

**Secretaria de Estado da Saúde  
Coordenadoria de Controle de Doenças  
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de Especialização  
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

**Juliana Feliciano dos Santos**

**OCORRÊNCIA DE DESOXINIVALENOL EM AMOSTRAS DE  
TRIGO E DERIVADOS DE TRIGO**

**São Paulo**

**2018**

**Juliana Feliciano dos Santos**

**OCORRÊNCIA DE DESOXINIVALENOL EM AMOSTRAS DE  
TRIGO E DERIVADOS DE TRIGO**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz - Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP - Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientadora: Dra. Adriana Palma de Almeida

**São Paulo**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Santos, Juliana Feliciano dos  
Ocorrência de desoxinivalenol em amostras de trigo e derivados de trigo/ Juliana Feliciano dos Santos– São Paulo, 2019.  
46 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Contaminantes Químicos: Química Analítica e Saúde Humana para Saúde Pública  
Orientação: Profa. Dra. Adriana Palma de Almeida

1-Trigo, 2-Micotoxinas, 3-Tricotecenos,4-Desoxinivalenol, 5- Ocorrência

SES/CEFOR/IAL-11/2019

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e minha família por tudo.

Ao Alexandre pelo companheirismo, ajuda e paciência.

A Dra. Adriana Palma de Almeida pela orientação, apoio e toda a estrutura dada para que esse trabalho fosse realizado.

A Simone Alves da Silva, Valter Ruvieri e Leda Conceição Antonia Lamardo que contribuíram com o conhecimento, ajuda na parte experimental e revisão do trabalho.

Aos colegas do Núcleo de Contaminantes Orgânicos: Sueli, Nice, Luzia e Ana pela convivência e disposição em ajudar.

As diretoras Janete Alaburda e Iracema de Albuquerque Kimura pelo apoio.

As coordenadoras, colegas e colaboradores do Curso de Especialização.

Aos colaboradores do Instituto Adolfo Lutz e CEFOR.

A Secretaria Estadual da Saúde (SES-SP) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

A principal micotoxina encontrada no trigo é o desoxinivalenol ou “vomitoxina”, um membro do grupo dos tricotecenos do tipo B. A ingestão é a principal via de exposição ao desoxinivalenol. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, não há evidências para a carcinogenicidade em humanos e animais, no entanto, essa micotoxina pode causar uma série de efeitos crônicos e agudos, principalmente em suínos. Com o intuito de controlá-la, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. Assim, este trabalho foi desenvolvido para avaliar a ocorrência de desoxinivalenol em amostras de trigo e derivados de trigo comercializadas na cidade de São Paulo. Ao todo foram analisadas 37 amostras, sendo 9 de trigo em grão, 9 de trigo para quibe, 9 de farinha de trigo e 10 de farelo de trigo. A extração da micotoxina foi realizada com água ultrapura e a limpeza com colunas de imunoafinidade. Na detecção/quantificação empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível. Das 37 amostras analisadas, 21 (56,7%) estavam contaminadas com níveis de desoxinivalenol variando de 200 a 3045,12 µg/kg. O trigo em grão, a farinha de trigo e 8 amostras de trigo para quibe apresentaram baixos níveis de contaminação. No entanto, 100% das amostras de farelo de trigo estavam contaminadas e apresentaram níveis maiores de contaminação, variando de 756,74 a 3045,12 µg/kg. Possivelmente a maior concentração de desoxinivalenol no farelo se deve a redistribuição e concentração da micotoxina em certas frações de moagem do trigo. Ao todo 3 (8,1%) amostras estavam acima do limite de 1250 µg/kg estabelecidos pela legislação, 2 de farelo de trigo e 1 de trigo para quibe. A partir de 1º de janeiro de 2019 esse limite passará para 1000 µg/kg, e se já estivesse em vigor, 6 (16,2%) amostras estariam condenadas. O estudo requer mais dados para chegar a uma conclusão mais precisa sobre a exposição da população ao desoxinivalenol.

**Palavras-chave: trigo, micotoxinas, tricotecenos, desoxinivalenol, ocorrência.**

## ABSTRACT

The main mycotoxin found in wheat is deoxynivalenol or "vomitoxin", a member of the trichothecenes group type B. Ingestion is the main route of exposure to deoxynivalenol. According to the International Agency for Research on Cancer, there is no evidence of carcinogenicity in humans and animals, however, this mycotoxin can cause a number of chronic and acute effects, especially in swine. In order to control it, the Health Surveillance Agency of Brazil established the maximum tolerated limits of mycotoxins in food. Thus, this work was developed to evaluate the occurrence of deoxynivalenol in samples of wheat and wheat products marketed in the city of São Paulo. In total, 37 samples were analyzed, 9 of them were wheat grain, 9 of bulgur wheat, 9 of wheat flour, and 10 of wheat bran. Mycotoxin extraction was performed with ultrapure water and immunoaffinity columns for sample clean-up. High-performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detector was used for the detection/quantification. In 37 analyzed samples, 21 (56.7%) were contaminated with deoxynivalenol levels ranging from 200 to 3045.12 µg/kg. Wheat grain, wheat flour, and 8 bulgur wheat samples showed low levels of contamination. However, 100% of wheat bran samples were contaminated and showed higher levels of contamination, ranging from 756.74 to 3045.12 µg/kg. Possibly the highest concentration of deoxynivalenol in the bran is due to redistribution and concentration of the mycotoxin in certain milling fractions. In total, 3 (8.1%) samples were above the limit of 1250 µg/kg established by legislation, 2 of wheat bran and 1 of bulgur wheat. In January 1, 2019 the limit will be reduced to 1000 µg/kg. If it was already in force, 6 (16.2%) samples would exceed that limit. The study requires more data to reach a more accurate conclusion about the exposure of population to deoxynivalenol.

**Keywords: wheat, mycotoxins, trichothecenes, deoxynivalenol, occurrence.**

## LISTA DE TABELAS

### Página

Tabela 1 - Ocorrência de desoxinivalenol em cereais e derivados.....	19
Tabela 2 - Métodos utilizados para extração, limpeza e quantificação de DON.....	20
Tabela 3 - Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para DON. ....	22
Tabela 4 - Parâmetros de validação da metodologia de DON para trigo e derivados de trigo. ....	29
Tabela 5 - Concentrações de DON em amostras de trigo em grão, farelo de trigo, trigo para quibe e farinha de trigo.....	31
Tabela 6 - Ocorrência de DON nas amostras positivas de trigo em grão (TG), trigo para quibe (TQ), farelo de trigo (FT) e farinha de trigo (F). ....	32
Tabela 7 - Ocorrência de DON em trigo em grão, farinha de trigo, farelo de trigo e trigo para quibe.....	35

## LISTA DE FIGURAS

### Página

Figura 1 - Estrutura das aflatoxinas, fumonisina B1, OTA, ZEA, patulina e DON. ...	15
Figura 2 - Estrutura comum dos tricotecenos e os principais tipos.....	16
Figura 3 - Estrutura química do DON. ....	17
Figura 4 - Sistema de automação de extração em fase sólida GX-274 ASPEC. ....	27
Figura 5 - Espectro de DON. ....	28
Figura 6 - (a) Curva analítica de DON na faixa de concentração de 50 a 1000 ng/mL e (b) cromatograma dos 7 níveis da curva. ....	30
Figura 7 - Distribuição das amostras positivas de acordo com as faixas de concentração de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).....	32
Figura 8 - Cromatogramas dos extratos das amostras TQ2, FT6 e FT9.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-AcDON	3-acetil-desoxinivalenol
15-AcDON	15-acetil-desoxinivalenol
ACN	acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA	Boas Práticas Agrícolas
C18	octadecilsilano
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CF	fator de correção do espectrofotômetro
CLAE-UV/Vis	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta/Visível
CLAE-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo
CLUE-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DAS	diacetoxiscirpenol
DON	desoxinivalenol
DON-3-Glc	desoxinivalenol-3-glicosídeo
F	farinha de trigo
FAO	Food and Agriculture Organization
FT	farelo de trigo
GC-ECD	Cromatografia Gasosa com detector de Captura de Elétrons
GCB	Graphitized Carbon Black
GMA-DVB	Glycidyl Methacrylate-Divinylbenzene
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IARC	International Agency for Research on Cancer
ILSI	International Life Science Institute
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LMT	Limites Máximos Tolerados
M	massa de trigo pesada
MM	massa molar

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MeOH	metanol
NIV	nivalenol
OASIS™ HLB	OASIS™ Hydrophilic-Lipophilic Balance
OTA	ocratoxina A
PBS	Phosphate Buffered Saline
PSA	Primary Secondary Amine
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	rotações por minuto
TG	trigo em grão
TQ	trigo para quibe
UR	Umidade Relativa
ZEA	zearalenona

## LISTA DE SÍMBOLOS

H	hidrogênio
OH	hidroxila
OCOCH <sub>3</sub>	O-acetil
OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	O-isovaleril
OCOCH=CHCH <sub>3</sub>	O-crotonil
$\varepsilon$	absortividade molar
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
$\lambda$	comprimento de onda
N <sub>2</sub>	nitrogênio
Abs	absorbância
Abs <sub>média</sub>	absorbância média
b	caminho óptico
r	coeficiente de correlação
r <sup>2</sup>	coeficiente de determinação
C <sub>1</sub>	concentração de DON expressa em ng/mL ou ng/g
C <sub>2</sub>	concentração obtida na corrida cromatográfica
A <sub>w</sub>	Atividade de água
μg	micrograma
kg	quilograma
CV	coeficiente de variação
ng	nanograma
mg	miligrama
μm	micrômetro
mL	mililitro
min	minuto
μL	microlitro
C	carbono

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	13
2.1. Micotoxinas.....	13
2.2. Tricotecenos .....	16
2.2.1. Desoxinivalenol.....	17
2.3. Legislação.....	22
2.4. Justificativa .....	23
2.5. Objetivos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1. Materiais e reagentes .....	25
3.2. Amostras.....	25
3.3. Preparação da solução padrão e curva analítica.....	25
3.4. Preparo da amostra e quantificação .....	26
3.4.1. Etapa de extração.....	26
3.4.2. Etapa de limpeza ( <i>clean-up</i> ), concentração e quantificação .....	26
3.5. Condições cromatográficas .....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1. Concentração da solução padrão e curva analítica .....	28
4.2. Parâmetros de validação da metodologia.....	29
4.3. Curva analítica.....	29
4.4. Ocorrência de DON em amostras de trigo e produtos de trigo.....	31
5. CONCLUSÃO .....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

O trigo é um dos produtos fundamentais para a alimentação humana, e está intimamente relacionado com o surgimento da civilização. Existem cerca de 30.000 variedades de trigo e 14 espécies são cultivadas no mundo. No entanto, somente 1.000 variedades tem importância comercial (POSNER; HIBBS, 2005). O trigo é uma gramínea que pertence à família *Poaceae*, e atualmente três espécies são mais comumente cultivadas: *Triticum aestivum*, *T. compactum* e *T. durum*. O *Triticum aestivum* ou trigo comum é um hexaploide, e corresponde a mais de 90% do trigo produzido no mundo (FINNIE; ATWELL, 2016). O cereal é versátil podendo ser utilizado para a produção de vários produtos como farinhas, massas, biscoitos, bolos, pães, e também pode ser incorporado em rações de animais.

