



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE  
ZEARALENONA, OCRATOXINA A E AFLATOXINA B1 E AVALIAÇÃO DO  
EFEITO DO PROCESSAMENTO DO PÃO SOBRE OS NÍVEIS DESTAS  
MICOTOXINAS**

Letícia Araujo

Porto Alegre

2014/2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE  
ZEARALENONA, OCRATOXINA A E AFLATOXINA B1 E AVALIAÇÃO DO  
EFEITO DO PROCESSAMENTO DO PÃO SOBRE OS NÍVEIS DESTAS  
MICOTOXINAS**

Letícia Araujo

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Engenheiro de alimentos

Orientadora: Dra. Juliane Elisa Welke

Porto Alegre

2014/2

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE  
ZEARALENONA, OCRATOXINA A E AFLATOXINA B1 E AVALIAÇÃO DO  
EFEITO DO PROCESSAMENTO DO PÃO SOBRE OS NÍVEIS DESTAS  
MICOTOXINAS**

Letícia Araujo

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Juliane Elisa Welke (Orientadora)

ICTA – UFRGS

---

Profa. Dra. Maria Elisabete Machado

IQ – UFRGS

---

Profa. Dra. Patrícia da Silva Malheiros

ICTA – UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Nilza e Leandro, e aos meus irmãos Leonardo e Leanderson, por todo amor, carinho, apoio, incentivo e dedicação, por sempre estarem ao meu lado e acreditarem em mim acima de tudo. Em especial a minha mãe, por ter compartilhado cada insegurança, cada aflição e também cada alegria que tive em toda a minha vida, principalmente na faculdade, sempre me apoiando e me dando todo o suporte que eu precisava.

Ao meu namorado, companheiro, amigo Eduardo, que foi um dos presentes que a Universidade me deu, que esteve comigo em toda essa grande jornada que foi a faculdade e, principalmente nesse último ano, que sem dúvida foi o mais difícil de todos. Que soube me compreender, me respeitar, me encorajar, me alegrar nos momentos que eu mais precisava.

A minha grande amiga e companheira de trabalhos, de noites em claro de estudo, Fabiana. Obrigada por partilhar comigo desse caminho de tantas dificuldades, mas também de alegrias. A todos os amigos e colegas que a Engenharia de Alimentos me deu e que fizeram tudo ficar menos difícil.

A minha orientadora, Juliane Welke, que fez despertar ainda mais meu interesse pela Toxicologia dos Alimentos. Obrigada pelo apoio, auxílio, parceria e direcionamento para que este trabalho de conclusão de curso fosse bem executado. Foi uma honra poder trabalhar e aprender ainda mais contigo.

Aos professores do ICTA, por todos os ensinamentos e aprendizados, tanto profissionais quanto pessoais, durante a graduação.

À UFRGS e ao ICTA, pela infra-estrutura oferecida e conhecimento proporcionado.

## RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por espécies de fungos filamentosos. Dentre as micotoxinas conhecidas, destacam-se a zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) por seus efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos e estrogênicos. Estudos realizados em diferentes países têm demonstrado que a farinha de trigo e os produtos de panificação podem conter ZEA, OTA e AFB1. Entretanto, a presença simultânea destas três micotoxinas em trigo e derivados ainda não foi estudada. O efeito do processamento do pão sobre os níveis de ZEA, OTA e AFB1 foi avaliado utilizando um método cromatográfico. O método desenvolvido comprovou ser eficaz para a determinação simultânea das micotoxinas. Observou-se uma taxa de redução de micotoxinas de 36% da farinha em relação à massa antes da fermentação para as três micotoxinas devido ao efeito de diluição ocasionado pela adição dos demais ingredientes. A fermentação não resultou em redução das micotoxinas. A temperatura de assamento de 220°C foi a que apresentou maior taxa de redução de ZEA (89%) e OTA (80%), porém AFB1 demonstrou-se resistente ao tratamento térmico, não apresentando redução em nenhuma das três temperaturas avaliadas (170, 220 e 270°C).

Palavra-chave: micotoxinas, farinha de trigo, pão, cromatografia

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	2
3 OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivos gerais .....	12
3.2 Objetivos específicos .....	12
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
4.1 Micotoxinas .....	13
4.1.1 Aflatoxina B1 .....	14
4.1.2 Zearalenona.....	15
4.1.3 Ocratoxina A .....	16
4.2 Efeitos tóxicos da AFB1, ZEA e OTA.....	17
4.3 Ocorrência de micotoxinas em trigo e pão.....	19
4.4 Legislação.....	22
5 MATERIAS E MÉTODOS .....	23
5.1 Preparo das soluções-padrão .....	23
5.2 Validação do método de determinação de micotoxinas.....	23
5.3 Processo de adição de ZEA, OTA e AFB1 na farinha de trigo.....	24
5.4 Elaboração do pão.....	25
5.5 Efeito do processamento do pão sobre os níveis de ZEA, OTA e AFB1 .....	25
5.6 Determinação das micotoxinas .....	25
5.7 Análise estatística .....	27
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
6.1 Validação do Método .....	27
6.2 Efeito do processamento do pão nos níveis de ZEA, OTA e AFB1 .....	33
7 CONCLUSÃO .....	36
8 BIBLIOGRAFIA .....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de AFB1, OTA e ZEA em trigo, farinha de trigo e pão produzidos em diferentes locais.....	21
Tabela 2. Intervalo de linearidade, equação de regressão, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método CCD-DCA utilizado para a determinação simultânea de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1).....	29
Tabela 3. Valores médios (n = 6) para recuperação (%), repetibilidade e precisão intermediária da aflatoxina B1 (AFB1), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) extraída da farinha de trigo e pão e determinadas por CCD-DCA.....	30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da aflatoxina B1 .....	10
Figura 2. Estruturas química da (A) zearalenona (ZEA), (B) $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL), e (C) $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL).....	16
Figura 3. Estrutura química da ocratoxina A.....	17
Figura 4. Imagem da placa de CCD adquiridas pelo DCA e a respectiva representação gráfica gerada pelo <i>software</i> Imagem J a partir dos pontos fluorescentes de micotoxinas nas seguintes concentrações: (A) 0,0025 $\mu$ g, 0,005 $\mu$ g, 0,0075 $\mu$ g, 0,01 $\mu$ g e 0,0125 $\mu$ g de aflatoxina B1; (B) 0,008 $\mu$ g, 0,016 $\mu$ g, 0,024 $\mu$ g, 0,032 $\mu$ g e 0,04 $\mu$ g de ocratoxina A; (C) 0,1 $\mu$ g, 0,3 $\mu$ g, 0,5 $\mu$ g, 0,7 $\mu$ g e 0,9 $\mu$ g de zearalenona. ....	28
Figura 5. Separação de aflatoxina B1 (AFB1), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) na placa de CCD contendo as seguintes quantidades: (A) 10 $\mu$ L de extrato de amostra de pão em triplicata (região destacada) e 5 $\mu$ L de cada solução padrão de micotoxinas (10 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> de AFB1, 40 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> de OTA e 100 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> de ZEA). (B) Superfície tridimensional gerada a partir da placa de CCD contendo os picos de cada padrão de micotoxinas (ZEA, OTA e AFB1) e as micotoxinas detectadas na amostra avaliada em triplicata. Cada micotoxina pode ser vista em uma linha da Figura 5B e foi indicado com um ponto de cor: verde (ZEA), azul (OTA) e vermelho (AFB1). ....	32
Figura 6. Percentual de redução de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) durante a produção de pão (A porcentagem de redução das	



