

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

MÁRCIA MAYER DE GOES

**DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINA DESOXINIVALENOL (DON) EM
PÃES BRANCOS E INTEGRAIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE
PONTA GROSSA – PR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2013

MÁRCIA MAYER DE GOES

**DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINA DESOXINIVALENOL (DON) EM
PÃES BRANCOS E INTEGRAIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE
PONTA GROSSA – PR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Tecnólogo em
Alimentos, da Coordenação de Alimentos,
da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Ms. LUIS ALBERTO CHAVEZ
AYALA

PONTA GROSSA

2013



TERMO DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINA DESOXINIVALENOL (DON) EM PÃES BRANCOS E INTEGRAIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE PONTA GROSSA – PR

por

MÁRCIA MAYER DE GOES

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 18 de abril de 2013 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. As candidatas foram arguidas pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Me. Luis Alberto Chavez Ayala
Professor Orientador

Profa. Dra. Giovana de Arruda Moura Pietrowski
Membro titular

Profa. Me. Simone Bowles
Membro titular

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui os meus agradecimentos a todas as pessoas que fizeram parte da minha trajetória para conclusão desse trabalho de conclusão de curso.

Primeiramente, agradeço a Deus por todos os momentos que vivi e que me trouxeram sabedoria.

Agradeço meus familiares, por me apoiarem e incentivarem sempre...

Agradeço a minha mãe, Danuta, um exemplo de mulher no qual me espelho todos os dias...

Agradeço ao meu irmão, Tiago, meu amigo de todas as horas...

Agradeço ao meu esposo, Rafael, com quem compartilho todos os dias minhas dificuldades e minhas vitórias...

Agradeço ao Fabiano Rochadel, por ter sido a chave para realização desse trabalho e a Cristiane Mika pelo apoio e incentivo...

Agradeço ao Prof. Ms. Luiz Alberto Chavez Ayala, meu orientador, pelo suporte e paciência durante a execução do trabalho...

A todos meus colegas de trabalho e de sala de aula que de alguma forma contribuíram para o sucesso do meu trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

GOES, Márcia Mayer. **Determinação de micotoxina Desoxivalenol (DON) em pães brancos e integrais comercializados na cidade de Ponta Grossa – PR.** 2013. 30 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso de Tecnologia em Alimentos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2013.

Os alimentos estão sujeitos à contaminação por substâncias tóxicas cuja ingestão podem causar danos à saúde. Micotoxinas são metabólitos secundários de algumas espécies de fungos, incluindo-se as do gênero *Fusarium*. O Desoxivalenol (DON) é a micotoxina da classe dos tricotecenos mais comumente encontrada em grãos e sua ingestão pode causar náuseas, vômito e diarreia, por isso também é conhecida por vomitoxina. A distribuição da micotoxina não é uniforme no grão, apresentando maiores concentrações no farelo. Os processos de transformação do grão podem reduzir significativamente a concentração de DON, diminuindo a exposição humana a essa micotoxina. Recentemente a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que determina os limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. O objetivo deste trabalho foi determinar a presença e concentração de DON em pães brancos e integrais. Foram analisadas amostras de pães brancos e integrais de cinco diferentes marcas comerciais, utilizando-se o Kit quantitativo Veratox® para vomitoxina, que consiste em um teste imunoabsorvente ligado a enzimas competitivas diretas. Todas as amostras apresentaram contaminação, porém em níveis abaixo do limite máximo tolerado (1750 µg/Kg) estabelecido pela legislação. Os resultados obtidos dos níveis médios de DON em farinha e farelo em 2012 comprovam que o farelo apresenta níveis elevados de DON em relação à farinha. Porém na análise comparativa de pães brancos e integrais não foi verificado um padrão nos níveis de contaminação. Os resultados demonstram que é necessário maior controle dos grãos de trigo para reduzir a concentração de DON em produtos derivados do trigo.

Palavras-chave: Micotoxinas, Desoxivalenol, Trigo, Pães integrais.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma geral do processo de moagem.	12
Figura 2: Grãos sadios e grãos com fusariose ou giberela.....	14
Figura 3: Estruturas químicas dos tricotecenos tipo A e B.	16
Figura 4: Procedimento de análise de DON.	20
Gráfico 1: Resultados dos teores de DON em farinha e farelo em 2012.....	23
Gráfico 2: Concentração de DON em pães brancos e integrais	24
Tabela 1: Resultados das análises de DON nos pães integrais	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2.3 JUSTIFICATIVA	9
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 TRIGO.....	11
3.2 CONTAMINAÇÃO DO TRIGO POR <i>FUSARIUM</i>	13
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO DESOXINIVALENOL	15
3.4 OCORRÊNCIA DE DON	17
3.5 LEGISLAÇÃO.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 MATERIAIS	19
4.2 MÉTODO.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
6 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é o cereal que ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial. No Brasil, a produção da safra de 2010/2011 foi de 5,9 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Cerca de 90% da produção de trigo estão no Sul do Brasil. O consumo anual no país tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas, o que ainda requer importação do produto (EMBRAPA, 2012).

A principal utilização do grão de trigo é na forma de farinha de trigo, ingrediente base para produção dos alimentos de elevado consumo por grande parte da população, sendo um dos cereais mais consumidos no mundo, na forma de pães, bolos, massas, entre outros. A farinha de trigo contribui com cerca de 20% das calorias diárias ingeridas, além de fornecer proteínas de elevado valor biológico e carboidratos complexos (amido e fibras), bem como vitaminas do complexo B e ferro (SANTOS *et al*, 2011).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos, especialmente por espécies do gênero *Fusarium*. Na posição de um dos países líderes na produção de alimentos agrícolas e de *commodities*, o Brasil possui condições ambientais excelentes para o crescimento desses fungos micotoxigênicos (BANDO *et al*, 2007; MAZIERO & BERSOT, 2010; KANEMARU *et al*, 2011).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana direta ou indiretamente. Diretamente, através do consumo dos cereais e derivados. Os animais que se alimentam com rações previamente contaminadas podem excretar micotoxinas no leite, carne e ovos, e conseqüentemente, constituir-se em fonte de contaminação indireta para os humanos (MAZIERO & BERSOT, 2010).