A previsão de produção mundial de trigo para 2018/2019 e exportação é de 725,1 e 172,5 milhões de toneladas, respectivamente, sendo que os maiores produtores são países da União Europeia, China, Índia, Rússia, Estados Unidos, Canadá e Ucrânia (AMIS, 2018). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a produção média anual do Brasil foi de 5,4 milhões de toneladas nos últimos 10 anos, no entanto, a quantidade produzida não supre a demanda interna. Os principais produtores são os estados do Paraná e Rio Grande do Sul, que atualmente são responsáveis por aproximadamente 90% da produção brasileira de trigo. De janeiro a dezembro de 2018 o Brasil importou aproximadamente 6,8 milhões de toneladas de trigo e os principais países exportadores foram Argentina (87,13%), Paraguai (4,99%), Estados Unidos (4,01%), Canadá (2,89%), Uruguai (0,45%), e outros (0,53%) (CONAB, 2018).

Fungos patogênicos, como espécies do gênero *Fusarium*, podem provocar doenças como a giberela ou fusariose, responsáveis pela redução da qualidade e rendimento das culturas de trigo. Além disso, esses fungos podem produzir micotoxinas (MARIN et al., 2013). A produção de micotoxinas depende de condições favoráveis para o desenvolvimento dos fungos e pode ocorrer nas várias etapas da produção agrícola. A principal micotoxina encontrada no trigo é o desoxinivalenol, que é responsável por provocar efeitos tóxicos em seres humanos e animais. Diante desse contexto o trabalho buscou avaliar amostras de trigo e derivados de trigo quanto à contaminação por desoxinivalenol.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Micotoxinas

Micotoxinas - deriva da palavra grega “*múkes*” que significa mofo e da palavra latina “*toxicum*” que significa veneno - são metabólitos secundários produzidos por diversos fungos filamentosos, dentre eles destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachibotrys* e *Claviceps*. Na década de 60 começou a despertar interesse no meio científico sobre suas implicações para a saúde humana e animal após a morte de 100.000 perus na Inglaterra que consumiram ração contendo amendoim contaminado por aflatoxinas (FONSECA, 1975; RAWAL; COULOMBE JR, 2011; WANNOP, 1961). Estima-se que mais de 1.000 micotoxinas já foram identificadas e esse número possivelmente crescerá devido ao aumento de publicações, e maior interesse dos centros de pesquisa nos últimos anos (BRÄSE et al., 2013; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

A produção de micotoxinas pode ocorrer nas etapas de pré-colheita, colheita, secagem, armazenamento ou transporte (MARIN et al., 2013). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization* - FAO) estima-se que anualmente cerca 25% das plantações estejam contaminadas com micotoxinas. Isso é preocupante, pois a presença desses contaminantes acima de níveis aceitáveis pode resultar em perdas econômicas significativas para os países, tais como: redução do rendimento e valor das culturas, perda da produtividade animal e custos relacionados à saúde humana (MATNY, 2015).

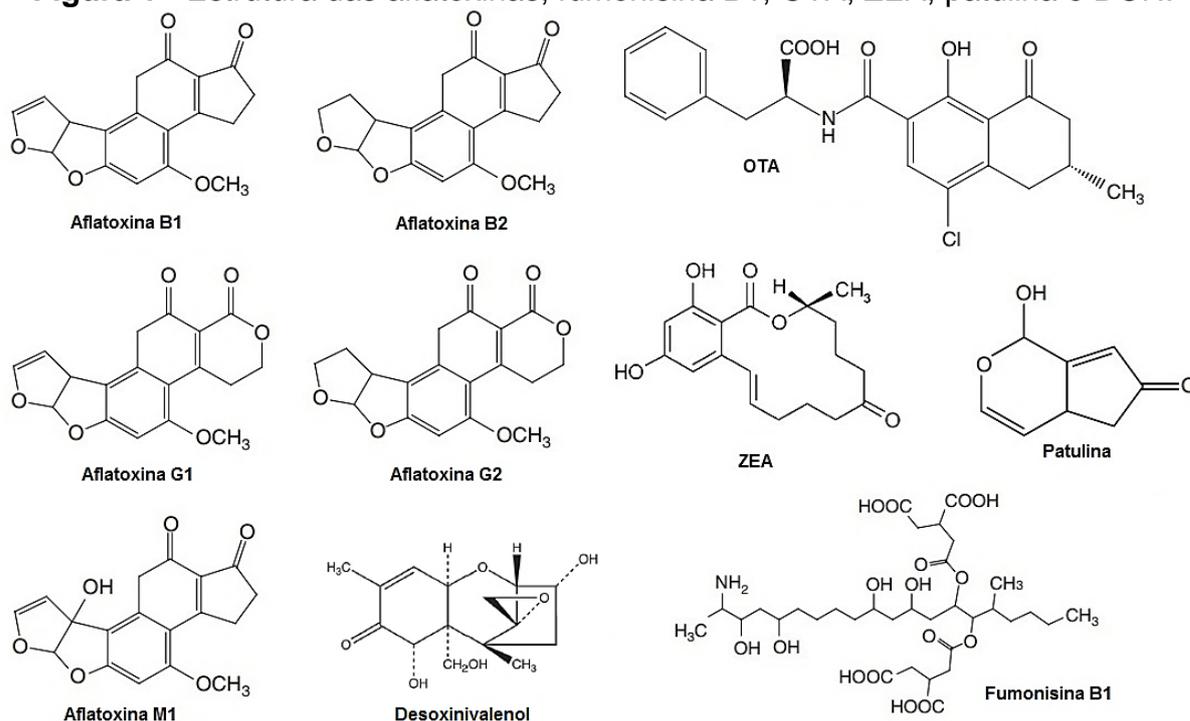
A produção de micotoxinas depende de fatores intrínsecos (características próprias dos alimentos) e fatores extrínsecos (condições ambientais) dentre eles destacam-se (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2007; BARCELÓ et al., 2008; BIANCHINI et al., 2009; CAST, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2005; MALLMANN; DILKIN, 2007; PITT; HOCKING, 2009; SCUSSEL, 1998; SWEETS, 2018):

- Região de cultivo: predominam em regiões tropicais e subtropicais;
- Composição do alimento: substratos ricos em carboidratos e lipídios são mais suscetíveis a ataques de fungos;

- Temperatura;
- pH: preferencialmente levemente ácido, no entanto, podem crescer em uma ampla faixa de pH;
- Atividade de água ( $A_w$ ): parâmetro que mede a água livre do alimento disponível para reações enzimáticas, químicas e crescimento dos micro-organismos. Considera-se que para a proliferação de qualquer micro-organismo a  $A_w$  deve estar entre 0,60 e 1. O limite inferior relatado na literatura para o crescimento de fungos que produzem micotoxinas é ~ 0,78. Normalmente, os valores mínimos de atividade de água para produção de micotoxinas são mais elevados que os valores mínimos para o crescimento dos fungos. Assim, a redução da  $A_w$  pode inibir a produção de micotoxinas, sem necessariamente limitar o desenvolvimento dos fungos;
- Umidade Relativa (UR): pode alterar a  $A_w$  do alimento favorecendo ou não a multiplicação de fungos. Os alimentos tem tendência a absorver umidade do ambiente se  $A_w < UR$ ;
- Teor de umidade: quantidade total de água no alimento, geralmente é expressa como uma porcentagem do peso total. Deve estar acima de 12,5%;
- Dano mecânico: facilita o acesso de fungos aos nutrientes de grãos, sementes ou plantas danificadas;
- Competição entre micro-organismos: inibe o crescimento de fungos, pois competem por espaço e nutrientes e, conseqüentemente, afetam a produção de micotoxinas (por exemplo, bactérias ácido-láticas).

As principais micotoxinas que são motivo de preocupação mundial são: as aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), fumonisinas (B1 e B2), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), patulina e desoxinivalenol (DON) (Figura 1). A ingestão, inalação ou contato dermal com micotoxinas podem provocar efeitos agudos e crônicos na saúde de seres humanos e animais, conhecidos como micotoxicoses. Estudos indicam que embora a pele seja uma barreira natural, micotoxinas com caráter hidrofóbico podem penetrá-la, especialmente, em casos de exposição ocupacional ou acidental (BOONEN et al., 2012). A inalação de poeiras provenientes do processamento de alimentos contaminados com aflatoxinas pode ter contribuído para a incidência de câncer em trabalhadores holandeses, um caso de exposição ocupacional (HAYES, 1984).

**Figura 1** - Estrutura das aflatoxinas, fumonisina B1, OTA, ZEA, patulina e DON.



Fonte: BARCELÓ et al., 2008 (modificado).