micotoxinas adicionadas no pão foi considerada na temperatura de assamento de 270° C durante 20 min).....34

Figura 7. Redução da zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) após o assamento do pão em três diferentes combinações de temperatura/ tempo (170°C/50 min, 220°C/35min, 270°C/20 min). O pão foi elaborado com farinha contendo os seguintes níveis de micotoxinas: ZEA (800 µg kg<sup>-1</sup>), OTA (40 µg kg<sup>-1</sup>) e AFB1 (20 µg kg<sup>-1</sup>). Valores seguidos de mesma letra não são significativamente diferentes (p <0,05) pelo teste de Tukey. ....35

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de trigo é de cerca de 600 milhões de toneladas por ano, sendo que aproximadamente 75% do trigo é convertido em farinha (FAO, 2013). A farinha de trigo é destinada principalmente para a produção de derivados de panificação. Os pães, por exemplo, são produtos da cesta básica, cujo consumo estimado pelos brasileiros é de 34 kg per capita por ano (ABIP, 2003).

Diversos estudos relatam a contaminação do trigo com espécies de fungos produtores de micotoxinas (SKRBIC et al., 2012; ALEXA et al., 2013; VIDAL et al., 2013; ALMEIDA-FERREIRA et al., 2013; LINDBLAD et al., 2013; IQBAL et al., 2014). Micotoxinas são metabólitos secundários com variado grau de toxicidade, produzidos por diversos fungos e não essenciais para seu crescimento e sobrevivência (SONGSEMSAKU et al., 2008).

Entre as principais micotoxinas que têm sido encontradas no trigo e derivados pode-se destacar a zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1). A ocorrência de micotoxinas em trigo e derivados é reconhecida em todo o mundo, incluindo a presença de ZEA, OTA e AFB1 na Espanha (VIDAL et al., 2013) e Sérvia (SKRBIC et al., 2012), AFB1 e ZEA no Paquistão (IQBAL et al., 2014), ZEA no Brasil (ALMEIDA-FERREIRA et al., 2013) e ZEA e OTA da Romênia (ALEXA et al., 2013).

As micotoxinas induzem diferentes e poderosos efeitos biológicos negativos, incluindo o hiperestrogenismo, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade que estão relacionados à ZEA, OTA e AFB1, respectivamente (ROCHA et al., 2014). Considerando a toxicidade destas toxinas, a legislação brasileira estabelece limites

máximos para AFB1 ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e OTA ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) em cereais e produtos de cereais e ZEA em farinha de trigo e produtos de panificação ( $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  até dezembro de 2015 e a partir de janeiro de 2016 este limite será reduzido para  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (BRASIL, 2011).

Em vista do consumo de trigo ocorrer principalmente na forma de pães, e a possível ocorrência de ZEA, OTA e AFB1 nestes produtos, se faz necessário o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea destas três micotoxinas e também, determinar o efeito do processamento do pão nos níveis de micotoxinas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Avaliar os efeitos do processamento do pão sobre os níveis de ZEA, OTA e AFB1 através de um método cromatográfico desenvolvido para a detecção simultânea destas três micotoxinas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Validar o método desenvolvido para detecção simultânea de ZEA, OTA e AFB1 em farinha de trigo e pão;

- Verificar o efeito da preparação do pão através do método cromatográfico de determinação simultânea nos níveis de ZEA, OTA e AFB1 presentes na farinha de trigo;

- Avaliar através do método cromatográfico de determinação simultânea três combinações de tempo e temperatura de assamento do pão nos níveis de ZEA, OTA e AFB1.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos de determinados gêneros e sem função aparente em seu metabolismo. Estes compostos apresentam efeito tóxico para o homem e outros vertebrados, além de alguns invertebrados, plantas e micro-organismos (BENNETT & KLICH, 2003). Segundo Abrunhosa (2008) as micotoxinas são produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenóides e de alguns aminoácidos. Diversos estudos tem revelado a existência de pelo menos cerca de 400 micotoxinas diferentes (BETINA, 1984), entretanto apenas 20 tipos de micotoxinas, produzidas por diferentes espécies de fungos, são encontradas em quantidades suficientes para constituírem um verdadeiro risco para a saúde alimentar (SARTORI 2006).

Os gêneros fúngicos mais freqüentemente associados à produção de micotoxinas em cereais são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Dentre as micotoxinas que esses gêneros de fungos podem produzir destacam-se a aflatoxina, ocratoxina, zearalenona, patulina, fumonisina e desoxinivalenol (HUSSEIN & BRASSEL, 2001; RODRÍGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002; MURPHY et al., 2006)

As micotoxinas comumente ocorrem na alimentação humana e animal podendo aparecer antes da colheita, no pós-colheita ou durante o processamento e armazenamento, afetando negativamente a qualidade dos alimentos (SFORZA et al., 2006). Os principais fatores que determinam o desenvolvimento de fungos e conseqüentemente a produção de micotoxinas são umidade relativa do ar,

temperatura e atividade de água do alimento.