As micotoxinas estão amplamente incorporadas aos alimentos, constituindo-se em um sério problema de saúde pública. Além disso, a ocorrência de micotoxinas em alimentos não é um problema apenas de países em desenvolvimento. Micotoxinas afetam o agronegócio de muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola e, em alguns países, afetando, também, a saúde humana (FREIRE *et al*, 2007).

São reconhecidos os efeitos tóxicos desses compostos sobre a saúde humana e animal. Atualmente, aproximadamente 25% dos produtos agrícolas produzidos no mundo estão contaminados com alguma micotoxina (FREIRE *et al*, 2007).

O presente trabalho baseou-se em pesquisas recentes relacionadas à presença de DON em trigo e produtos à base de trigo, bem como seus efeitos na saúde humana. O trabalho consistiu na análise de pães para verificar e quantificar a presença de DON nesses produtos.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

2.1 Objetivo Geral

Determinar a concentração de Desoxinivalenol (DON) em pães brancos e integrais comercializados na cidade de Ponta Grossa – PR, avaliando se os mesmos encontram-se dentro dos limites máximos tolerados pela legislação para produtos de panificação.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudo comparativo entre pães brancos e integrais em relação a concentração de DON.
- Levantar as causas da contaminação por fungos patógenos produtores de DON nas culturas de trigo.
- Conhecer a toxicidade do DON.
- Realizar levantamento da presença de DON em farinha e farelo no ano de 2012.

2.3 Justificativa

Os alimentos estão sujeitos à contaminação por substâncias altamente tóxicas, cuja ingestão é capaz de causar sérios transtornos no organismo do homem e dos animais. Entre as diversas substâncias capazes de provocar danos à saúde estão as micotoxinas, que quando produzidas em condições favoráveis representam relevante perigo ao ser humano.

As micotoxinas, entre elas o DON, são contaminantes naturais, difíceis de prever, evitar e diminuir. A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. A prevenção dos danos à saúde causados por contaminantes presentes no meio ambiente e o monitoramento dos níveis de exposições é essencial para que não constituam risco à saúde do homem. Para isso tornam-se necessárias a identificação e a quantificação desses riscos através da avaliação da exposição humana, que pode

ser determinada através da análise de micotoxinas, em alimentos consumidos frequentemente pela população.

Portanto, conhecer os níveis que essa contaminação está presente nos pães integrais, poderá fornecer subsídios para os diversos segmentos envolvidos com a produção de alimentos, bem como fiscalização e pesquisa, visando garantir a produção de alimentos de melhor qualidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Trigo

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Trigo (Instrução Normativa SARC nº 7, de 15 de agosto de 2001), entende-se por trigo os grãos provenientes das espécies *Triticum aestivum* L. e *Triticum durum* L., sendo classificado comercialmente em cinco tipos: trigo brando, trigo pão, trigo melhorador, trigo para outros usos e trigo durum, definidos em função das determinações analíticas de Alveografia e Número de Queda (*Falling Number*), que analisam as propriedades de tenacidade, de extensibilidade e o trabalho mecânico para expandir a massa, e a medida indireta da concentração da enzima alfa-amilase no trigo moído, respectivamente (BRASIL, 2001).

De acordo com a EMBRAPA (2006), os cereais assim como os demais membros da família *Poaceae*, chamados cariopses ou grãos, produzem frutos secos. Do ponto de vista tecnológico, o grão de trigo pode ser dividido em três partes distintas: o endosperma (83%), pericarpo ou farelo (14%) e germe (3%). Cada parte compreende dois ou mais tecidos anatomicamente diferentes. O endosperma inclui o endosperma amiláceo e a camada de aleurona, o farelo consiste de pelo menos seis tecidos diferentes e o germe geralmente inclui o escutelo e o embrião.

Os constituintes não se distribuem uniformemente pelo grão. O pericarpo é rico em pentosanas, celulose e minerais. A aleurona é uma camada rica em fósforo e fitato, proteínas, lipídios, vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina e ácido pantotênico, além de tocoferol) e enzimas. O endosperma é composto basicamente de amido, mas sua parte mais externa (subaleurona) contém mais proteínas que a porção interna. O germe tem alto conteúdo de proteínas, lipídios, açúcares redutores e minerais (EMBRAPA, 2006).

A farinha de trigo é o principal produto do grão de trigo sendo definida como um produto obtido da moagem do grão de trigo *Triticum aestivum*, ou de outras espécies do gênero *Triticum* (exceto *Triticum durum*). A farinha deve ser oriunda do endosperma do trigo limpo e sadia, seu glúten deve possuir boas características visco elásticas, ter baixo teor de umidade e cinzas e atividade enzimática adequada (BRASIL, 1996).

A figura 1 mostra resumidamente as etapas do processo de moagem de trigo.