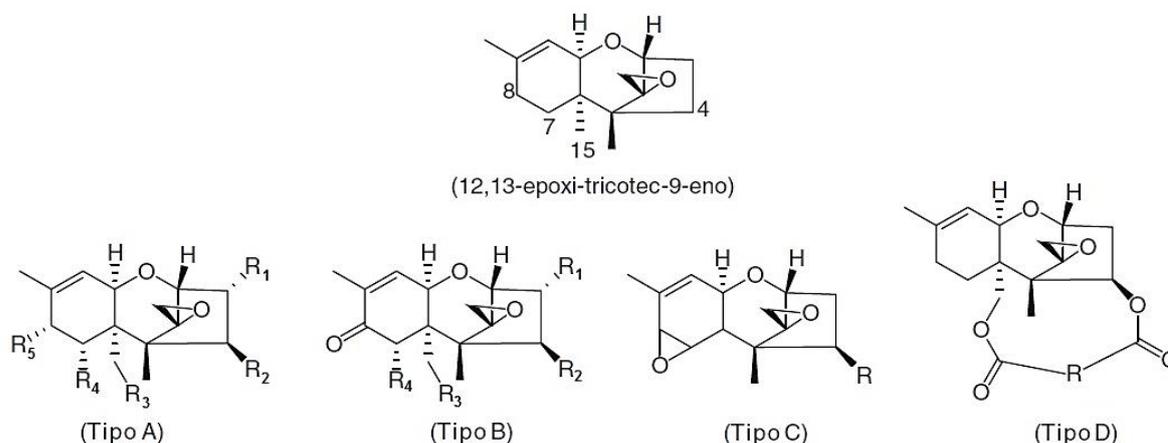
Seres humanos e animais também estão expostos aos derivados das micotoxinas que surgem por vários mecanismos, esses podem não ser detectados pelos métodos analíticos convencionais. As micotoxinas e seus derivados foram classificados da seguinte forma para um melhor entendimento: micotoxinas livres, associadas à matriz e modificadas. As micotoxinas livres ou “não modificadas” ou “nativas” são os metabólitos secundários tóxicos produzidos por vários fungos. Compostos acetilados derivados do desoxinivalenol como o 3-acetil-desoxinivalenol (3-AcDON) e 15-acetil-desoxinivalenol (15-AcDON), também são incluídos nessa categoria. As micotoxinas associadas à matriz são micotoxinas ligadas covalentemente ou não aos constituintes da matriz, como carboidratos e proteínas. O “aprisionamento físico” de fumonisinas é um caso de interação não-covalente que é considerado um problema analítico, pois torna-se difícil estimar os níveis reais de fumonisinas. As micotoxinas modificadas são caracterizadas por modificações químicas ou biológicas na sua estrutura química. As micotoxinas modificadas quimicamente podem ser termicamente formadas ou não, por exemplo, a formação pode ocorrer durante o processamento térmico de alimentos e rações, ou sob condições alcalinas e sem tratamento térmico. As micotoxinas modificadas biologicamente são micotoxinas funcionalizadas ou conjugadas. Um exemplo do primeiro grupo é a conversão da

aflatoxina B1 no fígado de humanos e animais em um metabólito altamente reativo que pode formar adutos de DNA. Os conjugados podem ser produzidos por plantas, animais, fungos, etc. No entanto, segundo a *International Life Science Institute* (ILSI) somente os conjugados de plantas são denominados de micotoxinas “mascaradas”, um exemplo é o metabólito desoxinivalenol-3-glicosídeo (DON-3-Glc) (DALL’ASTA; BERTHILLER, 2016; RYCHLIK et al., 2014).

## 2.2. Tricotecenos

Os tricotecenos são um grupo de micotoxinas produzidas por vários gêneros de fungos como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon*, *Verticillium*, *Phomopsis*, *Trichoderma* e *Cephalosporium*. Os tricotecenos são caracterizados por uma estrutura química comum 12,13-epoxi-tricotec-9-eno (FRUHMANN et al., 2014), e são estáveis quimicamente e termicamente. Eles estão comumente presentes em cereais. De acordo com os grupos funcionais os tricotecenos podem ser divididos nos tipos A, B, C e D (Figura 2), no entanto, há algumas exceções que não estão classificadas nesses tipos. O tipo A pode ter uma hidroxila, um éster ou hidrogênio no carbono C8. O tipo B possui um grupo carbonila na posição C8, o tipo C tem um grupo epóxido em C7/C8 e os tricotecenos do tipo D são os macrocíclicos (BARCELÓ et al., 2008; BRÄSE et al., 2013; JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING, 2001; TOLA; KEBEDE, 2016).

**Figura 2** - Estrutura comum dos tricotecenos e os principais tipos.



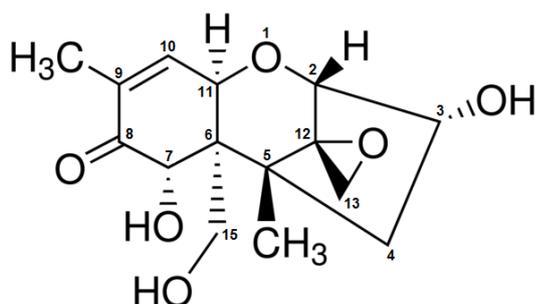
Fonte: Bräse et al., 2013 (modificado).

No tipo A e B os radicais R podem ser iguais ou diferentes dependendo do composto, geralmente R é um hidrogênio (-H), uma hidroxila (-OH) ou um éster: O-acetil (-OCOCH<sub>3</sub>), O-isovaleril (-OCOCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, presente no tipo A) ou O-crotonil (-OCOCH=CHCH<sub>3</sub>, presente no tipo B) (CROTEAU; PRELUSKY; TRENHOLM, 1994; DRAPER, 1980). No tipo C, os compostos crotoconol e crotoquina podem ser formados se o radical R for uma hidroxila ou um éster insaturado (-OCOCH=CHCH<sub>3</sub>), respectivamente (CZUGLER; KÁLMÁN, 1975). O tipo D é formado pelos tricotecenos macrocíclicos como a roridina, a satratoxina e a verrucarina (FREIRE et al., 2007; LAMARDO, 2004). Os tricotecenos mais importantes classificados no tipo A são a toxina T2, a toxina HT2 e o diacetoxiscirpenol (DAS), e as do tipo B mais relevantes são o DON, o nivalenol (NIV) e a fusarenona-X.

### 2.2.1. Desoxinivalenol

O desoxinivalenol (12,13-epoxi-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihidroxitricotec-9-en-8-ona) é um composto orgânico polar de massa molar de 296,32 g/mol solúvel em água e solventes orgânicos polares (metanol, acetonitrila, acetato de etila, etanol e clorofórmio)(NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2009). A estrutura química do DON (Figura 3) tem um grupo carbonila (C8) conjugado com uma dupla ligação (C9 e C10), que absorve no ultravioleta (cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada) (BARCELÓ et al., 2008). Especula-se que a carbonila conjugada pode estar associada aos efeitos tóxicos da micotoxina, assim como o grupo epóxido situado nos carbonos 12 e 13 (NAGY et al., 2005).

**Figura 3** - Estrutura química do DON.



Fonte: Sigma aldrich, 2018 (modificado).

O desoxinivalenol ou “vomitoxina” é o tricoteceno mais comumente encontrado em cereais, embora não seja o mais tóxico (RAN et al., 2013). Ele é produzido por espécies de *Fusarium*, e ocorre com frequência em trigo, milho, arroz, cevada, centeio, aveia e também em produtos derivados com base nesses cereais (PLEADIN et al., 2012; SUDAKIN, 2003). A Tabela 1 mostra a ocorrência de desoxinivalenol em cereais e derivados.

O DON resiste a altas temperaturas e pode se manter estável mesmo após o cozimento. Contudo, a concentração desse contaminante pode reduzir consideravelmente em alimentos cozidos na água, como é o caso do macarrão, pois DON é solúvel no meio (KUSHIRO, 2008). Entretanto, observou-se uma pequena redução em massas preparadas com farinha de trigo e submetidas ao processo de fritura (SAMAR et al., 2007).

A ingestão é a via mais comum de exposição ao contaminante. Os efeitos tóxicos associados ao DON são mais evidentes em animais, principalmente em suínos. O DON pode induzir em animais: vômito; causar diarreia e efeitos imunossupressivos; interferir na síntese de proteínas; provocar hemorragia; anorexia, diminuir o ganho de peso e afetar o crescimento. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) há evidências inadequadas para a carcinogenicidade em animais experimentais. Os principais efeitos agudos observados em seres humanos foram: diarreia, náuseas, vômito, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre (IARC, 1993; JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING, 2001).

Muitos métodos analíticos foram desenvolvidos ao longo dos anos para a determinação de DON em alimentos, esses devem seguir orientações para assegurar que os resultados obtidos sejam confiáveis, como as sugeridas pelo INMETRO (INMETRO, 2016). O desenvolvimento de um método deve ter etapas de amostragem; preparo da amostra com extração, limpeza e concentração (caso necessário); e detecção/quantificação de DON. A Tabela 2 mostra os métodos utilizados no meio científico para extração, limpeza e quantificação de desoxinivalenol.

**Tabela 1** - Ocorrência de desoxinivalenol em cereais e derivados.

<b>Produto</b>	<b>Média<sup>a</sup> (µg/kg)</b>	<b>Intervalo (µg/kg)</b>	<b>País</b>	<b>N<sub>p</sub></b>	<b>Referências</b>
Semolina	39	LD - 172		13/13	
Farinha integral	39	LD - 131		11/11	
Centeio	28	LD - 288	Alemanha	37/37	(GOTTSCHALK et al., 2009)
Farinha de centeio	26	LD - 64		15/15	
Flocos de aveia	4,3	LD - 55		27/31	
Ração	409	LD - 1390	Áustria	24/29	(BÖHM et al., 2010)
Biscoito	1310	377 - 5295	Brasil	18/23	(SOUZA et al., 2015)
Pão integral	491	165 - 988		5/30	
Biscoito	739	434 - 1159	Brasil	3/30	(SAVI et al., 2016)
Biscoito	591	LQ - 1720		35/36	
Macarrão	387	LQ - 1609	Brasil	39/40	(ALMEIDA et al., 2016)
Cevada	1700 - 7500	310 - 15500	Brasil	72/76	(PIACENTINI et al., 2018)
Farelo de aveia	230	LD - 276	Espanha	5/30	(VIDAL et al., 2013)
Alimentação infantil <sup>b</sup>	-	10 - 224	Estados Unidos	23/52	(DOMBRINK-KURTZMAN; POLING; KENDRA, 2010)
Milho <sup>c</sup>	314	0,3 - 2149		49/60	
Derivados de milho <sup>c</sup>	170	0,3 - 1828	China	141/155	(WEI et al., 2012)
Pão	48,3	11 - 148		48/51	
Biscoito	276,8	13,3 - 942	China	47/49	(JIANG et al., 2018)
Trigo	910	70 - 4730		20/50	
Milho	450	10 - 1070	Índia	6/25	(MISHRA et al., 2013)
Cevada	210	30 - 530		4/25	
Pão	125	13 - 350		16/17	
Petisco	124	13 - 320	República Checa	21/34	(MALACHOVA et al., 2011)
Farinha <sup>d</sup>	103	28 - 594		16/22	

Fonte. Elaborado pela autora, 2018.

a) Concentração média; b) alimentação infantil à base de cereais; c) dados referentes ao ano de 2010;

d) farinha de trigo e centeio.

N<sub>p</sub> - número de amostras positivas.