A umidade relativa mínima onde os fungos crescem é de 70%, e a umidade relativa ótima é de 80-85%, contudo eles também podem crescer a uma umidade relativa de 90-100%. A temperatura ótima de crescimento dos fungos não é necessariamente a mesma de produção de micotoxinas. Os maiores índices de contaminação em alimentos se encontram nas regiões tropicais e semi tropicais, onde o clima com oscilações de temperatura durante um mesmo dia favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos. A atividade de água (Aa) que pode acarretar na produção de fungos situa-se na faixa de 0,70-0,90 (TANIWAKI & SILVA, 2001; SCUSSEL, 1998).

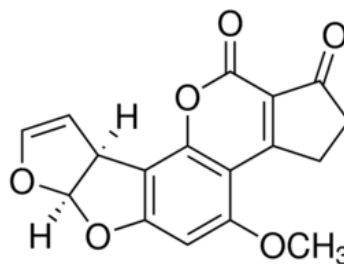
Desde a idade média sabe-se de doenças causadas por micotoxinas. A doença chamada "fogo de Santo Antônio", também denominada de ergotismo, se manifestou no sul da França nessa época e causou a morte de diversas pessoas que consumiram grãos de cereais contaminados por *Claviceps purpurea* (KRUPPA, 2004). Entretanto, foi somente na década de 60 que as micotoxinas ganharam relevância, quando na Inglaterra, cem mil perus morreram devido à necrose hepática. Após investigações, descobriu-se que a torta de amendoim usada na alimentação animal estava altamente contaminada com *Aspergillus flavus* que é capaz de produzir aflatoxinas (GOLDBLATT, 1969). Cabe salientar que dentre as micotoxinas, conhecidas até o momento, as aflatoxinas são as mais tóxicas (WU et al., 2014).

#### **4.1.1 Aflatoxina B1**

As aflatoxinas são produtos secundários do metabolismo dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* que frequentemente

contaminam alimentos, tais como, cereais, leguminosas e sementes oleaginosas (PRADO et al., 2008; MAIA et al., 2007).

A estrutura da molécula das aflatoxinas consiste de um anel ciclopentanona ou lactona condensado à uma molécula de bifurano cumarina. A AFB1 se diferencia das demais aflatoxinas por possuir um anel ciclopentanona e uma ligação dupla entre os carbonos C8 e C9 em um dos anéis furano (Figura 1) (MALLMANN et al., 2003; NORDIN, 1995).



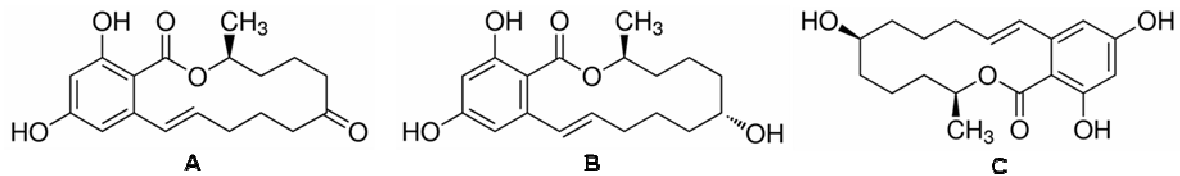
**Figura 1.** Estrutura química da aflatoxina B1

As aflatoxinas são pouco solúveis em água ( $10\text{-}30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e bastante solúveis em solventes orgânicos tais como clorofórmio e metanol. São instáveis a agentes oxidantes ou a valores de pH extremos ( $<3$  ou  $>10$ ). O anel lactona das aflatoxinas é suscetível a ação de bases fortes. As aflatoxinas também são degradadas através da reação com amônia ou hipoclorito de sódio. Devido às aflatoxinas apresentarem elevadas temperaturas de fusão ( $269 \text{ }^\circ\text{C}$ ), elas podem não ser totalmente degradadas em temperaturas de cocção, pasteurização e torrefação (FERREIRA et al., 2006; NORDIN, 1995).

#### **4.1.2 Zearalenona**

A ZEA é uma micotoxina descrita como uma lactona do ácido fenólico resorcílico contendo uma ligação insaturada no C1-C2 e uma função cetona na

posição C6 (VEKIRU et al., 2010); podendo sofrer redução a ligação insaturada e/ou a posição da função cetona produzindo uma série de congêneres estereoisômeros (Figura 2) (MARAGOS, 2010).



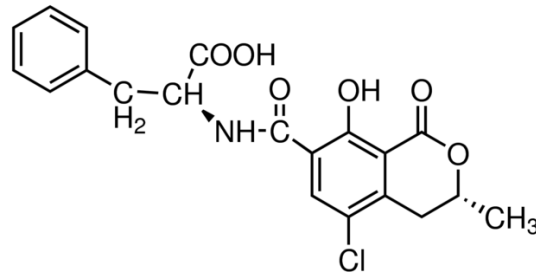
**Figura 2.** Estruturas químicas da (A) zearalenona (ZEA), (B)  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL), e (C)  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL).

Os fungos do gênero *Fusarium* conhecidos como produtores de ZEA são: *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* e *F. moniliforme* (SANTIN et al., 2000). Estas espécies são conhecidas por serem contaminantes frequentes de trigo, milho, arroz e cevada (MIROCHA et al., 1974;. PANDE et al., 1990; YAMASHITA et al., 1995;. JIMENEZ et al., 1997).

#### 4.1.3 Ocratoxina A

A OTA caracteriza-se por apresentar uma estrutura molecular que consiste basicamente de uma  $\beta$ -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma ligação amida (Figura 3) (VAN DER MERWE et al., 1965). Possui uma molécula de cloro em sua estrutura, o que potencializa seu caráter tóxico (EDWARDS et al., 2002).





