para ZEA, apresentaram
165 nível de contaminação máximo na média de 1,94 µg/kg, situando-se portanto, dentro dos limites
166 máximos tolerados para a micotoxina, cujo é até 100 µg/kg, de acordo com a ANVISA (2017).

167 CALORI-DOMINGUES et al. (2007), em um trabalho realizado com amostras
168 provenientes do estado do Rio Grande do Sul, incluindo aqui grãos de trigo e derivados,
169 constatou que a DON predominou, com ocorrência em 55% das amostras analisadas em níveis
170 que variaram de 400 a 590 µg/kg. Ainda que, mais da metade das amostras de trigo nacional
171 sejam positivas, porém com níveis dentro do limite máximo tolerado, o mesmo autor ainda
172 afirma que aproximadamente 4% das amostras apresentaram contaminação em níveis acima de
173 1250 µg/kg.

174 DA SILVA et al. (2016) ao avaliar produtos para uso em panificação da região do médio
175 e alto Uruguai, obteve 100% de contaminação das amostras analisadas, com níveis variando
176 entre 76,7 e 3630,2 µg/kg.

177 SANTOS et al. (2011), pesquisou em grãos de trigo de dois estados, sendo eles Paraná e
178 Rio Grande do Sul, respectivamente 21 e 15 amostras. Nesse total de 36 amostras, houve
179 detecção de DON em aproximadamente 72,2% destas, com uma média de 321,59 µg/kg,
180 variando entre contaminação não detectável a 1592,21 µg/kg.

181 CONCLUSÃO

182 Diante dos resultados obtidos, é inegável o fato de que há contaminação dos produtos
183 originados do trigo, alguns inclusive ultrapassando os níveis estabelecidos. Sendo assim,
184 considera-se que a estratégia adequada é o conhecimento e a educação continuada de
185 produtores, a fim de que possam ser adotadas medidas preventivas nas várias etapas da
186 produção do grão, de modo que possa vir a ser uma ferramenta eficaz no controle de
187 micotoxinas.

188 Embora ainda, 75% das amostras analisadas apresentem determinada contaminação por
189 DON abaixo do limite máximo tolerado admitido pela legislação brasileira, o controle dos grãos
190 desde o cultivo até a realização do armazenamento, com o intuito de reduzir essa ocorrência e
191 fornecer alimentos adequados ao consumidor, torna-se necessário.

192

193 REFERÊNCIAS

194 ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC N° 138 de 08 de fevereiro de 2017.**

195 Disponível em: <

196 [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0)

197 [43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0)>. Acesso em: 10 de fev de 2020.

198 BELLUCO, B. **Distribuição de desoxinivalenol nas frações de trigo obtidas no processo de**
199 **moagem.** p. 99, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Escola
200 Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2009.

201 CALORI-DOMINGUES, M. A. et al. **Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e**
202 **importado utilizado no Brasil.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 181–185,
203 2007.

204 COELHO, C. S. P.; FURLONG, E. B.; ALMEIDA, T. L. **Migração de Micotoxinas Durante**
205 **a Parboilização do Arroz.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 2, p. 39–44, 1999.

- 206 DA SILVA, R. C. et al., **Determinação de desoxinivalenol em farinhas de trigo utilizadas**
207 **em panificadoras da região do médio e alto Uruguai/RS.** Trabalho apresentado no XXV
208 Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 24 a 27 de outubro de 2016,
209 FAURGS, Gramado/RS.
- 210 EMBRAPA. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal.**
211 48p. 2010. Disponível em: < [https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/427374/micotoxinas-importancia-na-alimentacao-e-na-saude-humana-e-animal)
212 [/publicacao/427374/micotoxinas-importancia-na-alimentacao-e-na-saude-humana-e-animal](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/427374/micotoxinas-importancia-na-alimentacao-e-na-saude-humana-e-animal)>.
213 Acesso em: 09 fev 2020.
- 214 GOES, M. M. **Pães brancos e integrais comercializados na cidade de Ponta Grossa – PR.**
215 p. 31, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
216 Paraná, 2013.
- 217 IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. **Micotoxinas em alimentos.** Anais
218 da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. Vol 7, p. 138-161, 2010.
- 219 MAZIERO, M. T., BERSOT, M. S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no brasil.** Revista
220 Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.
- 221 NEVES, J. A. **Interferência da farinha de trigo na qualidade micológica e micotoxicológica**
222 **do pão tipo francês.** p. 70, 2013. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) -
223 Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2013.
- 224 NIEVINSKI, P. **Trigo: do grão à farinha (uma revisão sobre o deoxinivalenol).** *Monografia.*
225 UFRGS, Porto Alegre, 2009.
- 226 PINHEIRO, R.; STEFANON, E. B. C. **Presença de aflatoxinas por cromatografia líquida**
227 **de alta eficiência (CLAE) em cereais matinais adquiridos no comércio do município de**
228 **Santa Maria - RS.** *Disciplinarium Scientia: Série Ciências da Saúde*, v. 14, p. 39–45, 2013.
- 229 SAKATA, R. A. P.; SABBAG, S. P.; MAIA, J. T. L. S. **Ocorrência de aflatoxinas em**
230 **produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades.** *Enciclopédia Biosfera*, v. 7, p.
231 1477–1498, 2011.
- 232 SANTOS, J. F. **Ocorrência de desoxinivalenol em amostras de trigo e derivados de trigo.**
233 Curso de especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Instituto Adolfo Lutz,
234 São Paulo, 2018.