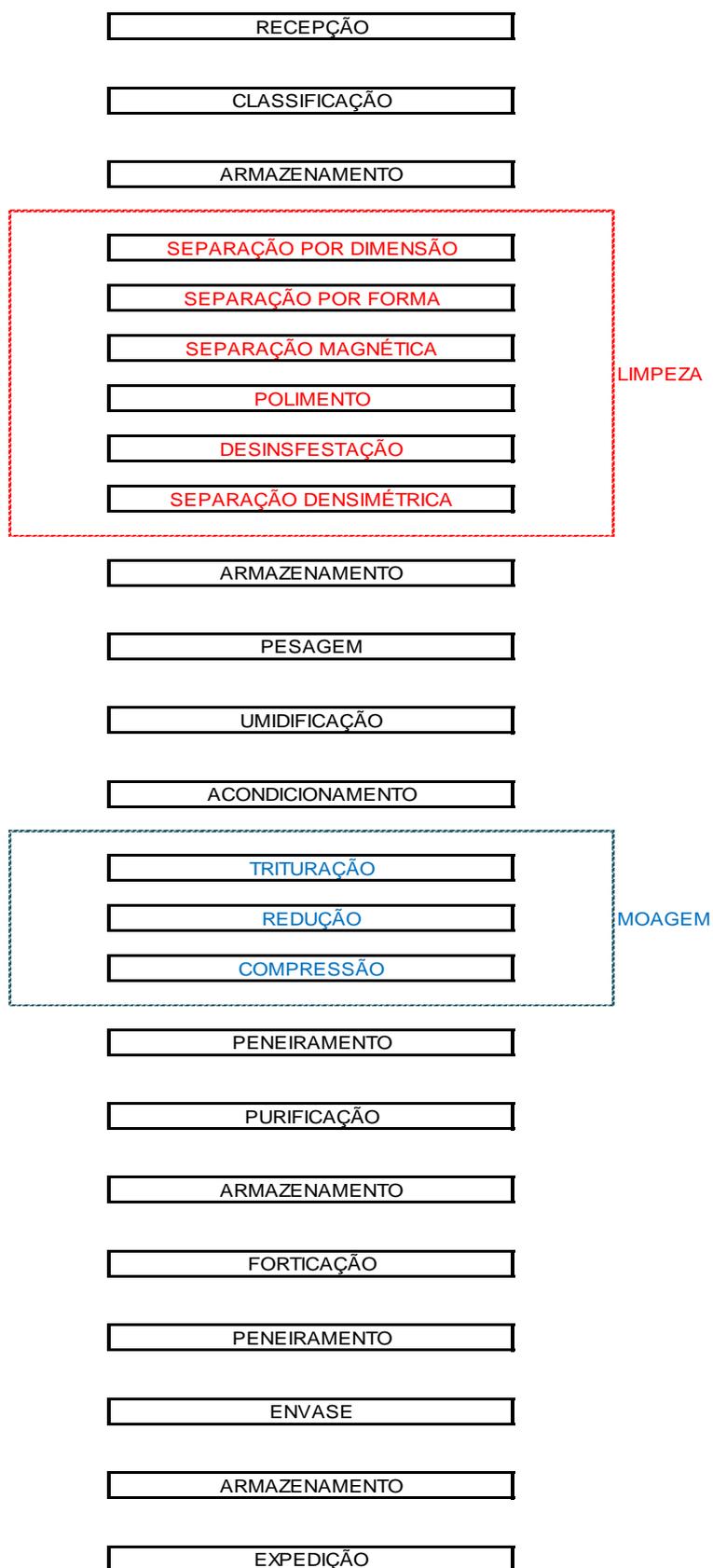


Figura 1: Fluxograma geral do processo de moagem. Fonte: (NIEVINSKI, 2009)

3.2 Contaminação do trigo por *Fusarium*

A microbiota dos grãos de cereais é composta principalmente por microrganismos provenientes do solo, que podem ser subdivididos em dois grupos: aqueles que tendem a desaparecer após a colheita, e os que permanecem nos grãos durante a estocagem. Outros microrganismos contaminam os grãos durante o processamento, por falhas de higiene no processo de fabricação da farinha. Grãos de cereais íntegros e selecionados geralmente têm carga microbiana baixa, mas devido à umidade do ambiente e procedimentos inadequados de limpeza dos equipamentos, essa carga pode aumentar, com destaque para os fungos (LOPES & FRANCO, 2006).

As condições climáticas da região determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que podem produzir (MAZIERO & BERSOT, 2010). O clima no Brasil é adequado para produção de micotoxinas nas culturas de trigo, pois a precipitação pluviométrica e temperatura favorecem a multiplicação de fungos patógenos, como o *Fusarium graminearum*, agente causador da fusariose (ALMEIDA, 2006; KANEMARU *et al*, 2011).

A fusariose está presente em toda a América do Sul e também, de forma generalizada, em todo o mundo, principalmente em áreas úmidas e temperadas. A intensidade da doença é altamente dependente das condições ambientais, por isso as epidemias variam de acordo com a safra, e tem capacidade de destruir uma cultura de elevado potencial de rendimento dentro de algumas semanas de colheita, causando perdas econômicas e reduzida qualidade dos grãos (NIEVINSKI, 2009).

A fusariose é observada durante o espigamento da planta, sendo a fase mais crítica a floração, podendo se estender até o início da maturação do grão. Durante o florescimento o fungo penetra facilmente no ovário e avança ao longo dos espaços intercelulares, tomando o grão. Em infecções tardias, o grão não é tão permeável à hifa e o fungo fica restrito ao pericarpo ou ao embrião. Períodos de exposição em umidade contínua favorece a infecção, bem como dias quentes e úmidos, que favorecem o estabelecimento e o progresso da infecção por *Fusarium graminearum* em cultivares de trigo no estágio de floração (CALORI-DOMINGUES *et al*, 2007).

Algumas glumas da espiga ou mesmo toda espiga podem ser infectadas e facilmente identificadas no campo, principalmente quando há formação de uma

massa rosada de esporos (Figura 2). No Brasil, a fusariose tornou-se, nos últimos anos, a principal doença nas culturas tritícolas, principalmente na região Sul do País (CALORI-DOMINGUES *et al*, 2007; NIEVINSKI, 2009).



Figura 2: Grãos saudáveis e grãos com fusariose ou giberela. Fonte: UFRGS, 2012

As estratégias de controle da fusariose baseiam-se no desenvolvimento de cultivares resistentes, através da biotecnologia, e no uso de fungicidas aplicados na parte aérea durante a fase de floração, embora a utilização de fungicidas seja preconizada, pois há dificuldades em se conhecer a necessidade, o momento ideal de aplicação e a tecnologia utilizada para obtenção de resultados satisfatórios (DEL PONTE *et al*, 2004).

Além de fatores climáticos, é possível que a presença de resíduos culturais possa contribuir para o aumento do inóculo e sobrevivência do patógeno entre as estações de cultivo exercendo uma maior pressão no inóculo, por isso a utilização de um bom manejo pode ser importante na redução do risco de fusariose em trigo (ALMEIDA, 2006).

Segundo Nievinsk (2009), a incidência de fusariose está diretamente relacionada à contaminação de trigo com a micotoxina Desoxinivalenol. A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do cultivo, colheita ou estocagem dos alimentos (NIEVINSKI, 2009; CALORI-DOMINGUES *et al*, 2007; KANEMARU *et al*, 2011).