**Tabela 2 - Métodos utilizados para extração, limpeza e quantificação de DON.**

Referências	Tipo de alimento	Método de extração	Método de limpeza	Método cromatográfico de quantificação	Condições cromatográficas	LD / LQ (µg/kg)
(SOLEIMANY; JINAP; ABAS, 2012)	arroz, trigo, aveia, cevada e farinha de milho	acetonitrila:água:ácido acético (79:20:1, v/v/v)	-	CLAE-MS/MS	Coluna C18 Thermo Scientific (150 mm x 4,6 mm, 3 µm) Fase móvel: diferentes proporções de metanol ou acetonitrila contendo 0,1% de ácido acético Fluxo: 0,2 - 0,3 mL/min; Vol. de injeção: 10 - 30 µL	5 / 10
(JUAN; RITIENI; MAÑES, 2013)	diversos cereais orgânicos e produtos derivados	acetonitrila:água (84:16, v/v)	-	CLAE-MS/MS	Coluna C18 Gemini (150 mm x 2,0 mm, 5 µm) Fase móvel: (A) água:metanol:ácido acético (89:10:1, v/v/v) e (B) água:metanol:ácido acético (2:97:1, v/v/v) ambas com 5 mM de acetato de amônio; Fluxo: 0,2 mL/min; Vol. de injeção: 20 µL	5 / 10
(VIDAL et al., 2013)	farelo de trigo e farelo de aveia	água	Coluna de imunoafinidade (DONPREP)	CLAE-UV/Vis	Coluna Water Spherisorb ODS2, (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (92:4:4, v/v/v); λ = 220 nm Fluxo: 1,2 mL/min; Vol. de injeção: 100 µL	100 / 300
(SPANJER; RENSEN; SCHOLTEN, 2008)	amendoim, pistache, trigo, milho, flocos de milho, uva-passa e figo	acetonitrila:água (80:20 v/v); uva-passa e figo: extração com metanol:água (70:30, v/v)	-	CLAE-MS/MS	Coluna C18 Alltima (150 mm x 3,2 mm, 5 µm) Fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila Fluxo: 0,3 mL/min; Vol. de injeção: 20 µL	20 / -
(STECHER et al., 2007)	trigo	acetonitrila:água (84:16, v/v); metanol:água (20:80, v/v)	Cartuchos de extração em fase sólida com diferentes polaridades: Supelclean LC-18, Isolute C8, Mycosep 227, OASIS™ HLB e GMA-DVB	CLAE-UV/Vis	Coluna Nucleosil 120-3 C18 (125 mm x 2 mm, 3 µm) Fase móvel: (A) água e (B) metanol Fluxo: 0,4 mL/min; Vol. de injeção: 20 µL λ = 220 nm e 260 nm	LD = 3,47 pmol

**Continua**

(TANG et al., 2013)	arroz, trigo, amendoim e milho	PBS; PBS - metanol	Coluna de imunoafinidade (Myco6in1 <sup>+</sup> )	CLUE-MS/MS	Coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) Fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) metanol; Fluxo: 0,3 mL/min; Vol. de injeção: 10 μL	0,5 / 5<LQ<20
(PACIN et al., 2010)	farinha de trigo e pão	acetonitrila:água (84:16, v/v)	Colunas MycoSep 216, 225 e 227 (Romer Labs)	GC-ECD <sup>a</sup> ; CCD <sup>b</sup>	GC-ECD - Coluna capilar Hewlett-Packard HP-5 (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 μm) T <sub>injetor</sub> = 250 °C; T <sub>detector</sub> = 300 °C; Fase móvel: N <sub>2</sub> ; Fluxo = 1 mL/min; CCD - Placa de alumínio com sílica gel (n <sup>o</sup> 5553); Fase móvel: tolueno:acetona (1:2, v/v); Revelador: solução de etanol:água (1:1, v/v) com 20% de cloreto de alumínio, T = 150 °C e tempo = 10 min; R <sub>f</sub> = 0,5	4 / 10
(ENNOUARI et al., 2013)	trigo	água	Coluna de imunoafinidade (DONPREP)	CLAE-UV/Vis	Coluna Waters Spherisorb (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (94:3:3, v/v/v); Fluxo: 1,2 mL/min; λ = 220 nm	13,3 / 40
(SUN et al., 2016)	trigo, milho e arroz	acetonitrila:água (80:20, v /v) contendo 0,1% de ácido fórmico	C18, PSA, GCB, SPE, coluna com grupo funcional amina e QuEChERS	CLUE-MS/MS	Coluna CORTECS C18 Waters Corp. (100 mm × 2,1 mm, 1,6 μm) Fase móvel: (A) metanol e (B) água contendo 0,5% de ácido fórmico Fluxo: 0,2 mL/min; Vol. de injeção: 5 μL	5 / 15

Fonte. Elaborado pela autora, 2018.

a) Determinação de DON; b) detecção e confirmação de DON para amostras acima de 40 μg/kg.

Siglas: LD - Limite de Detecção; LQ - Limite de Quantificação; CLAE-UV/Vis - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta/Visível; CLAE-MS/MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo; GC-ECD - Cromatografia Gasosa com detector de Captura de Elétrons; CCD - Cromatografia em Camada Delgada; CLUE-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo; GMA-DVB (*Glycidyl Methacrylate-Divinylbenzene*); OASIS<sup>TM</sup> HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*); PBS (*Phosphate Buffered Saline*) - tampão de fosfato salino; PSA (*Primary Secondary Amine*) - amina primária secundária; C18 - octadecilsilano; GCB (*Graphitized Carbon Black*) - carbono grafitizado; QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) - Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro.

### 2.3. Legislação

Diante desse cenário é preciso um controle maior das micotoxinas em produtos agrícolas com o intuito de minimizar os riscos em seres humanos e animais. Assim, o ideal é que os contaminantes estejam ausentes ou em quantidades aceitáveis, seguras e de acordo com a legislação vigente. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publica suas normas com base em dados científicos, considerando as demandas internas e o cenário internacional. No entanto, o setor produtivo precisa de um período para a melhoria de seus processos, sem onerar demasiadamente o consumidor e diminuir a competitividade no mercado. Logo, tanto os órgãos governamentais quanto os produtores precisam ter bom senso na tomada de decisão, levando-se em conta, principalmente, a saúde do consumidor.

A ANVISA em 18 de fevereiro de 2011 publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 7, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas. O regulamento estabeleceu os limites máximos para as aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), OTA, DON, fumonisinas (B1 e B2), patulina e ZEA. Na resolução foram especificados em anexos, prazos escalonados para a aplicação dos LMT em determinados alimentos, assim o setor produtivo poderia se adequar. Entretanto, em 2013 a ANVISA publicou a RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013, que prorrogou até 1º de janeiro de 2017 os prazos dos artigos 11 e 12, respectivos anexos III e IV da RDC nº 7. Em 2017, a RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017 alterou a RDC nº 7 modificando os LMT de micotoxinas em alimentos como o trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor (ANVISA, 2011, 2013, 2017a), como consta na Tabela 3.

**Tabela 3** - Limites Máximos Tolerados (LMT) estabelecidos para DON.

Alimento	LMT (µg/kg)	LMT (µg/kg)
	Aplicação em 1º de janeiro de 2017	Aplicação em 1º de janeiro de 2019
Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000	3000

**Continua**

Continua

Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz e grão de cevada.	1250	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.	1000	750

Fonte. Elaborado pela autora, 2018.

## 2.4. Justificativa

O trigo é um dos principais cereais cultivados no mundo, sendo superado, em termos de produção, apenas pelo milho. O grão é consumido na forma *in natura* e na forma de produtos processados, como por exemplo, pães, massas alimentícias, bolos, biscoitos, dentre outros. É usado também como ração animal, quando não atinge a qualidade exigida para consumo humano. Estima-se que 65% da sua produção são consumidos na forma de farinha branca, 20% na alimentação animal e 15% perdidos durante manuseio e processamento pós-colheita. A produção brasileira não supre completamente o consumo, fazendo com que o Brasil compre trigo principalmente da Argentina, Canadá e EUA. Os produtos à base de trigo fazem parte da cesta básica dos brasileiros, devido à facilidade de obtenção, simplicidade de processo de fabricação, baixo custo, praticidade e fonte de energia. Embora o trigo e seus produtos representem uma importante fonte de alimento, essa cultura pode ser afetada por diversos micro-organismos, especialmente os fungos toxigênicos, capazes de produzir micotoxinas. Das micotoxinas presentes no trigo, a mais comumente encontrada é o desoxinivalenol. De acordo com a IARC, o DON não é classificado como carcinogênico para humanos e animais, porém está relacionado com surtos de gastroenterite, tendo como sintomas: náuseas, vômito, vertigens, distúrbios gastrointestinais e diarreia. A contaminação com micotoxinas no campo é difícil de controlar devido à influência das condições climáticas como umidade relativa e temperatura. Teores de umidade no solo, danos provocados por insetos na planta, deficiência mineral e “stress” são importantes fatores na contaminação. Com base nessas informações e visando a RDC nº 7/2011 alterada pela RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017, que estabeleceu o LMT de DON em

trigo e derivados de trigo, o monitoramento desses produtos é de fundamental importância para que estratégias de redução dessa contaminação em alimentos à base de trigo sejam definidas, uma vez que a função da vigilância sanitária é atuar na prevenção e proteção da saúde da população.

## **2.5. Objetivos**

O trabalho teve como objetivo geral avaliar amostras de trigo e derivados de trigo quanto à contaminação por desoxinivalenol. Os objetivos específicos foram:

- I - Avaliar a ocorrência de DON em amostras de trigo em grão, farelo de trigo, trigo para quibe e farinha de trigo comercializadas na cidade de São Paulo.
- II - Verificar se há diferenças de contaminação em produtos embalados e a granel.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais e reagentes**

Os reagentes utilizados foram metanol (MeOH) obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e acetonitrila (ACN) da J.T. Baker (Avantor Inc.; Radnor, PA, EUA), ambos grau CLAE. O padrão de desoxinivalenol (cod. D0156 - 1 mg) foi adquirido da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O material de referência certificado de trigo triturado B-MYC0856 foi comprado da empresa LGC Standards (Wesel, Alemanha) com valor certificado de  $877 \pm 23 \mu\text{g}/\text{kg}$ . A coluna de imunoafinidade DonStar™ R foi comprada da empresa Romer Labs (Union, MO, EUA).

#### **3.2. Amostras**

Ao todo foram analisadas 37 amostras, distribuídas da seguinte forma: trigo em grão ( $n = 9$ ), trigo para quibe ( $n = 9$ ), farelo de trigo ( $n = 10$ ) e farinha de trigo ( $n = 9$ ). As amostras foram adquiridas na Zona Cerealista de São Paulo (Brás), no Mercado Municipal da Lapa e em supermercados da cidade de São Paulo no mês de setembro de 2018, levando-se em consideração as marcas disponíveis, os lotes e os produtos vendidos a granel.