**Figura 3.** Estrutura química da ocratoxina A.

A OTA foi descoberta como um metabólito de cultura de *Aspergillus ochraceus*, em 1965, na África por Van Der Merwe et al., ao observar sua presença em amostras de milho (BENNETT & KLICH 2003). Mais tarde foi identificada como um metabólito secundário de várias outras cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* (ROSA et al., 2002). Em 1969, foi relatada sua presença como contaminante em gêneros alimentícios, primeiramente em milho e cereais e depois em um grande número de produtos de origem animal e vegetal (TATEO et al., 2000).

A contaminação por OTA pode ocorrer principalmente em cereais como trigo, milho, arroz, centeio, cevada e aveia e também tem sido relatada em amendoim e frutos secos. A presença de OTA nos produtos alimentares tais como café, vinho e cerveja, comprova a sua relativa estabilidade química durante o processamento (AL-ANATI et al., 2006).

#### 4.2 Efeitos tóxicos da AFB1, ZEA e OTA

As micotoxinas são conhecidas por serem mutagênicas, teratogênicas, imunossupressoras e em alguns casos, carcinogênicas (AMARAL et al., 2006). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou a AFB1 no grupo 1, como um carcinógeno para os humanos (IARC, 2012). A OTA foi classificada como um possível carcinógeno para os seres humanos (grupo 2B) e a ZEA e seus

derivados são classificados no grupo 3 ("não classificável quanto à sua carcinogenicidade em seres humanos) (IARC, 1993).

A AFB1 é a micotoxina de maior prevalência e também a de maior toxicidade, provocando profundas alterações tais como: hemorragias devido à inibição da coagulação sanguínea e lesões agudas e crônicas nos hepatócitos. A exposição crônica pode levar ao câncer no fígado e em algumas partes do mundo foi verificado o sinergismo entre a AFB1 e o vírus da hepatite B (MALLMANN et al., 2003). Em ratos Wistar machos, a redução de peso corporal foi relacionada à exposição à AFB1 (SUPRIYA et al., 2014). Além disso, Hou et al. (2014) demonstrou que AFB1 juntamente com ZEA são tóxicas para o sistema reprodutivo, prejudicando a capacidade de desenvolvimento de ovários e diminuição da qualidade dos oócitos.

A ZEA possui atividade estrogênica por apresentar uma estrutura semelhante ao 7- $\beta$ -estradiol, principal hormônio feminino produzido nos ovários (BENNET et al., 2003). ZEA e seus congêneres ( $\alpha$ - e  $\beta$ - zearalenol), são capazes de se ligar a receptores de estrogênio (BOVEE et al., 2004; SŁOMCZYNSKA, 2004), sendo o congênere  $\alpha$ -zearalenol o que apresenta maior atividade estrogênica. Em consequência dessa atividade estrogênica, a ZEA pode levar à alterações hipertróficas em tecidos uterinos (GAJ et al., 2007), inibição da atividade ovariana (JAKIMIUK et al., 2006) e mudanças no comportamento reprodutivo dos animais (KUSTRITZ, 2005). Os suínos estão entre as espécies mais sensíveis aos efeitos estrogênicos da ZEA (BRYDL et al., 2014; LIU et al., 1995), entretanto também foram observados problemas reprodutivos em vacas e ovinos em função do consumo de ração contendo ZEA (EL-NEZAMI 2002). Os efeitos relatados em animais sexualmente maduros são atrofia do ovário, período maior do cio,

persistência do corpo lúteo (não liberação do óvulo não fecundado), pseudociese (gravidez psicológica), diminuição da fertilidade, natimorto e falhas de implantação do embrião no útero (KUIPER-GOODMAN et al., 1987).

A OTA foi associada à neuropatia endêmica dos Bálcãs, doença degenerativa da função renal, causada pela exposição a altos níveis desta micotoxina através do consumo de alimentos produzidos na região dos Balcãs, que engloba os países Albânia, Bósnia-Herzegovina, Bulgária, Croácia, Grécia, Macedônia, República da Moldávia, Romênia, Eslovênia, Sérvia e Montenegro (SOARES, 1997). Além disso, esta toxina tem demonstrado efeito hepatotóxico, imunossupressor, teratogênico e carcinogênico (BEARDALL et al., 1994; KUIPER-GOODMAN et al., 1989; PLESTINA, 1996; SCHLATTER et al., 1996).

#### **4.3 Ocorrência de micotoxinas em trigo e pão**

A elevada incidência de fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* no trigo é observada quando, por exemplo, a colheita, transporte e armazenamento ocorrem em condições de temperatura e umidade elevadas ou na presença de insetos que podem causar danos na superfície do grão. Nestas condições pode-se verificar níveis aumentados de ZEA, OTA e AFB1 no trigo e nos produtos feitos a partir do trigo (BIRCK et al., 2006; GARCIA et al., 2003; JUAN et al., 2012; KACHUEI et al., 2007). Considerando a produção de micotoxinas em alimentos, é importante ressaltar que nem todas as cepas da mesma espécie são toxigênicas. A presença de fungos toxigênicos em alimentos não confirma a presença de micotoxinas, mas sim a possibilidade de contaminação. Além disso, a ausência de fungos viáveis, não garante que o alimento esteja livre destes

compostos, visto que estas toxinas permanecem por um longo tempo, mesmo após o fungo ter perdido a sua viabilidade (COSTA 2005).

Em geral, contaminação simultânea de algumas micotoxinas é observada nos alimentos. Alkadri et al. (2014) detectou a presença de AFB1 e OTA em amostras de trigo produzido na Itália e na Síria. Gali et al. (2008) e Terken et al. (2005) verificaram a presença de aflatoxina e OTA em grãos de trigo e farinhas elaboradas na Turquia. Muthomi et al. (2008) encontraram DON, toxina T-2 e ZEA em grãos de trigo comercializados no Quênia. Kirincic et al. (2014) detectaram ZEA e OTA em amostras de trigo e produtos a base de trigo da Eslovênia. Estes dados são preocupantes, uma vez que pouco se sabe sobre os possíveis efeitos sinérgicos associados com a ingestão de várias micotoxinas na saúde humana.