A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Isto porque a maioria das micotoxinas é termoestável, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (MAZIERO & BERSOT, 2010; SANTIN *et al*, 2000).

3.3 Caracterização do Desoxinivalenol

Segundo Gomes (2003), as micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular, produzidos por fungos, que tem a função de combater bactérias do ambiente, já que estas tem maior velocidade de crescimento que os fungos e competem com eles na colonização. Esses compostos constituem toxinas naturais de ocorrência inevitável em alimentos, considerada perigo crônico na dieta, somando-se a contaminantes sintéticos, aditivos alimentares e resíduos de agrotóxicos. Os efeitos da ingestão de micotoxinas são dependentes da dose consumida, toxicidade do composto, peso corporal e condição física do indivíduo, além da presença de outras micotoxinas, capazes de aumentar ou diminuir a toxicidade (SANTIN *et al*, 2000).

O Desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina da classe dos tricotecenos produzida por *Fusarium graminearum*, mais comumente encontradas em grãos. Os tricotecenos são um grupo de mais de cem micotoxinas e possuem esse nome devido a sua estrutura química, composta de um anel com esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricotecenos (Figura 3). Essas toxinas são classificadas em tipo A, na qual se encontram as toxinas T-2, HT-2, 15-monoacetoxiscirpenol (15-MAS) e diacetoxiscirpenol (DAS), e em tipo B, na qual está o Desoxinivalenol (DON ou vomitoxina), que além de dupla ligação nas posições C9, 10 e anel epóxi na posição 12,13, caracteriza-se por apresentar carbonila no C8 (BANDO *et al*, 2007; SANTIN *et al*, 2000; FREIRE *et al*, 2007).

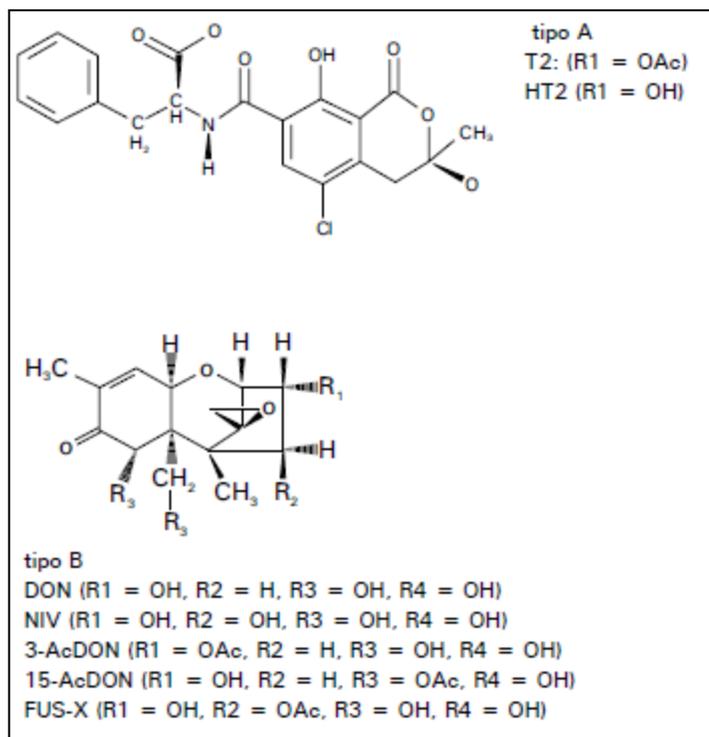


Figura 3: Estruturas químicas dos tricotecenos tipo A e B.
Fonte: (FREIRE *et al*, 2007).

DON possui dois grupos OH alcoólicos secundários e um principal, além da presença de dois grupos funcionais quimicamente reativos, ou seja, uma cetona conjugada e um anel epóxi. Pelo menos uma, mas talvez estas duas funcionalidades podem estar associadas com a atividade tóxica do Desoxinivalenol. Sendo um tricoteceno do tipo B, esta toxina é solúvel tanto em água quanto em solventes polares como o metanol aquoso e o acetato de etila. O grupo 12,13-epóxi é estável ao ataque nucleofílico e a toxina é estável a temperatura de 120°C e não é decomposta em condições levemente ácidas (NIEVINSKI, 2009; ALMEIDA, 2006).

A ingestão de micotoxinas pode levar animais e o homem a quadros de intoxicação, chamados de micotoxicoses. Quando ingerido em doses elevadas por animais, ela causa náuseas, vômitos e diarreia. Quando ingerida por porcos e por outros animais, em pequenas doses, pode provocar perda de peso e recusa alimentar. Por induzir esses sintomas o desoxinivalenol é conhecido como vomitoxina ou fator de recusa de alimento (FREIRE *et al*, 2007).

Apesar de ser um dos tricotecenos menos tóxico, o DON é um dos mais frequentemente detectados em todo o mundo em maior concentração, e sua ocorrência é considerado um indicador da possível presença de outros tricotecenos mais tóxicos, sendo comumente encontrado em sementes de cártamo, cevada,

centeio, trigo e em misturas de alimentos. No entanto, fatores inerentes ao animal, como idade de exposição, é que determinam o nível de toxicidade da substância (FREIRE *et al*, 2007; SANTIN *et al*, 2000; SANTOS *et al*, 2011).

O efeito da micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado de doses menores que provocam distúrbios e alterações nos órgãos dos humanos e dos animais, devido ao efeito cumulativo. Estes sintomas estão correlacionados com o consumo de DON em concentrações de 3.000 a 93.000 µg/kg (CALORI-DOMINGUES *et al*, 2007).

Além de o DON ser uma micotoxina imunossupressora e imunotóxica, também inibe a síntese de DNA, RNA e proteínas e pode causar síndromes hemáticas e anoréxicas em mamíferos, e possui efeitos neurotóxicos (NIEVINSKI, 2009).