#### **3.3. Preparação da solução padrão e curva analítica**

O padrão foi solubilizado em acetonitrila e o espectro de DON foi feito no ultravioleta-visível com varredura na faixa de 190 até 1100 nm utilizando o espectrofotômetro HP 8453 (Hewlett Packard/Agilent; Palo Alto, CA, EUA). A absorbância foi medida em triplicata a 217 nm e a concentração do padrão foi calculada através da lei de Lambert-Beer, utilizando a absorbância média e a

absortividade molar ( $\epsilon$ ) do composto em acetonitrila. A solução padrão foi usada para preparar soluções em água ultrapura para construir a curva analítica de DON em sete diferentes níveis de concentração: 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 ng/mL. A quantificação foi realizada por padronização externa.

### **3.4. Preparo da amostra e quantificação**

#### **3.4.1. Etapa de extração**

As amostras de trigo em grão foram previamente trituradas em liquidificador industrial Vitaprep (Vitamix Corporation; Ohio, EUA). Cada amostra foi identificada e armazenada em temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas e pesou-se uma porção de 12,5 g da amostra que foi extraída com 100 mL de água ultrapura em agitador orbital KS 501 Digital (IKA Labortechnik; Staufen, Alemanha) por 30 min a 300 rpm. Após a agitação aguardou-se a decantação da amostra, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 50 mL e centrifugado a 3000 rpm por 10 min (Nova Técnica; Centrífuga NT 812, Piracicaba, Brasil). O extrato foi filtrado através de papel de microfibras de vidro (0,45  $\mu$ m) e coletado em um tubo de ensaio.

#### **3.4.2. Etapa de limpeza (*clean-up*), concentração e quantificação**

A etapa de limpeza foi realizada no sistema de automação de extração em fase sólida GX-274 ASPEC (Gilson, Inc.; Middleton, WI, EUA), Figura 4. O carregamento (*load*) do extrato para a coluna foi de 2 mL com um fluxo de 1 - 2 gotas/s (2 mL = 0,25 g da amostra). Em seguida, a coluna foi lavada com 10 mL de água ultrapura (2x) com fluxo de 2 mL/min. A coluna foi retirada do suporte do sistema GX-274 ASPEC para a secagem no concentrador 5301 (Eppendorf; Hamburg, Alemanha) com velocidade de 1400 rpm por 5 min, e seguiu-se com a eluição no sistema GX-274 ASPEC que foi realizada com 2 mL de metanol com fluxo

de 0,5 mL/min e o eluato foi coletado em um tubo de 5 mL. O tubo foi retirado do sistema e o solvente foi evaporado em um banho com temperatura de 45°C sob fluxo de N<sub>2</sub>. O resíduo seco foi dissolvido em 1 mL de água ultrapura, e a solução foi homogeneizada e transferida para um *vial* para posterior análise no cromatógrafo.

**Figura 4** - Sistema de automação de extração em fase sólida GX-274 ASPEC.



Fonte: Núcleo de Contaminantes Orgânicos (IAL), 2018.

### 3.5. Condições cromatográficas

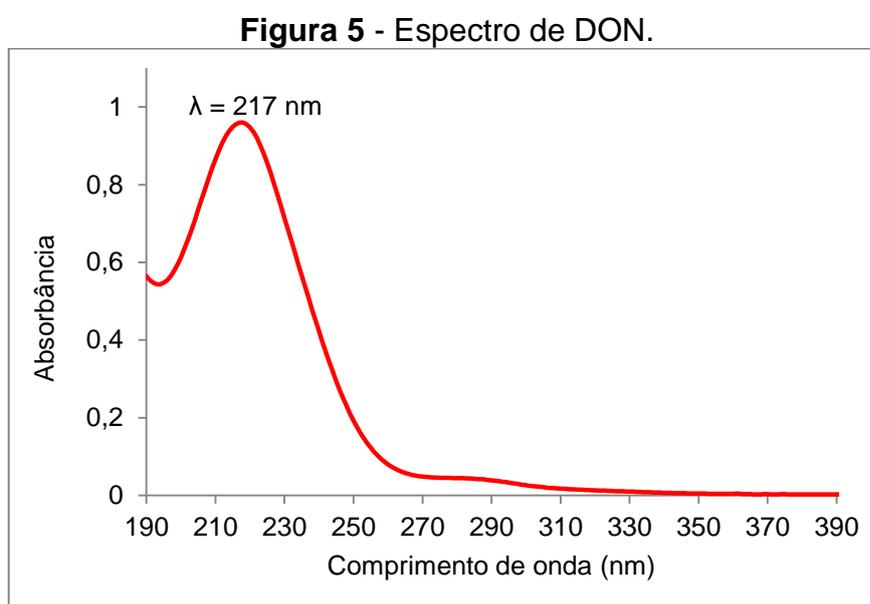
As seguintes condições foram utilizadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência Alliance 2695 (Waters Corporation; Milford, MA, EUA):

- Composição da fase móvel: metanol:acetonitrila:água (15:5:80, v/v/v);
- Fluxo: 0,8 mL/min;
- Volume de injeção: 50 µL;
- Tempo de corrida: 12 min;
- Comprimento de onda ( $\lambda$ ): 220 nm;
- Coluna cromatográfica de fase reversa C18: Microsorb-MV 100-5, 250 × 4,6 mm, 5 µm (Varian Medical Systems; Walnut Creek, CA, EUA);
- Coluna de guarda de fase reversa C18: ZORBAX, 4 × 3 mm (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Concentração da solução padrão e curva analítica

A Figura 5 apresenta o espectro do desoxinivalenol, que tem uma banda característica na região entre 195 e 270 nm, e absorvância máxima em 217 nm.



Fonte. Elaborado pela autora, 2018.

A absorvância foi medida em triplicata no comprimento de onda de 217 nm e calculou-se a média (fórmula 1). A concentração da solução padrão foi obtida utilizando a fórmula 2 (lei de Lambert-Beer):

$$Abs_{m\acute{e}dia} = (Abs_1 + Abs_2 + Abs_3)/3 \quad (1)$$

$$Abs_{m\acute{e}dia} = (0,95961 + 0,96041 + 0,96120)/3 = 0,9604$$

$$Concentra\c{c}\tilde{a}o = Abs_{m\acute{e}dia} \times CF \times MM \times 1000 / \epsilon \times b \quad (2)$$

$$Concentra\c{c}\tilde{a}o = 0,9604 \times 1 \times 296,32 \text{ g mol}^{-1} \times 1000 / 6825 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}$$

$$Concentra\c{c}\tilde{a}o = 41,697 \text{ }\mu\text{g/mL}$$

Em que,

$Abs_{m\acute{e}dia}$  = absorvância média em 217 nm

CF = fator de correção do espectrofotômetro

MM = massa molar

$\varepsilon$  = absorvidade molar do desoxinivalenol em acetonitrila

b = caminho óptico

## 4.2. Parâmetros de validação da metodologia

A validação do método analítico para determinar DON em trigo e derivados de trigo seguiu as orientações do INMETRO (INMETRO, 2016), e foi desenvolvida e publicada pelo Núcleo de Contaminantes Orgânicos (Centro de Contaminantes/IAL) (ALMEIDA et al., 2016; SILVA et al., 2017). A Tabela 4 apresenta os parâmetros da validação do método.

**Tabela 4** - Parâmetros de validação da metodologia de DON para trigo e derivados de trigo.

Tipo de Amostra	Curva analítica	r	LD <sup>a</sup> (µg/kg)	LQ <sup>a</sup> (µg/kg)	Nível de Fortificação (µg/kg)	Média de Recuperação <sup>b</sup> (%)	CV (%)
F	$y = 83,5x - 175$	0,9999	60	200	$877 \pm 23^c$	102,0	2,4
TG							
TQ	$y = 70,587x - 925,141$	0,9995	60	200	$877 \pm 23^c$	102,0	2,4
FT							
F							

Fonte: elaborado pela autora, 2018.

a) O LD e LQ foram calculados com base nos valores médios de seis réplicas da matriz em branco;

b) As médias de recuperação e desvios padrões relativos foram calculadas com base em quatro repetições (n = 4);

c) Material de Referência Certificado de Trigo B-MYC0856.

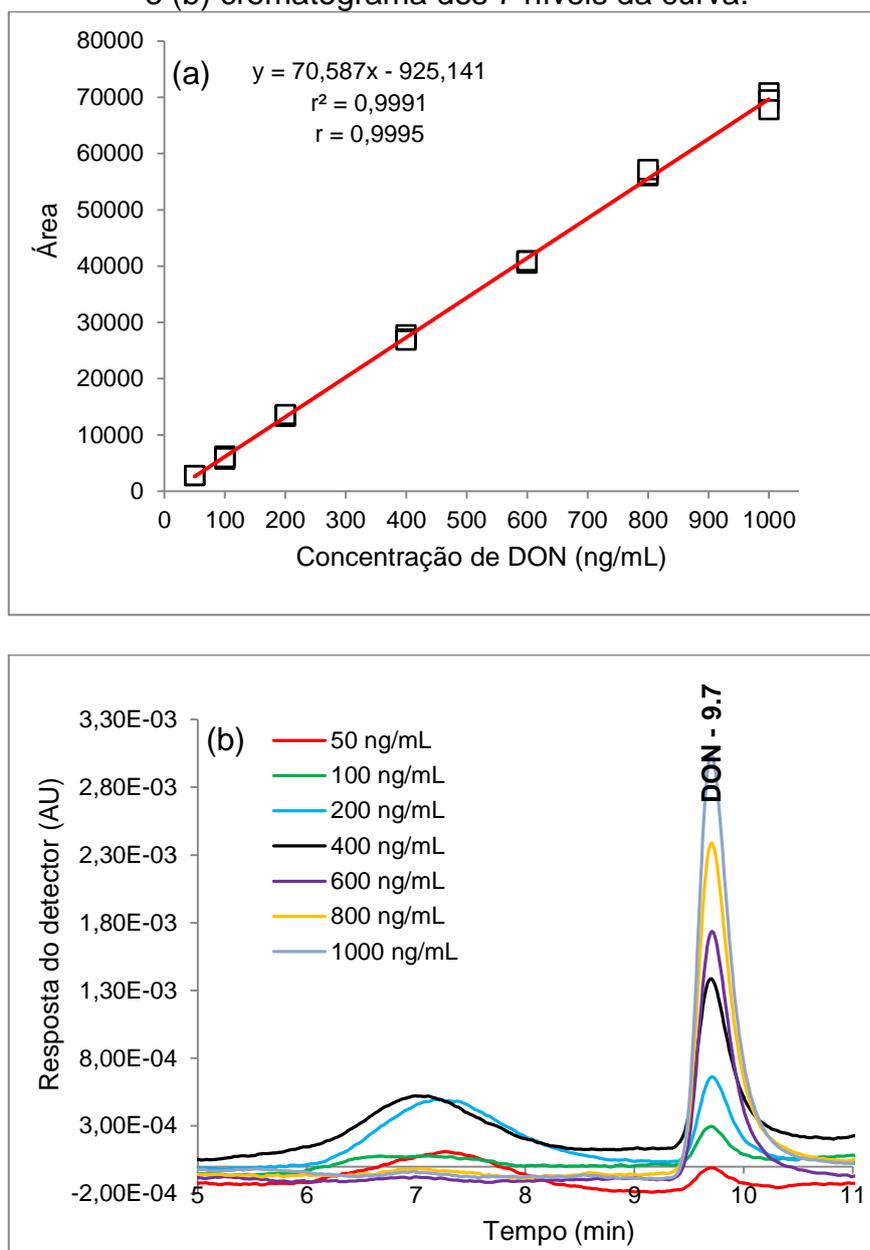
TG - trigo em grão; TQ - trigo para quibe; FT - farelo de trigo; F - farinha de trigo.