A Tabela 1 apresenta uma visão geral de outros casos de ocorrência de ZEA, OTA e AFB1 em diversas regiões. Conforme pode ser observado, foi encontrado contaminação simultânea de ZEA e OTA e também de ZEA e AFB1 tanto em trigo quanto em farinha de trigo e pão em diversos países, demonstrando que existe não somente a contaminação por uma micotoxina.

**Tabela 1.** Ocorrência de ZEA, OTA e AFB1 em trigo, farinha de trigo e pão produzidos em diferentes locais.

<b>Micotoxina</b>	<b>Amostra</b>	<b>Origem</b>	<b>Amostras positivas</b>	<b>Referência</b>
ZEA	Trigo	Países europeus	432/3008	EFSA, 2011
		Taiwan	2/35	Liao et al., 2011
		Moçambique	8/30	Warth et al., 2012
		Malásia	25/100	Soleimany et al., 2012
		Croácia	35/51	Pleadin et al., 2013
	Farinha de trigo	Portugal	3/13	Cunha et al., 2010
	Pão	Países europeus	94/1247	EFSA, 2011
OTA	Trigo	Taiwan	4/35	Liao et al., 2011
		Índia	29/50	Kumar et al., 2012
		Malásia	40/100	Soleimany et al., 2012
	Farinha de trigo	Países mediterrâneo	3/265	Serrano et al., 2012
Pão	Portugal	2/8	Paíga et al., 2012	
AFB1	Trigo	Moçambique	4/30	Warth et al., 2012
		Malásia	60/100	Soleimany et al., 2012
	Farinha de trigo	Países mediterrâneo	27/265	Serrano et al., 2012

#### 4.4 Legislação

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu limites para a presença de micotoxinas em diversos tipos de alimentos através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 07 de 18 de março de 2011. Como mencionado na introdução, a legislação brasileira estabelece limites máximos para OTA ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e AFB1 ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) em cereais e derivados, e ZEA ( $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) para trigo e produtos de panificação.

Na Europa, os limites máximos para micotoxinas são definidos no Regulamento nº 188 de 19 de dezembro de 2006. A aflatoxina tem um limite máximo tolerável de  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cereais e alimentos a base de cereais. A OTA tem um limite máximo de  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cereais e de  $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para alimentos a base de cereais. A ZEA tem um limite máximo de  $75 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cereais e de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  para alimentos a base de cereais.

Comparando a legislação brasileira e europeia, pode-se observar uma diferença em relação aos limites máximos permitidos de ZEA e OTA. Estes valores são menores na legislação da Europa para estas duas micotoxinas. Além disso, existe uma diferença entre os limites máximos estabelecidos para cereais e aqueles valores especificados como máximos para produtos a base de cereais, o que não é observado na legislação brasileira. Isso evidencia que na legislação europeia, o efeito do processamento sobre os níveis de micotoxinas é considerado no estabelecimento dos limites máximos permitidos.

## 5 MATERIAS E MÉTODOS

### 5.1 Preparo das soluções-padrão

A solução estoque de ZEA foi preparada dissolvendo 5 mg de padrão ZEA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) em tolueno-acetonitrila (9:1, m/v) para obter a concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup>. As soluções de OTA e AFB1 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram preparadas através da dissolução de 1 mg de padrão em tolueno-acetonitrila (9:1, m/v) para atingir a concentração de 40 e 10 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. As soluções-padrão foram mantidas congeladas (-18°C), em recipientes escuros e selados até sua utilização.

### 5.2 Validação do método de determinação de micotoxinas

Os parâmetros analíticos utilizados para a validação do método foram: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Estes parâmetros foram avaliados de acordo com a diretriz da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1996). Os gráficos de calibração foram construídos por meio de regressão linear de mínimos quadrados com pelo menos seis níveis de concentração de padrões de ZEA, OTA, AFB1. A representação gráfica de cada micotoxina foi feita considerando a área relativa à cada padrão de micotoxina *versus* a concentração do respectivo composto. A equação da curva de calibração e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foram obtidos para cada composto padrão. O LOD e LOQ foram determinados com base no desvio padrão da intersecção da curva analítica (s) e na inclinação da curva (S). O LOD foi expresso como 3,3 (s/S)

e LOQ como 10 (s/S).

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária e estes parâmetros foram expressos através do coeficiente de variação (CV). Estes ensaios foram feitos para dois níveis de concentração, incluindo as concentrações mais baixas e as mais elevadas da curva de calibração. A repetibilidade foi avaliada através de seis ensaios independentes (extração das micotoxinas da amostra e aplicação dos extratos orgânicos na placa de CCD) realizados no mesmo dia, ao passo que a precisão intermediária foi determinada em dois dias diferentes.

### **5.3 Processo de adição de ZEA, OTA e AFB1 na farinha de trigo**

O lote da farinha de trigo utilizado nos experimentos foi obtido em um supermercado de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. A farinha foi previamente analisada para verificar os níveis de micotoxinas e revelou conter ZEA, OTA e AFB1 em níveis inferiores aos limites de detecção do método utilizado neste trabalho. Na farinha de trigo, efetuou-se a adição de uma quantidade de ZEA, OTA e AFB1 quatro vezes superior ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para cada micotoxina. Este procedimento foi adotado visto que a legislação brasileira estabelece limites equivalentes tanto para cereais (trigo), quanto para os produtos a base de cereais (farinha) e, como a farinha geralmente não é consumida na sua forma in natura e sim através de produtos de panificação, o objetivo foi averiguar se com esses níveis de micotoxinas o produto final estaria dentro dos limites para o consumo.

A farinha empregada para o preparo dos pães foi utilizada após 30 minutos



da realização da adição dos padrões de ZEA, OTA e AFB1 sendo esta adição quatro vezes maior do que a legislação brasileira estabelece para ZEA ( $800 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), OTA ( $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e AFB1 ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

#### **5.4 Elaboração do pão**

O pão foi elaborado com os seguintes ingredientes: 100 g de farinha de trigo e os seguintes ingredientes: 1 g de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*), 1,7 g de sacarose, 1,5 g de óleo vegetal, 0,7 g de sal e 50 mL de água. A massa foi mantida em uma estufa de fermentação à 30 °C por 50 minutos. Posteriormente, a massa foi moldada manualmente, dividida em pedaços de 70 g e novamente acondicionada em estufa de fermentação a 30 °C por mais 45 minutos.