3.4 Ocorrência de DON

A ocorrência de DON em cereais e seus derivados têm importância tanto econômica quanto está relacionada com os regulamentos que visam proteger a saúde dos consumidores. As micotoxinas são de ocorrência universal, porém predominam em climas tropicais e subtropicais, onde a alta umidade e temperatura favorecem o desenvolvimento fúngico, oferecendo condições ideais para a produção de micotoxinas. Segundo Maziero & Bersot (2010), para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxinas são necessárias condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox.

Considerando a população fúngica do *Fusarium graminearum* e que as fusariotoxinas são produzidas, na sua maioria, em umidade elevada e em temperaturas de aproximadamente 20 a 26°C, o clima brasileiro oferece boas condições para que essas toxinas estejam presentes nos grãos utilizados na alimentação humana e de animais (SANTIN *et al*, 2000).

Pelas características de infecção do grão, as frações de moagem de trigo podem estar contaminadas com a toxina, frações como farelo pode ter maior concentração de DON do que as farinhas. A distribuição de DON nas frações do

trigo moído depende do grau de penetração fúngica no endosperma do grão e sua suscetibilidade é dependente da variedade da planta, sendo que quanto menor a penetração, maiores os níveis de DON encontrados na superfície do grão, e conseqüentemente, baixas concentrações de DON são encontradas na farinha de trigo produzida (ALMEIDA, 2006).

Segundo a WHO (2001), DON é termoestável a 120°C, moderadamente estável a 180°C e estável a 210°C por 30 a 40 minutos, é capaz de se manter ativo em condições ácidas, mas é sensível em pH básico. Neira *et al* (1997) mostraram que a concentração de DON pode ser reduzida em até 44% na massa do pão após o forneamento.

3.5 Legislação

A ANVISA publicou em fevereiro de 2012 a nova legislação sobre os limites máximos de micotoxinas em alimentos. A Resolução RDC nº 7 da ANVISA, de 18 de fevereiro de 2011, divide a aplicação dos Limites Máximos Tolerados em três etapas para adequação do setor produtivo, estando previsto para 1º de janeiro de 2012 o limite de 2000 µg/kg de DON em trigo integral, farinha de trigo, trigo para quibe e farelo de trigo. As próximas etapas, para farinha de trigo, massas, produtos de panificação, biscoitos e produtos de cereais, estão previstas para aplicação em janeiro de 2014, com Limite Máximo Tolerado de 1250 µg/kg, e janeiro de 2016, com LMT de 750 µg/kg (BRASIL, 2011).

Na Legislação preconizada pela *Commission of the European Communities* (2007), além de máximo permitido em cereais não transformados, existem valores máximos para farinha de cereais (750 µg/kg), pães, produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para refeições (500 µg/kg), massas alimentícias secas (750 µg/kg) e alimentos destinados a lactantes e crianças (200 µg/kg).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram adquiridas amostras de cinco marcas diferentes de pães integrais e brancos, comercializados em estabelecimentos da cidade de Ponta Grossa, Paraná. As marcas dos pães foram identificadas por letras (A, B, C, D e E), sendo o tipo de pão diferenciado pelos números 1 para pães integrais e 2 para pães brancos.

Foram utilizados dados dos resultados de DON de farinha de trigo e farelo, provenientes de análises de monitoramento mensal de um moinho local no ano de 2012.

4.2 Método

Foram realizadas análises de DON, em triplicata, utilizando-se o kit quantitativo Veratox[®] para Vomitoxina para toxinas naturais, que consiste em um teste imunoabsorvente ligado a enzimas competitivas diretas. Através do uso de um leitor de micropoços, os testes fornecem resultados em partes por bilhão (ppb). O limite de quantificação do método é de 25ppb (25µg/Kg). O método é aprovado pelo GIPSA (2012).

Amostras livres de DON e os controles concorrem com DON marcado com enzima (conjugado) para os locais de ligação aos anticorpos. Após uma etapa de lavagem, o substrato reage com o conjugado para produzir a cor azul. O leitor de ELISA é utilizado para reproduzir as densidades ópticas. As densidades ópticas da curva padrão e as densidades ópticas das amostras são plotadas contra a curva para calcular a concentração exata de DON.

Para a extração das amostras, foram diluídos 10g de cada amostra (pão esmigalhado) em 200ml de água destilada; após homogeneização por 3 minutos, foi realizada filtração em papel filtro qualitativo n°1. A sequência da análise está descrita na figura 4 (NEOGEN, 2009).



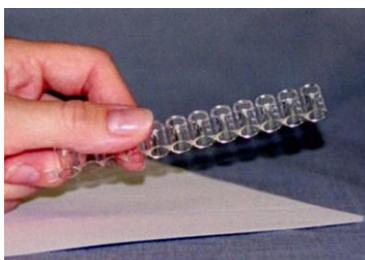
1- Adicionar 100 μ l do reagente “conjugado” nos micropoços vermelhos



2- Adicionar 100 μ l dos padrões de controle: 0, 25, 50, 100 e 250ppb nos primeiros micropoços e nos demais 100 μ l do filtrado de cada amostra.



3- Homogeneizar as amostras e transferir dos micropoços vermelhos para os transparentes (100 μ l) e incubar por 10 minutos em temperatura ambiente.



4- Descartar a amostra dos micropoços e lavar com água destilada por 5 vezes. Retirar o excesso de água com papel absorvente.



5- Transferir 100 μ l de “substrato” para os micropoços secos, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente.



6- Adicionar 100 μ l do reagente “stop” e realizada a leitura a 650nm no equipamento que acompanha o kit.

Figura 4: Procedimento de análise de DON (NEOGEN, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A média dos resultados da contaminação com DON das amostras de pães integrais avaliadas esta apresentada na Tabela 1, na qual pode se verificar que todas as amostras apresentaram-se contaminadas, porém em níveis abaixo do limite máximo tolerado ($1750\mu\text{g}/\text{Kg}$) estabelecido para micotoxinas na Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 para produtos de panificação, a partir de janeiro de 2012 (BRASIL, 2011).