CV - Coeficiente de variação; LD - Limite de Detecção; LQ - Limite de Quantificação.

## 4.3. Curva analítica

A curva analítica foi preparada em triplicata utilizando a solução padrão em concentrações variando de 50 a 1000 ng/mL (Figura 6a). A Figura 6b apresenta o cromatograma dos 7 níveis da curva:

**Figura 6** - (a) Curva analítica de DON na faixa de concentração de 50 a 1000 ng/mL e (b) cromatograma dos 7 níveis da curva.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A equação da reta empregada para a quantificação de DON foi  $y = 70,587x - 925,141$  onde  $y$  = área do pico e  $x$  = concentração de DON (ng/mL). O coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva foi 0,9995 e está acima de 0,990, portanto em conformidade com a RDC nº 166 (ANVISA, 2017b). O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9991. O tempo de retenção na corrida foi entre 9,7 e 9,8 min.

#### 4.4. Ocorrência de DON em amostras de trigo e produtos de trigo

As amostras de trigo em grão (TG), trigo para quibe (TQ), farelo de trigo (FT) e farinha de trigo (F) foram analisadas e as concentrações de DON foram calculadas de acordo com as relações abaixo:

$$C_1 = C_2 \times 1 \text{ g} / (M \times 2 \text{ mL} / 100 \text{ mL}) \quad (3)$$

$$\text{Concentração de DON } (\mu\text{g/kg}) = (C_1 \times 1000 / 1000) \quad (4)$$

Em que,

$C_1$  = concentração de DON expressa em ng/mL ou ng/g

$C_2$  = concentração obtida na corrida cromatográfica

M = massa de trigo pesada

Das 37 amostras analisadas, 21 (56,7%) estavam contaminadas com níveis de DON variando de LQ a 3045,12  $\mu\text{g/kg}$ . No trigo em grão, das 9 amostras analisadas, 4 (44,4%) foram positivas com níveis variando de LQ a 261,05  $\mu\text{g/kg}$  e média de 233,93  $\mu\text{g/kg}$ . Para trigo para quibe, de 9 amostras analisadas, 2 (22,2%) apresentaram contaminação, com níveis variando de LQ a 1698,93  $\mu\text{g/kg}$  e média de 991,82  $\mu\text{g/kg}$ . Quanto ao farelo de trigo, de 10 amostras analisadas, 10 (100,0%) estavam contaminadas, com níveis variando de 756,74 a 3045,12  $\mu\text{g/kg}$  e média de 1245,87  $\mu\text{g/kg}$ . E por último, das 9 amostras de farinha de trigo analisadas, 5 (55,5%) apresentaram contaminação por DON, com níveis variando de LQ a 485,80  $\mu\text{g/kg}$  e média de 309,86  $\mu\text{g/kg}$ . As frequências e níveis de contaminação estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Concentrações de DON em amostras de trigo em grão, farelo de trigo, trigo para quibe e farinha de trigo.

Amostra	N	Faixa de concentração ( $\mu\text{g/kg}$ )	Média <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	Frequência e Incidência (%)			
				<LQ	LQ-750	750-1250	>1250
TG	9	LQ - 261,05	233,93	5 (55,5)	4 (44,4)	-	-
TQ	9	LQ - 1698,93	991,82	7 (77,7)	1 (11,1)	-	1 (11,1)
FT	10	756,74 - 3045,12	1245,87	-	-	8 (80,0)	2 (20,0)
F	9	LQ - 485,80	309,86	4 (44,4)	5 (55,5)	-	-

Fonte. Elaborado pela autora, 2018.

a) Concentração média das amostras positivas.

TG - trigo em grão; TQ - trigo para quibe; FT - farelo de trigo; F - farinha de trigo.

N - número de amostras analisadas. LQ - 200  $\mu\text{g/kg}$ .

Assim, o trigo em grão, farinha de trigo e 8 amostras de trigo para quibe apresentaram baixos níveis de contaminação. O mesmo não foi observado no farelo de trigo em que foi confirmado DON em 100% das amostras, um fato preocupante para a saúde do consumidor. Atualmente, o LMT para farelo de trigo é de 1250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no entanto, a partir de 1º de janeiro de 2019 passará para 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Se o prazo já estivesse em vigor, 50% das amostras de farelo de trigo analisadas estariam condenadas, o que enfatiza ainda mais a importância do monitoramento desse produto. A Tabela 6 e Figura 7 apresentam as amostras onde se confirmou a presença de DON (positivas), e a distribuição dessas amostras de acordo com as faixas de concentração, respectivamente.

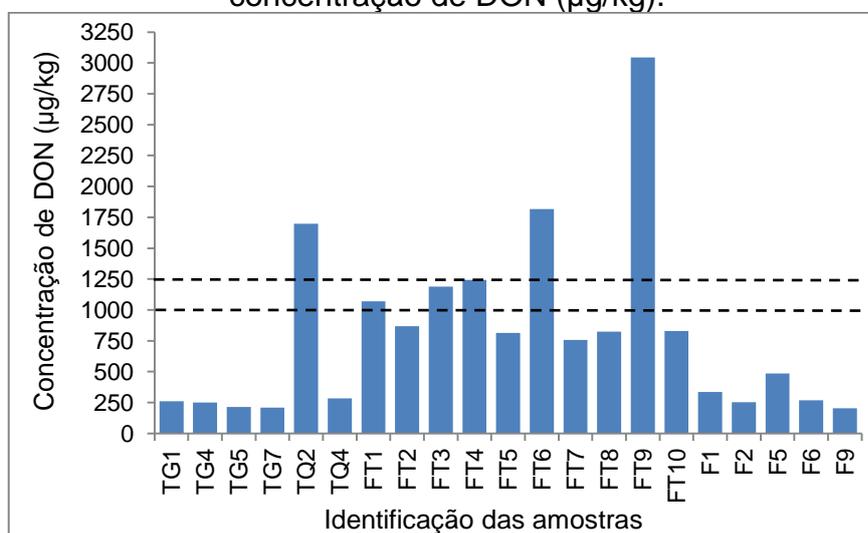
**Tabela 6** - Ocorrência de DON nas amostras positivas de trigo em grão (TG), trigo para quibe (TQ), farelo de trigo (FT) e farinha de trigo (F).

ID	Produto	Resultado ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ID	Produto	Resultado ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
TG1	embalado	261,05	FT6	a granel	1817,35
TG4	a granel	251,10	FT7	a granel	756,74
TG5	a granel	214,92	FT8	a granel	824,97
TG7	a granel	208,64	FT9	a granel	3045,12
TQ2	embalado	1698,93	FT10	embalado	829,14
TQ4	embalado	284,71	F1	embalado	336,30
FT1	embalado	1069,81	F2	embalado	254,40
FT2	embalado	868,22	F5	embalado	485,80
FT3	embalado	1190,00	F6	embalado	268,10
FT4	a granel	1242,23	F9	embalado	204,70
FT5	a granel	815,12			

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

ID - identificação.

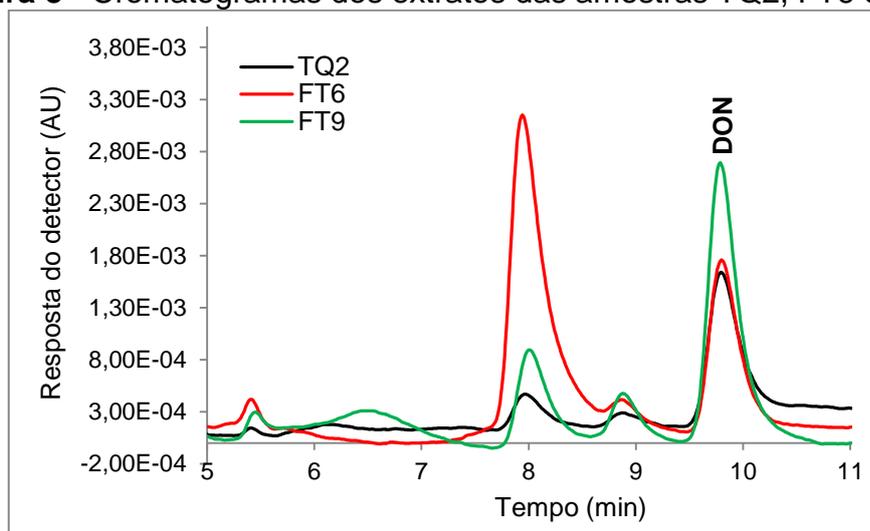
**Figura 7** - Distribuição das amostras positivas de acordo com as faixas de concentração de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A contaminação dos produtos embalados e a granel foi comparada, e se observou que não houve diferença significativa. Ao todo 3 (8,1%) amostras estavam acima dos LMT estabelecidos pela legislação: TQ2 (1698,93  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), FT6 (1817,35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e FT9 (3045,12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). A Figura 8 apresenta os cromatogramas das amostras acima do LMT.

**Figura 8** - Cromatogramas dos extratos das amostras TQ2, FT6 e FT9.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A ocorrência de desoxinivalenol em trigo e derivados de trigo foi relatada por muitos autores no Brasil e em outros países (Tabela 7). Lamardo (2004) encontrou incidência de DON em 14 (50%) de 28 amostras de farinha de trigo, em níveis variando de 82 a 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e média de 296,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Em um estudo realizado na Sérvia, Škrbić et al. (2012) verificaram a incidência de DON em 13 (86,7%) de 15 amostras de farinha de trigo, com níveis variando de 17,5 a 976  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e média de 325  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Almeida et al. (2016) analisaram 58 amostras de farinha de trigo e 53 (91,4%) estavam contaminadas com níveis de DON variando de LQ a 1310  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e média de 360  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . O nível médio de DON das amostras de farinha de trigo foi próximo aos resultados citados.