- 235 SANTOS, J. S. et al. **Zearalenona e desoxinivalenol em trigo brasileiro – cenário sobre**
236 **necessidade de monitoramento analítico.** Revista Biosáude, v. 12, p. 31–46, 2010.
- 237 SANTOS, J. S. et al. **Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo.**
238 Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.32, n. 4, p. 1439-1450, out./dez. 2011.
- 239 TROMBETE, F. M. **Micotoxinas em grão de trigo: ocorrência, efeitos da ozonização e**
240 **determinação de uma forma modificada do desoxinivalenol.** p.118, 2016. Tese (Doutorado
241 em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural
242 do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

4. REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada – RDC N° 138 de 08 de fevereiro de 2017.** Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0>. Acesso em: 17 out 2018.
- BARBOSA, C. B. **Microflora e ocorrência de micotoxinas em grãos de trigo recém-colhidos e armazenados.** p. 139, 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BELLUCO, B. **Distribuição de desoxinivalenol nas frações de trigo obtidas no processo de moagem.** p. 99, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2009.
- BOEIRA, S. P. **Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos.** p. 1–101, 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul, 2012.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. **Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana.** Revista Saúde Pública, v. 36, n. 3, p. 319–323, 2002.
- 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.
- COELHO, C. S. P.; FURLONG, E. B.; ALMEIDA, T. L. **Migração de Micotoxinas Durante a Parboilização do Arroz.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 2, p. 39–44, 1999.
- EMBRAPA. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal.** 48p. 2010. Disponível em: <
<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/427374/micotoxinas-importancia-na-alimentacao-e-na-saude-humana-e-animal>>. Acesso em: 15 nov 2018.
- FERREIRA, H. et al. **Aflatoxinas: Um risco a saúde humana e animal.** Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, v. 2, n. 1, p. 113–127, 2006.

FOODSAFETY BRASIL. **Desoxinivalenol, a micotoxina mais conhecida como DON.** Disponível em: < <https://foodsafetybrazil.org/desoxinivalenol-micotoxina-mais-conhecida-como-don/>>. Acesso em: 16 out 2018.

GOES, M. M. **Pães brancos e integrais comercializados na cidade de Ponta Grossa – PR.** p. 31, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2013.

LUCIOLI, J. **Efeitos sistêmicos da contaminação por Desoxinivalenol , Fumonisina B e sua associação em suínos.** 2011. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2011.

MAZIERO, M. T., BERSOT, M. S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no brasil.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.

NEVES, J. A. **Interferência da farinha de trigo na qualidade micológica e micotoxicológica do pão tipo francês.** p. 70, 2013. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2013.

NIEVINSKI, P. **Trigo: do grão à farinha (uma revisão sobre o deoxinivalenol).** *Monografia.* UFRGS, Porto Alegre, 2009.

PEREIRA, L. T. P. **Desoxinivalenol na farinha de trigo: Otimização de método analítico, validação e ocorrência.** p. 134, 2014. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Ílio de Mesquita Filho, São Paulo, 2014.

PINHEIRO, R.; STEFANON, E. B. C. **Presença de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cereais matinais adquiridos no comércio do município de Santa Maria - RS.** *Disciplinarium Scientia: Série Ciências da Saúde*, v. 14, p. 39–45, 2013.

SAKATA, R. A. P.; SABBAG, S. P.; MAIA, J. T. L. S. **Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades.** *Enciclopédia Biosfera*, v. 7, p. 1477–1498, 2011.

SANTOS, J. S. et al. **Zearalenona e desoxinivalenol em trigo brasileiro – cenário sobre necessidade de monitoramento analítico.** *Revista Biosáude*, v. 12, p. 31–46, 2010.

SIFUENTES, J. et al. **Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo.** *Ciência dos Alimentos*, p. 1439–1450, 2011.

SOUZA, D. R. et al. **Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos**. Revinter, p. 73–84, 2017.

TRALAMAZZA, S. M. **Diversidade fúngica , análise polifágica do gênero *Fusarium* e determinação de desoxinivalenol e zearalenona em em grãos de trigo de diferentes regiões do Brasil**. p. 21, 2015. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

TROMBETE, F. M. **Micotoxinas em grão de trigo: ocorrência, efeitos da ozonização e determinação de uma forma modificada do desoxinivalenol**. p.118, 2016. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

VIEIRA, A. P. et al. **Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais**. [s.l: s.n.]