Tabela 1: Resultados das análises de DON nos pães integrais e brancos

Pão Integral	Concentração de DON ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Pão Branco	Concentração de DON ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
A1	175,6 ^a	A2	49,2 ^a
B1	148,8 ^a	B2	359,6 ^b
C1	127,9 ^a	C2	162,4 ^c
D1	364,4 ^b	D2	102,0 ^{ac}
E1	102,5 ^a	E2	1294,1 ^d

Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Estudo realizado por Oliveira *et al* (2002) sobre a incidência de DON em produtos de panificação, farinha e farelo de trigo comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998 a 2000, mostrou que o DON foi detectado em 32 (68%) das 47 amostras analisadas, em uma faixa de concentração de 40 a $1205\mu\text{g}/\text{Kg}$, sendo que o limite de detecção da metodologia empregada foi de $20\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Baraj e Furlong (2003) avaliaram 112 amostras de farinha de trigo comercializadas na cidade de Rio Grande - RS e verificaram que apenas 2 amostras (1,8%) estavam contaminadas com DON em níveis de 128 e $323\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Araújo (2003) quantificou a ocorrência de DON em 78 amostras de farinha de trigo de todo o Brasil. Os resultados mostraram que 34,6% das amostras apresentaram contaminação por DON com nível médio de $283,9\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Calori-Domingues *et al* (2007), avaliaram 50 amostras de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul e 50 amostras de trigo importado (Argentina e Paraguai) comercializado no Brasil quanto à presença de desoxinivalenol e do total de amostras avaliadas, 94% do trigo nacional e 88% do

trigo importado apresentaram-se contaminados com DON em níveis médios de 332 µg/kg (nacional) e 90 µg/kg (importado). Apenas 4% das amostras de trigo nacional apresentaram níveis de DON maiores de 1.250 ppb, limite máximo aceito pela Comunidade Europeia.

No sul do Brasil, 24,91% das 297 amostras de trigo utilizado na alimentação humana apresentaram contaminação por Desoxinivalenol, com nível médio de 603,2 ppb e máximo de 8504 ppb (MALMANN *et al*, 2003). Outro estudo feito em São Paulo apresentou contaminação por DON em 45% das 42 amostras de trigo analisadas em níveis que variaram de 82 a 1500 ppb (LAMARDO *et al*, 2006).

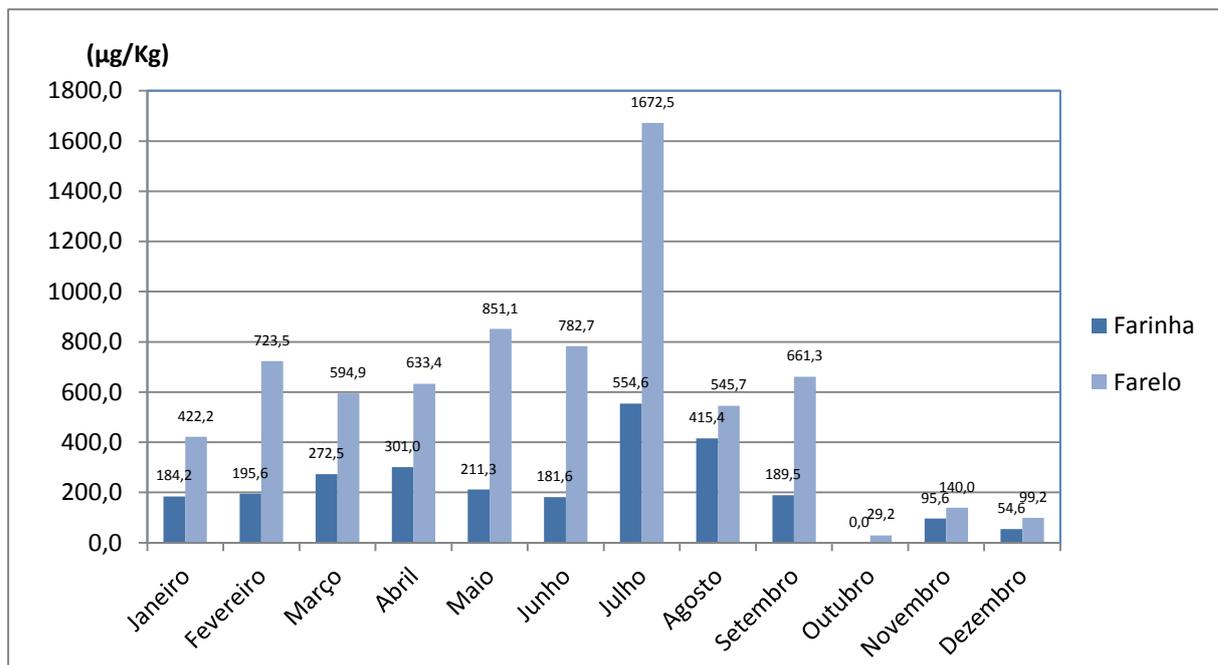
Pancin *et al* (1997) avaliaram a presença de DON em trigo, farinha de trigo, pães e massas amplamente consumidas pela população da Argentina e verificaram que 93,3% das amostras de trigo estavam contaminadas pela toxina em concentrações que variavam de 100 a 9.250 µg/kg. Foi encontrado em todas as amostras de farinha analisadas contaminação por DON (média 1.309 µg/kg) e em 92,8% das amostras dos diferentes produtos de panificação apresentando concentrações médias de 464 µg/kg.

Os resultados encontrados na literatura confirmam a ocorrência da contaminação por micotoxinas tanto em grãos quanto em derivados de trigo. As variações dos níveis encontrados nos diferentes estudos devem-se ao fato que cada ano/ safra a ocorrência de DON é distinta por depender diretamente das condições climáticas e de armazenamento do grão. Vários estudos apontam a correlação significativa e positiva entre a produção de DON, a umidade do grão e a temperatura de armazenamento. Os níveis relativamente baixos encontrados neste estudo indicam boas condições de armazenamento e manejo do grão utilizado como matéria-prima para a produção dos pães (NIEVINSKI, 2009).

De acordo com a literatura, a ocorrência de DON em alimentos integrais é maior devido à distribuição não uniforme da micotoxina em diferentes frações de moagem do trigo, sendo que o farelo pode apresentar maior teor de DON que as farinhas (ALMEIDA, 2006).