Alguns estudos sobre a contaminação por DON em trigo conduzidos no Brasil e descritos na Tabela 7 apresentaram concentrações médias variando de 407 a 1895  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , que estão acima do nível médio das amostras de trigo analisadas. Calori-Domingues et al. (2016) encontraram DON em 644 das 745 amostras de trigo (86,4%) com níveis variando de 50 a 8501  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e média de 1690 e 407  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para o ano de 2009 e 2010, respectivamente. Mallmann et al. (2017) analisaram ao longo de oito anos (2008 - 2015) 2714 amostras de trigo cultivadas na região sul. A

concentração média de DON das amostras positivas (73%) durante o período analisado foi de 855 µg/kg. A porcentagem média de amostras acima do limite estabelecido pela legislação brasileira foi de 30,2%.

Savi et al. (2016) trabalharam com amostras de grãos de trigo moídas e separadas em diferentes frações, e constataram que 35% estavam contaminadas com DON. A concentração média das amostras positivas de trigo moído, farinha acabada e farelo foram de 1895, 1305 e 2278 µg/kg, respectivamente. Nesse estudo avaliou-se a distribuição natural de DON no processo de moagem do trigo, que envolve a separação do endosperma do gérmen e farelo, considerados subprodutos do grão. O endosperma, rico em amido, é o principal componente da farinha de trigo e constitui a estrutura interna do grão, assim como o gérmen ou embrião que é a planta potencial de trigo. Observou-se que a micotoxina pode ser redistribuída e concentrada em certas frações de moagem como o farelo. As camadas externas do grão (farelo) podem se comportar como uma barreira física evitando que o fungo penetre demasiadamente na estrutura interna do grão, e outros estudos chegaram à mesma conclusão (FINNIE; ATWELL, 2016; JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING, 2001; TIBOLA et al., 2015).

O processo de moagem pode resultar em uma maior concentração de desoxinivalenol nas camadas externas e uma farinha de trigo menos contaminada. Isso é preocupante uma vez que o farelo, rico em fibras, tem sido muito consumido por seres humanos, além de ser utilizado na ração de animais (EDWARDS et al., 2011). Embora o trigo em grão também seja constituído pelas camadas externas, que geralmente são mais suscetíveis a um nível maior de contaminação, o endosperma que representa a maior parte em peso acaba “diluindo” a micotoxina, o que resulta em um trigo normalmente menos contaminado que o farelo. Outros estudos também reportaram níveis de DON significativamente maiores no farelo de trigo do que em outros produtos de moagem de trigo (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013; HERRERA et al., 2009; ISRAEL-ROMING; AVRAM, 2010; KOSTELANSKA et al., 2011). Tal fato pôde ser observado nos resultados obtidos, assim estão em concordância com os estudos supracitados.

Um total de 6 (16,2%) amostras estariam em desacordo com a legislação brasileira se os novos limites estivessem em vigor. No entanto, levando-se em consideração o limite para DON definido pela Comissão Europeia de 750 µg/kg,

100% do farelo de trigo e 11 (29,7%) amostras estariam condenadas (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013).

Diante desse cenário, a melhor estratégia para os produtores é o conhecimento dos mecanismos de produção de DON pelos fungos, de modo que medidas preventivas possam ser adotadas nas várias etapas da produção agrícola. A aplicação dessas medidas pode ser uma ferramenta eficaz para o controle de micotoxinas, como a secagem dos grãos; aplicação correta de fungicidas; armazenamento dos grãos em local limpo com controle de temperatura e umidade, e um sistema de aeração; manejo de pragas; segregação de grãos danificados e/ou aparentemente contaminado, etc. (BERNARDI et al., 2018). Além disso, o desenvolvimento de novas tecnologias pode contribuir para minimizar o problema.

**Tabela 7** - Ocorrência de DON em trigo em grão, farinha de trigo, farelo de trigo e trigo para quibe.

Produto	Média <sup>a</sup> (µg/kg)	Intervalo (µg/kg)	País	N <sub>p</sub>	Referências
Trigo Farinha Farelo	49 45 225	LD - 235 LD - 613 LD - 1163	Alemanha	52/52 39/39 10/10	(GOTTSCHALK et al., 2009)
Trigo	-	400 - 8500	Argentina	55/69	(PALAZZINI et al., 2015)
Farinha	72,1	LQ - 317	Argentina	47/55	(PACIN et al., 2010)
Trigo	58,5	16 - 150	Bélgica	4/6	(BOEVRE et al., 2012)
Trigo Farinha	753,2 296,3	166 - 1500 82 - 600	Brasil	5/14 14/28	(LAMARDO, 2004)
Farinha	360	LQ - 1310	Brasil	53/58	(ALMEIDA et al., 2016)
Trigo	706	183 - 2150	Brasil	147/150	(TRALAMAZZA et al., 2016)
Trigo <sup>b</sup> Trigo <sup>c</sup>	1690 407	50 - 8501 50 - 2419	Brasil	334/371 310/374	(CALORI-DOMINGUES et al., 2016)
Trigo	855	510 - 1084	Brasil	1982/2714	(MALLMANN et al., 2017)
Trigo	540	LD - 2740	Brasil	65/66	(DEL PONTE; GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2012)
Trigo	937	LQ - 11800	Brasil	433/668	(MACHADO et

**Continua**

## Continua

Farinha	693	LQ - 11400		330/697	al., 2017)
Farelo	640	LQ - 5190		101/139	
Trigo	1895	737 - 2866		7/20	(SAVI et al., 2016)
Farinha	1305	840 - 2195	Brasil	7/20	
Farelo	2278	1366 - 2931		7/20	
Farinha	234,17	73,5 - 2794,63	Brasil	134/172	(SILVA et al., 2018)
Trigo	1098	308 - 3426		30/30	(BELLUCO, 2014)
Farinha	723	234 - 2409	Brasil	30/30	
Farelo	1910	408 - 5296		30/30	
Trigo	-	54 - 8792	Canadá	40/40	(MARTOS; THOMPSON; DIAZ, 2010)
Farinha	178	2,4 - 1130	China	615/672	(LIU et al., 2016)
Farinha	-	160,6 - 2205,8	China	21/21	(XU et al., 2016)
Trigo	-	483,0 - 2025,5		4/4	
Trigo	1962	259 - 4975	China	50/56	(CUI et al., 2013)
Farelo	440	LQ - 890	China	12/13	(LI et al., 2014)
Trigo	1500	203 - 4130	Áustria Alemanha Eslováquia	23/23	(BERTHILLER et al., 2009)
Farelo	1308	LD - 6178		23/37	(VIDAL et al., 2013)
Farelo <sup>d</sup>	1657	LD - 6178	Espanha	15/26	
Farelo <sup>e</sup>	655	LD - 1662		8/11	
Farinha		45 - 367	Espanha	5/25	(RUBERT; SOLER; MAÑES, 2011)
Trigo	866	LQ - 5510	Finlândia	29/30	(NATHANAIL et al., 2015)
Trigo	560	30 - 2700	Itália	20/20	(PASCALE et al., 2014)
Trigo	102,0	8 - 654		90/150	(YOSHINARI et al., 2014)
Farinha	71,8	3 - 789	Japão <sup>f</sup>	44/50	
Trigo para quibe	97 - 177	52 - 289	Líbano	7/80	(ANTONIOS et al., 2010)
Trigo	502,1	65 - 1310	Marrocos	9/81	(ENNOUARI et al., 2013)
Trigo	-	31,3 - 297,3	Portugal	6/13	(TROMBETE et al., 2016)
Trigo	35 - 375	60 - 1260	Rússia	52/634	(TUTELYAN et al., 2013)
Farinha	325	17,5 - 976	Sérvia	13/15	(ŠKRBIĆ et al., 2012)

Fonte. Elaborado pela autora, 2018.

a) Concentração média; b) amostras de 2009 e c) 2010; d) produção convencional e e) orgânica; f) amostras dos EUA, Canadá e Austrália. N<sub>p</sub> - número de amostras positivas.

## 5. CONCLUSÃO

A ocorrência de DON foi avaliada em 37 amostras de trigo e derivados de trigo comercializadas na cidade de São Paulo, e constatou-se que:

- 21 (56,7%) amostras estavam contaminadas com DON;
- 3 (8,1%) amostras estavam acima do LMT estabelecido pela legislação;
- 100% das amostras de farelo de trigo estavam contaminadas com DON no período estudado, e 20% acima do limite estabelecido pela legislação;
- Não se verificou diferença significativa entre as amostras embaladas e a granel;
- Há uma correlação entre o processo de moagem do trigo, e a redistribuição e concentração da micotoxina em certas frações de moagem;
- Os resultados preliminares mostram uma tendência preocupante;
- O estudo requer mais dados e aprofundamento para chegar a uma conclusão mais precisa sobre a exposição da população ao desoxinivalenol.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. P. DE et al. Occurrence of deoxynivalenol in wheat flour, instant noodle and biscuits commercialised in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 9, n. 4, p. 251–255, 2016.

AMIS. **AMIS Market Database**. Disponível em: <<http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html#>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

ANTONIOS, D. et al. Monitoring the levels of deoxynivalenol (DON) in cereals in Lebanon and validation of an HPLC/UV detection for the determination of DON in crushed wheat (bulgur). **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 3, n. 1, p. 45–51, 2010.

ANVISA. **RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/%282%29RDC\\_07\\_2011\\_COMP.pdf/42310948-a1c5-4213-a467-1da97b8f4cae](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/%282%29RDC_07_2011_COMP.pdf/42310948-a1c5-4213-a467-1da97b8f4cae)>. Acesso em: 16 dez. 2018.

ANVISA. **RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013**. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0059\\_26\\_12\\_2013.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0059_26_12_2013.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2018.

ANVISA. **RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC\\_138\\_2017\\_COMP.pdf/e8ce9316-1bc5-4723-9d37-62020b69fdc1](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_COMP.pdf/e8ce9316-1bc5-4723-9d37-62020b69fdc1)>. Acesso em: 16 dez. 2018a.

ANVISA. **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)>. Acesso em: 16 dez. 2018b.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. **Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.

BARCELÓ, D. et al. **Comprehensive Analytical Chemistry: Food Contaminants and Residue Analysis**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2008.

BELLUCO, B. **Distribuição de desoxinivalenol nas frações de trigo obtidas no processo de moagem**. 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2014.