#### **5.5 Efeito do processamento do pão sobre os níveis de ZEA, OTA e AFB1**

O efeito do processamento de pão sobre os níveis de ZEA, OTA e AFB1 foi avaliado através da análise da farinha, massa e pão assado. Além disso, foram avaliados diferentes combinações de temperatura e tempo de assamento (170 °C/50 min, 220°C/35 min e 270°C/20 min). As três combinações de temperatura e tempo foram empregadas de acordo com o que é comumente utilizado em padarias brasileiras.

#### **5.6 Determinação das micotoxinas**

A extração da ZEA, OTA e AFB1 foi feita através do método desenvolvido por Soares e Rodriguez-Amaya (1989). A amostra (25 g) foi homogeneizada

durante 5 minutos em um misturador juntamente com 135 mL de metanol e 15 mL de solução de cloreto de potássio (4%). A mistura homogeneizada foi filtrada (em filtro de papel) e o filtrado (75 mL) foi transferido para um béquer, no qual foi adicionado 75 mL de solução aquosa de sulfato de amônio (30%) e 12 g de terra diatomácea. Após nova filtração, 75 mL do filtrado foi transferido para um funil de separação que continha 75 mL de água destilada e 25 mL de hexano. O hexano foi empregado para remover compostos lipídicos que poderiam interferir na determinação das micotoxinas. Esta etapa não foi necessária na análise da farinha. As micotoxinas foram extraídas através de duas partições com 5 mL de clorofórmio cada. O extrato orgânico obtido nestas duas partições (10 mL) foi evaporado e dissolvido em 100 µL de tolueno-acetonitrila (9:1, v/v). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Na placa de cromatografia em camada delgada (CCD) foi aplicado 10 µL de extrato orgânico da amostra e das soluções padrão de ZEA, AFB1 e OTA havendo uma distância de 1 cm entre cada um dos pontos aplicados na placa. As placas foram colocadas em uma cuba contendo tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (6:4:0,5; v/v/v). Posteriormente, a placa foi seca em estufa a 110°C e as manchas fluorescentes foram observadas sob luz ultravioleta (UV). As imagens das placas foram obtidas através do dispositivo de carga acoplada (DCA) que é um detector capaz de captar a imagem de uma área em frações de segundo. Desta maneira, através da combinação do CCD e DCA e do uso do software ImageJ (disponível gratuitamente em: <http://rsbweb.nih.gov/ij>) é possível realizar a quantificação das micotoxinas.

## 5.7 Análise estatística

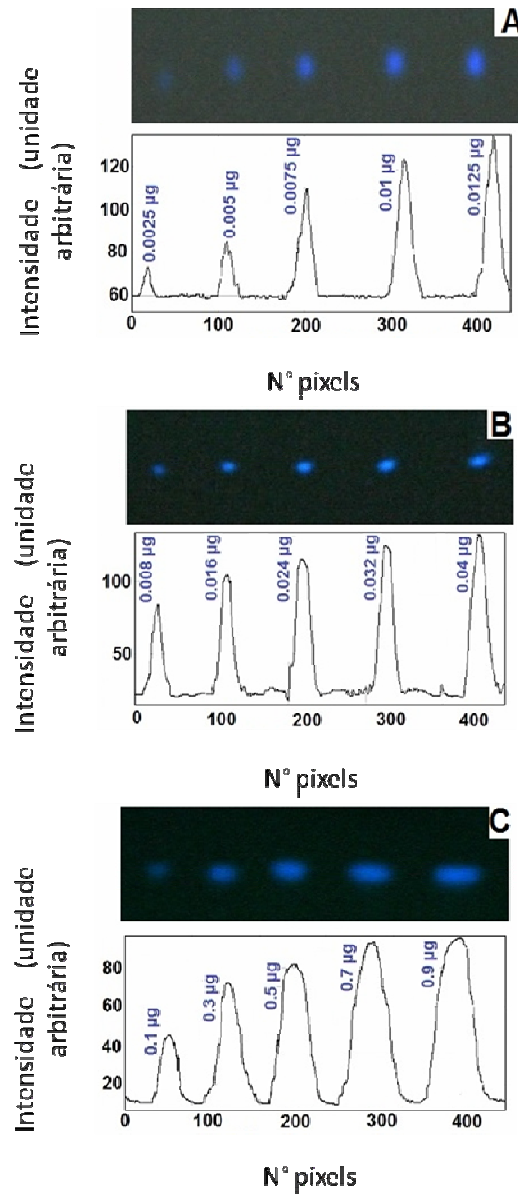
Todas as determinações foram realizadas em triplicata e foram calculados os valores médios e desvios-padrão. Foram realizadas as análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) utilizando o programa Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Validação do Método

O método utilizado para a determinação simultânea de ZEA, OTA e AFB1 mostrou-se eficiente. A imagem da placa de CCD expostas à luz UV foi obtida através do DCA e uma representação gráfica foi construída no programa ImageJ para comprovar a separação das três micotoxinas (Figura 4). As imagens das micotoxinas são apresentadas separadamente para melhor visualização. Cada ponto fluorescente da placa de CCD corresponde a uma concentração de micotoxina e está relacionado a um pico na representação gráfica da Figura 4. Verifica-se que o DCA foi suficientemente sensível para detectar as alterações na intensidade da fluorescência provocadas por pequenas diferenças na concentração das micotoxinas (Figura 4). Este método baseado na combinação de CCD-DCA foi utilizado anteriormente para determinar outras micotoxinas incluindo: patulina em suco de maçã e maçã *in natura* (WELKE et al., 2009b), ocratoxina em vinho (WELKE et al., 2010) e aflatoxinas em amendoim (HOELTZ et al., 2010). Entretanto, foi a primeira vez que a CCD-DCA foi aplicada para determinar simultaneamente mais de uma micotoxina.