Os dados obtidos das médias dos teores de DON em farinha e farelo no ano de 2012 estão apresentados no Gráfico 1 e demonstram que o farelo apresenta níveis elevados de DON em relação às farinhas de trigo.

Gráfico 1: Resultados dos teores de DON em farinha e farelo em 2012



A variação na concentração de DON em farelo e farinha observada nos meses de maio, junho e julho refletem as condições de armazenamento do trigo. Nesses meses, o grão já está armazenado por um longo período, e dependendo das condições climáticas, da interação do grão com o ambiente e das condições de armazenamento, pode haver uma contaminação tardia, porém o fungo não consegue penetrar profundamente no grão, e a infecção fica restrita a casca, aumentando os níveis de DON no farelo (CALORI-DOMINGUES *et al*, 2007).

Samar *et al* (2003) avaliando a distribuição de DON em frações obtidas a partir da moagem de trigo mostraram que o farelo possuía níveis superiores de DON (4680 µg/kg) em relação ao grão (1928 µg/kg) e a farinha (994 µg/kg), que apresentou a menor concentração da toxina.

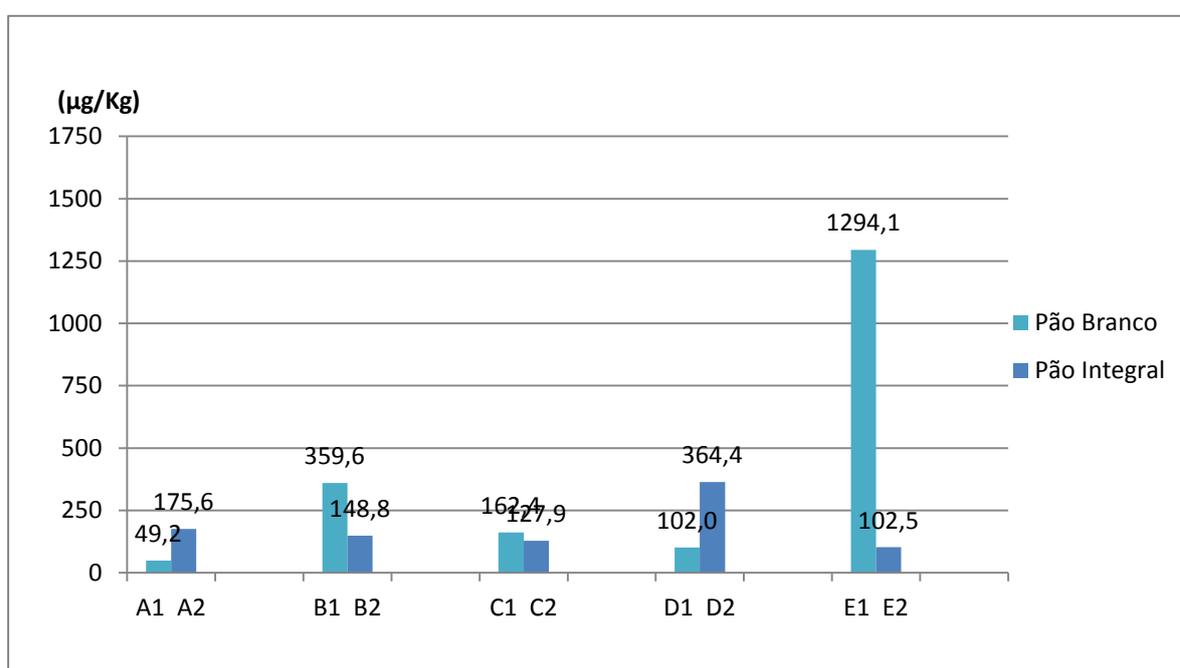
Segundo Neira *et al* (1997) o processo de forneamento durante a fabricação de pães pode reduzir significativamente a contaminação por DON e diminuir a exposição humana a essa micotoxina, uma vez que a toxina pode ser inativada em temperaturas superiores a 210°C (WHO, 2001).

Um estudo realizado no Rio Grande do Sul observou uma redução média de 23% nos valores de DON após a moagem do trigo, e que este percentual é menor quanto maior a contaminação por DON (NIEVINSKI, 2009).

A comparação das médias dos resultados encontrados nos pães brancos e integrais das mesmas marcas estão representados no Gráfico 2. É possível observar

que apenas as marcas A e D apresentaram teores de DON 3,6 vezes maiores nos pães integrais. A marca C não apresentou diferença significativa entre os pães branco e integral. As marcas B e E apresentaram diferenças significativas entre os pães brancos e integrais, possivelmente devido à procedência da farinha utilizada na fabricação dos pães. A amostra E de pão branco apresentou teor muito elevado, sendo a amostra que mais se aproximou do Limite Máximo Tolerado pela legislação (1750 µg/kg).

Gráfico 2: Concentração de DON em pães brancos e integrais



Entre as amostras analisadas foi possível identificar a presença de concentrações significativas de DON em todas as amostras analisadas. Segundo Anton *et al* (2006), na fabricação de produtos de panificação integrais se utiliza, geralmente, uma mistura de farinhas integral e refinada, visando obter um produto final de acordo com a preferência e os hábitos do consumidor.

O farelo e a farinha de trigo utilizada para fabricação dos pães podem não ser da mesma procedência, podendo ser um dos responsáveis pela variação na concentração de DON nos pães brancos e integrais.

A falta de controle nas etapas pós-colheitas do grão de trigo, combinadas com condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do *Fusarium*

graminearum, é outro fator que pode ter interferido diretamente nos resultados encontrados.

Uma matéria-prima de má qualidade, mesmo com a redução dos níveis de toxinas durante o processamento, não originará um produto final com boa qualidade para atender as exigências dos consumidores.

6 CONCLUSÃO

A contaminação das culturas de trigo por fungos patógenos e a produção de micotoxinas é influenciada diretamente pelas condições climáticas e de armazenamento.

Entre as micotoxinas presentes em cereais, o DON apresenta baixa toxicidade, porém é detectada em maior concentração, sendo considerada uma boa indicadora da qualidade sanitária do trigo. A ingestão de DON pode causar náuseas, vômito e diarreia, mas seu efeito varia com a dose ingerida e condições físicas do indivíduo.