BERNARDI, C. M. G. et al. **Micotoxinas no trigo**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1094602/1/ID443542018FLmicotoxinas.pdf>>. Acesso em: 6 dez. 2018.

BERTHILLER, F. et al. Occurrence of deoxynivalenol and its 3-  $\beta$ -D-glucoside in wheat and maize. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 4, p. 507–511, 2009.

BIANCHINI, A. et al. **Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture**. Washington: American Chemical Society, 2009.

BOEVRE, M. DE et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, n. 5, p. 819–835, 2012.

BÖHM, J. et al. Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 3, p. 147–153, 2010.

BOONEN, J. et al. Human skin penetration of selected model mycotoxins. **Toxicology**, v. 301, n. 1–3, p. 21–32, 2012.

BRÄSE, S. et al. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products: The Chemistry of Mycotoxins**. Viena: Springer, 2013.

CALORI-DOMINGUES, M. A. et al. Co-occurrence and distribution of deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in wheat from Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 9, n. 2, p. 142–151, 2016.

CAST. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. 1. ed. Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

CONAB. **Portal de Informações Agropecuárias**. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

CROTEAU, S. M.; PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L. Analysis of Trichothecene Mycotoxins by Gas Chromatography with Electron Capture Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 928–933, 1994.

CUI, L. et al. A minor survey of deoxynivalenol in *Fusarium* infected wheat from Yangtze-Huaihe river basin region in China. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 469–473, 2013.

CZUGLER, M.; KÁLMÁN, A. Protocol, a Sesquiterpenoid Alcohol. **Acta Crystallographica Section B**, v. 31, n. 4, p. 1204–1206, 1975.

DALL'ASTA, C.; BERTHILLER, F. **Masked Mycotoxins in Food: Formation, Occurrence and Toxicological Relevance**. 1. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1087–1091, 2012.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; POLING, S. M.; KENDRA, D. F. Determination of Deoxynivalenol in Infant Cereal by Immunoaffinity Column Cleanup and High-Pressure Liquid Chromatography-UV Detection. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 6, p. 1073–1076, 2010.

DRAPER, H. H. **Advances in Nutritional Research. Vol. 3**. New York: Springer, 1980.

EDWARDS, S. G. et al. Distribution of *Fusarium* mycotoxins in UK wheat mill fractions. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 12, p. 1694–1704, 2011.

ENNOUARI, A. et al. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 115–118, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. **EFSA Journal**, v. 11, n. 10, p. 3379, 2013.

FINNIE, S.; ATWELL, W. A. **Handbook Series**. 2. ed. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 2016.

FONSECA, H. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região araraquarense, do estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 32, p. 7–19, 1975.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1. ed.

Atheneu, 2005.

FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Disponível em:

<[http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc\\_110.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2018.

FRUHMANN, P. et al. Methylthio-deoxynivalenol (MTD): insight into the chemistry, structure and toxicity of *thia*-Michael adducts of trichothecenes. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 12, n. 28, p. 5144–5150, 2014.

GOTTSCHALK, C. et al. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 9, p. 1273–1289, 2009.

HAYES, R. B. Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 39–43, 1984.

HERRERA, M. et al. Comparison of deoxynivalenol, ochratoxin A and aflatoxin B1 levels in conventional and organic durum semolina and the effect of milling. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 48, n. 2, p. 92–99, 2009.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins Vol. 56**. Disponível em:

<<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono56.pdf>>. Acesso em: 6 dez. 2018.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Disponível em:

<[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2018.

ISRAEL-ROMING, F.; AVRAM, M. Deoxynivalenol stability during wheat processing. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 3, p. 47–50, 2010.

JIANG, D. et al. Deoxynivalenol and its acetyl derivatives in bread and biscuits in Shandong province of China. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 1, p. 43–48, 2018.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food (nº 74)**. Geneva: Food and Agriculture

Organization of the United Nations, 2001.

JUAN, C.; RITIENI, A.; MAÑES, J. Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1747–1755, 2013.

KOSTELANSKA, M. et al. Effects of Milling and Baking Technologies on Levels of Deoxynivalenol and its Masked Form Deoxynivalenol-3-Glucoside. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9303–9312, 2011.

KUSHIRO, M. Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 11, p. 2127–2145, 2008.

LAMARDO, L. C. A. **Avaliação de métodos analíticos para determinação de desoxinivalenol e sua ocorrência em amostras de trigo e farinha de trigo**. 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde, 2004.

LI, X. et al. Occurrence of mycotoxins in feed ingredients and complete feeds obtained from the Beijing region of China. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 37, 2014.

LIU, Y. et al. Occurrence of deoxynivalenol in wheat, Hebei Province, China. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1271–1274, 2016.

MACHADO, L. V. et al. Deoxynivalenol in wheat and wheat products from a harvest affected by fusarium head blight. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 8–12, 2017.

MALACHOVA, A. et al. Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-glucoside, and Enniatins: The Major Mycotoxins Found in Cereal-Based Products on the Czech Market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 12990–12997, 2011.

MALLMANN, C. A. et al. Prevalence and levels of deoxynivalenol and zearalenone in commercial barley and wheat grain produced in Southern Brazil: an eight-year (2008 to 2015) summary. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 3, p. 146–152, 2017.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. 1. ed. Santa Maria: do Autor, 2007.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013.

MARTOS, P. A.; THOMPSON, W.; DIAZ, G. J. Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 3, p. 205–223, 2010.

MATNY, O. N. Fusarium head blight and crown rot on wheat & barley: losses and health risks. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 2, n. 1, p. 38–43, 2015.

MISHRA, S. et al. Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 549–555, 2013.

NAGY, C. M. et al. Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations - a density functional study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 726, n. 1–3, p. 55–59, 2005.

NATHANAIL, A. V et al. Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4745–4755, 2015.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Chemical Information Review Document for Deoxynivalenol [CAS No. 51481-10-8]**. Disponível em: <[https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/noms/support\\_docs/deoxynivalenol060809.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/noms/support_docs/deoxynivalenol060809.pdf)>. Acesso em: 11 dez. 2018.

PACIN, A. et al. Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 492–495, 2010.

PALAZZINI, J. et al. Correlation between *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol during the 2012/13 Wheat Fusarium Head Blight Outbreak in Argentina. **Cereal Research Communications**, v. 43, n. 4, p. 627–637, 2015.

PASCALE, M. et al. Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Wheat by Ultra-Performance Liquid Chromatography/Photodiode-Array Detector and Immunoaffinity Column Cleanup. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 3, p. 555–562, 2014.

PIACENTINI, K. C. et al. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil. **Mycotoxin Research**, v. 34, n. 3, p. 173–178, 2018.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. New York: Springer, 2009.

PLEADIN, J. et al. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 94–98, 2012.

POSNER, E. S.; HIBBS, A. N. **Wheat flour milling**. 2. ed. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 2005.

RAN, R. et al. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 138–148, 2013.

RAWAL, S.; COULOMBE JR, R. A. Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes: The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 3, p. 349–354, 2011.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC-MS/MS. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 206–215, 2011.

RYCHLIK, M. et al. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. **Mycotoxin research**, v. 30, n. 4, p. 197–205, 2014.

SAMAR, M. et al. Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1295–1299, 2007.

SAVI, G. D. et al. Deoxynivalenol in the wheat milling process and wheat-based products and daily intake estimates for the Southern Brazilian population. **Food Control**, v. 62, n. 2016, p. 231–236, 2016.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. 1. ed. Florianópolis: Insular, 1998.

SILVA, M. V. et al. Occurrence and risk assessment of population exposed to deoxynivalenol in foods derived from wheat flour in Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 3, p. 546–554, 2018.

SILVA, S. A. et al. **Application Note 1012. GX-274 ASPEC®: Automated Extraction of Deoxynivalenol (DON) from Wheat**. Disponível em:

<[https://www.gilson.com/pub/static/frontend/Gilson/customtheme/en\\_US/images/docs/ASPEC274\\_ExtractionDeoxynivalenolWheat\\_AN1012-01.pdf](https://www.gilson.com/pub/static/frontend/Gilson/customtheme/en_US/images/docs/ASPEC274_ExtractionDeoxynivalenolWheat_AN1012-01.pdf)>. Acesso em: 6 dez. 2018.

ŠKRBIĆ, B. et al. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 389–396, 2012.

SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; ABAS, F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1055–1060, 2012.

SOUZA, T. D. et al. Exposure to deoxynivalenol, Ht-2 and T-2 toxins by consumption of wheat-based product in southern Brazil. **Food Control**, v. 50, p. 789–793, 2015.

SPANJER, M. C.; RENSEN, P. M.; SCHOLTEN, J. M. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 25, n. 4, p. 472–489, 2008.

STECHEER, G. et al. Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 251–257, 2007.

SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 2, p. 97–107, 2003.

SUN, J. et al. QuEChERS Purification Combined with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Quantification of 25 Mycotoxins in Cereals. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 1–18, 2016.

SWEETS, L. **Stored Grain Fungi**. Disponível em: <<http://agebb.missouri.edu/storage/disease/sgfungi.php>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

TANG, Y. Y. et al. Development of a Quantitative Multi-Mycotoxin Method in Rice, Maize, Wheat and Peanut Using UPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 727–736, 2013.

TIBOLA, C. S. et al. Distribution of Fusarium mycotoxins in wheat milling process. **Food Control**, v. 53, p. 91–95, 2015.

TOLA, M.; KEBEDE, B. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2016.

TRALAMAZZA, S. M. et al. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v. 196, p. 445–450, 2016.

TROMBETE, F. et al. Simultaneous Determination of Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-Glucoside and Nivalenol in Wheat Grains by HPLC-PDA with Immunoaffinity Column Cleanup. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 9, p. 2579–2586, 2016.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168–180, 2009.

TUTELYAN, V. A. et al. Fusariotoxins in Russian Federation 2005–2010 grain harvests. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 6, n. 2, p. 139–145, 2013.

VIDAL, A. et al. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 133–138, 2013.

WANNOP, C. C. The Histopathology of Turkey “X” Disease in Great Britain. **Avian Diseases**, v. 5, n. 4, p. 371–381, 1961.

WEI, W. et al. Simultaneous Determination of Masked Deoxynivalenol and Some Important Type B Trichothecenes in Chinese Corn Kernels and Corn-Based Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11638–11646, 2012.

XU, J.-J. et al. Simultaneous and rapid determination of deoxynivalenol and its acetylate derivatives in wheat flour and rice by ultra high performance liquid chromatography with photo diode array detection. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 11, p. 2028–2035, 2016.

YOSHINARI, T. et al. Occurrence of Four Fusarium Mycotoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, and HT-2 Toxin, in Wheat, Barley, and Japanese Retail Food. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 11, p. 1940–1946, 2014.