Dados quantitativos foram obtidos a partir da medida da intensidade de fluorescência de cada micotoxina através do ImageJ. O desempenho do método em termos de linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ),



repetibilidade, precisão intermédia e recuperação são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

**Figura 4.** Imagem da placa de CCD adquiridas pelo DCA e a respectiva representação gráfica gerada pelo *software* Imagem J a partir dos pontos fluorescentes de micotoxinas nas seguintes concentrações: (A) 0,0025 µg, 0,005 µg, 0,0075 µg, 0,01 µg e 0,0125 µg de aflatoxina B1; (B) 0,008 µg, 0,016 µg, 0,024 µg, 0,032 µg e 0,04 µg de ocratoxina A; (C) 0,1 µg, 0,3 µg, 0,5 µg, 0,7 µg e 0,9 µg

de zearalenona.

**Tabela 2.** Intervalo de linearidade, equação de regressão, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método CCD-DCA utilizado para a determinação simultânea de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1).

Toxina	Intervalo de linearidade <sup>a</sup>	Equação de regressão <sup>b</sup>	$r^2$	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>
ZEA	10 – 500	$y = 10,361x + 0,646$	0,993	0,76	1,50
OTA	1,5 – 40	$y = 116,981x + 1,235$	0,995	0,12	0,25
AFB1	0,25 – 25	$y = 594,600x + 0,158$	0,996	0,04	0,16

<sup>a</sup>  $\mu\text{g kg}^{-1}$

<sup>b</sup>  $x$  = concentração de micotoxinas ( $\mu\text{g}$ ) e  $y$  = intensidade de fluorescência emitida pelo micotoxina quando exposta à luz UV.

A escolha dos valores de concentração utilizados nas curvas de calibração para cada micotoxina foi baseada em trabalhos anteriormente publicados (RAHMANI et al., 2010; SOLEIMANY et al., 2012.). As curvas de calibração das três micotoxinas apresentaram uma boa linearidade na faixa de concentrações estudadas. Os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) situaram-se na faixa de 0,993-0,996 para as micotoxinas avaliadas (Tabela 2). Os valores dos LOQ obtidos a partir da fluorescência emitida pela ZEA ( $1,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), OTA ( $0,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e AFB1 ( $0,16 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e detectada através do DCA foram semelhantes a outro trabalho em que a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLD) foi utilizada para a determinação simultânea destas micotoxinas em trigo em

que o LOQ foi de 2; 0,2 e 0,05  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de ZEA, OTA, AFB1, respectivamente (RAHMANI et al., 2010).

**Tabela 3.** Valores médios (n = 6) para recuperação (%), repetibilidade e precisão intermediária da aflatoxina B1 (AFB1), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) extraída da farinha de trigo e pão e determinadas por CCD-DCA.

Micotoxina	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Matriz	Recuperação (%)	Repetibilidade CV (%) <sup>a</sup>	Precisão intermediária CV (%) <sup>b</sup>
AFB1	0,25	Farinha	99,6	2,5	4,8
		Pão	97,6	5,6	6,3
	25	Farinha	98,6	3,2	3,4
		Pão	97,5	6,8	7,5
OTA	1.5	Farinha	99,0	3,9	4,2
		Pão	97,1	6,2	7,5
	40	Farinha	98,7	2,9	4,4
		Pão	96,5	6,5	8,3
ZEA	10	Farinha	98,3	3,7	4,0
		Pão	97,7	7,1	7,9
	500	Farinha	97,9	4,0	4,5
		Pão	97,6	5,6	6,5

<sup>a</sup> Coeficiente de variação (CV) de ensaios feitos no mesmo dia;

<sup>b</sup> CV de ensaios feitos em dois dias diferentes.

Os testes de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária foram feitos para ambas matrizes (farinha e pão) analisadas neste trabalho. O objetivo deste procedimento foi verificar possíveis interferências que a matriz poderia causar na quantificação de cada micotoxina. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

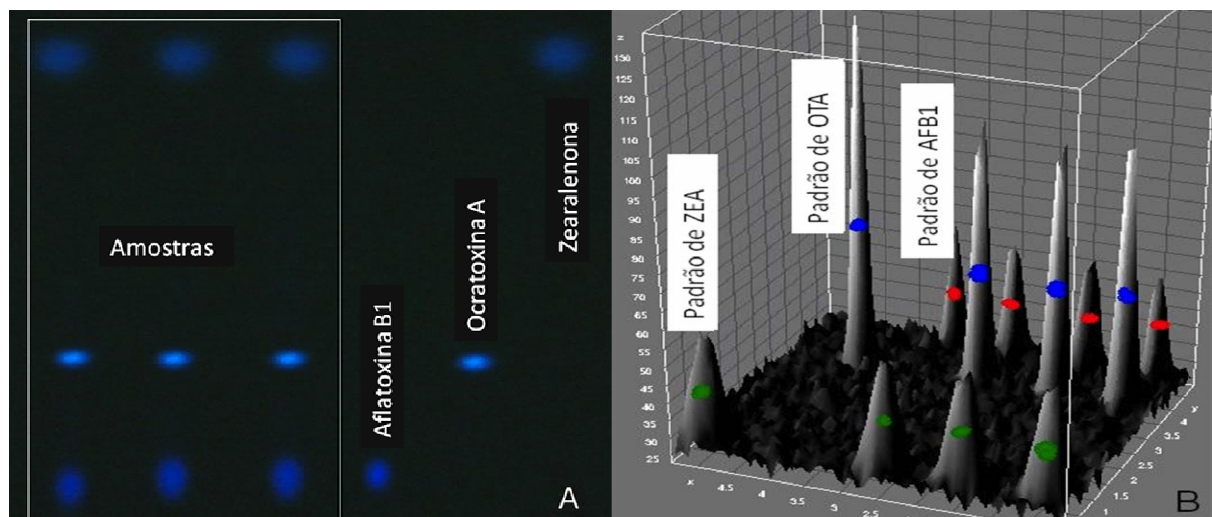
A repetibilidade (verificada através do coeficiente de variação) variou de

2,5% a 7,1% para a determinação de AFB1 em farinha e ZEA em pão, respectivamente. A precisão intermediária variou de 3,4% para a determinação de AFB1 a 8,3% para a determinação de ZEA (Tabela 3). Os níveis de recuperação foram maiores para a farinha do que para o pão (Tabela 3), comprovando que as diferentes características da matriz influencia nos níveis de recuperação dos produtos. Estes resultados eram esperados, visto que a farinha é uma matriz mais simples, pois possui menos compostos que podem interferir na análise cromatográfica, tais como os açúcares e gordura, além dos pigmentos, que são formados em produtos de panificação durante o assamento devido à reação de Maillard.