A distribuição não uniforme das micotoxinas no grão e a infecção tardia, causada por falhas no armazenamento, fazem com que o farelo apresente teores mais elevados de DON que a farinha.

Todas as amostras de pães analisadas apresentaram contaminação por DON, e embora estejam em níveis abaixo do estabelecido pela legislação brasileira, demonstra que é necessário maior controle dos grãos de trigo desde o cultivo até o armazenamento, para reduzir os níveis de micotoxinas e fornecer alimentos que atendam as expectativas dos consumidores, sem causar danos à saúde.

REFERÊNCIAS

GIPSA, Grain Inspection Packers & Stockyards Administration. **Testing Trucklots of Barley and Wheat for Deoxynivalenol (DON)**. USDA. 2012. Disponível em: http://www.gipsa.usda.gov/fgis/insp_weigh/inspwgh/don.pdf. Acesso em 10 de março de 2012.

ALMEIDA, R.R.. **Ocorrência de *Fusarium graminearum* e desoxinivalenol em grãos de trigo utilizados no Brasil**. *Dissertação de mestrado*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2006.

ANTON, A., DE FRANCISCO, A., HASS, P. **Análise físico-química de pães da cidade de Florianópolis e a situação dos alimentos integrais no Brasil**. *Alim. Nutr.*, v.17, p. 381-386, Out – Dez, 2007.

ARAUJO, D. **Concentrações de deoxinivalenol em farinha de trigo**. *Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC*, 2003.

BANDO, E., GONÇALES, L., TAMURA, N. K., MACHINSKI, M. **Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas**. *J. Bras Patol Med Lab*, v.43, p. 175-180, 2007.

BARAJ, E., FURLONG, E. **Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2**. *Revista Adolfo Lutz*, v.62, n.2, p.95 – 104, 2003

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. *Portaria n° 354, de 18 de julho de 1996*.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011.

BRASIL. **Ministerio da Agricultura**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Trigo. Instrução Normativa SARC n° 7, de 15 de agosto de 2001.

CALORI-DOMINGUES, M., ALMEIDA, R., TOMIWAKA, M., GALLO, C., GLORIA, E., DIAS, C. **Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil.** *Ciên. Technol. Aliment.*, 27, p. 181-185, jan – mar, 2007.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Regulation (EC) Nº 1881/2006** setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Commission Regulation (EC) Nº 1126/2007 of 28 September 2007.*

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012.** *Sexto Acompanhamento.* Março, 2012.

DEL PONTE, E., J.M.C., F., PIEROBOM, C., BERGSTROM, G. **Giberela do trigo: aspectos epidemiológicos e modelos de previsão.** *Fitopatologia Brasileira*, n. 29, p. 587-606, 2004.

EMBRAPA. **Embrapa Trigo.** *Documentos Online 74.* Dezembro, 2006. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em 10 de março de 2012.

EMBRAPA. **Embrapa Trigo.** Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>. Acesso em 10 de março de 2012.

FREIRE, F., VIEIRA, I., GUEDES, M., MENDES, F. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal.** *Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos 110*, p. 48, Outubro, 2007.

GARDA, J., BADIALE-FURLONG, E. **Otimização de metodologia para derivação de desoxinivalenol através de planejamento experimental.** *Quim. Nova*, v.31, p. 270-274, 2008.

GOMES, S. **Micotoxinas do *Fusarium* sp: uma questão sanitária.** *Monografia*, Universidade de Brasília, Brasília. Março, 2003.

JEFCA. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food, prepared by the fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.** *WHO Food Additives Series 47*, 2001.

KANEMARU, M., GASPERINI, A., HASHIMOTO, E. **Contaminação Fúngica de Trigo na Região Sudoeste do Paraná e Oeste de Santa Catarina.** *II Encontro Paranaense de Engenharia de Alimento*. Guarapuava, Paraná: UNICENTRO. Maio, 2011.

LAMARDO, L., NAVAS, S., SABINO, M. **Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo.** *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.65, n.1, p. 32-35, 2006.

LOPES, E., FRANCO, B. **Influência do controle da etapa de molhagem dos grãos na qualidade microbiológica da farinha de trigo.** *Alim. Nutr.*, 17(1), p. 209-218, abr-jun, 2006.

MALMANN, C., DILKIN, M., MURMANN, L., DILKIN, P., ALMEIDA, C. **Avaliação da contaminação por desoxinivalenol em trigo utilizado na alimentação humana.** *Anais*. In: I Congresso Brasileiro de Farmácia, 2003.

MAZIERO, M., BERSOT, L. **Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil.** *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.12, p. 89-99, 2010.

NEIRA, M., PANCIN, A., MARTÍNEZ, E., MOLTÓ, G., RESNIK, S. **The effect of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination.** *International Journal of Food Microbiology*, v.37, p.21-25, 1997.

NEOGEN. **Natural toxins - Veratox.** *Material fornecido pela empresa Hexis Científica*. São Paulo - SP, 2009.

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

OLIVEIRA, M. E. **Incidência de aflatoxinas, desoxivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000**. *Revista Adolfo Lutz*, v.61, n.1, p. 1 – 6, 2002.

WHO. World Health Organization. **Deoxynivalenol**. In: *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*, Food Additives Series 47, p.419-528. London, 2010.

PANCIN, M., RESNIK, L., NEIRA, S., MOLTO, G., MARTÍNEZ, E. **Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina**. *Food Additives and Contaminants*, v.14, p.327-331, 1997.

SAMAR, M., FONTANA, C., RESNIK, S. P., CASTILHO, M. **Distribution of DON in wheat, wheat flour, bran and glúten nd variability associated with test procedure**. *Journal of AOAC International*, v.86, p.551-556, 2003.

SANTIN, E., MAIORKA, A., ZANELLA, I., MAGON, L. (2000). **Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial**. *Ciência Rural*, v.31, n.1, p. 185-190, 2000.

SANTOS, J. et al. **Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo**. *Semina: Ciências Agrárias*, v.32, p. 1439-1450, Out – Dez, 2011.