A porcentagem de recuperação variou de 96,5% a 99,6% para a determinação da OTA em pão e AFB1 em farinha, respectivamente. Estes resultados de recuperação e repetibilidade estão de acordo com os dados relatados por outros pesquisadores que também analisaram simultaneamente AFB1, OTA e ZEA através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS). Soleimany et al. (2012), por exemplo, ao analisar trigo por LC/MS encontraram níveis de recuperação de 106,4% e 88,2% e repetibilidade de 6,9% e 12,7%, para AFB1 e OTA respectivamente. Var et al. (2007) encontraram valores de 85,7% (de recuperação para AFB1 utilizando a CCD e quantificação por estimativa visual, percentual menor do que determinado neste trabalho. Resultados similares foram encontrados para ZEA por Hadiani et al. (2003) que encontraram valores de 92% (de recuperação para esta micotoxina utilizando o método CCD-densitometria. A recuperação média encontrada para OTA (97,8%) neste trabalho foi semelhante (98,4%) à encontrada por Santos e Vargas (2010), que determinou esta micotoxina por CCD-densitometria. Desta maneira, verifica-se que os

resultados dos testes de validação (Tabela 2 e 3) mostram que o método é apropriado para determinar estas micotoxinas em farinha e pão.

A capacidade do método para determinar simultaneamente ZEA, OTA e AFB1 pode ser observado na Figura 5. As três micotoxinas foram separadas em placas de CCD de acordo com a sua afinidade com o solvente de eluição (Figura 5A). A capacidade do método em separar as três micotoxinas foi confirmada pelo gráfico obtido quando as amostras foram projetadas no espaço tridimensional (Figura 5B).



**Figura 5.** Separação de aflatoxina B1 (AFB1), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) na placa de CCD contendo as seguintes quantidades: (A) 10  $\mu\text{L}$  de extrato de amostra de pão em triplicata (região destacada) e 5  $\mu\text{L}$  de cada solução padrão de micotoxinas (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AFB1, 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OTA e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ZEA). (B) Superfície tridimensional gerada a partir da placa de CCD contendo os picos de cada padrão de micotoxinas (ZEA, OTA e AFB1) e as micotoxinas detectadas na amostra avaliada em triplicata. Cada micotoxina pode ser vista em uma linha da Figura 5B e foi indicado com um ponto de cor: verde (ZEA), azul (OTA) e vermelho



(AFB1).

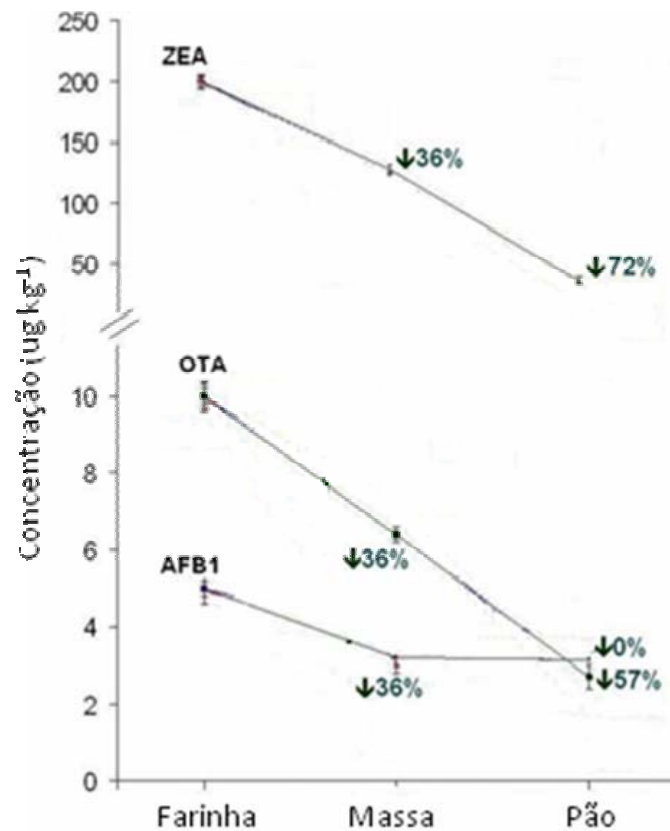
## **6.2 Efeito do processamento do pão nos níveis de ZEA, OTA e AFB1**

Para a discussão dos resultados do efeito do processamento nos níveis de micotoxinas foram utilizadas duas abordagens: (i) a redução dos níveis de micotoxinas em relação às etapas de elaboração do pão e (ii) a redução dos níveis de micotoxinas considerando diferentes combinações de temperatura/tempo para o assamento do pão.

Com a finalidade de avaliar o efeito das etapas de preparação do pão, as micotoxinas foram adicionadas na farinha. Analisou-se a massa (antes e após a fermentação) e o pão assado nas três diferentes temperaturas. Cabe salientar que a redução de 36% nos níveis destas toxinas, comparando-se a farinha com a massa (antes da fermentação), ocorreu devido ao efeito de diluição ocasionado pela adição dos demais ingredientes (levedura desidratada, sacarose, óleo vegetal, sal e água) utilizados para a elaboração da massa. Este fato ocorreu, pois a adição de cada uma das micotoxinas foi efetuada na farinha e, sabe-se que a farinha corresponde a 65% da quantidade total dos ingredientes utilizados para a produção do pão. Verificou-se que a fermentação não ocasionou a redução das micotoxinas.

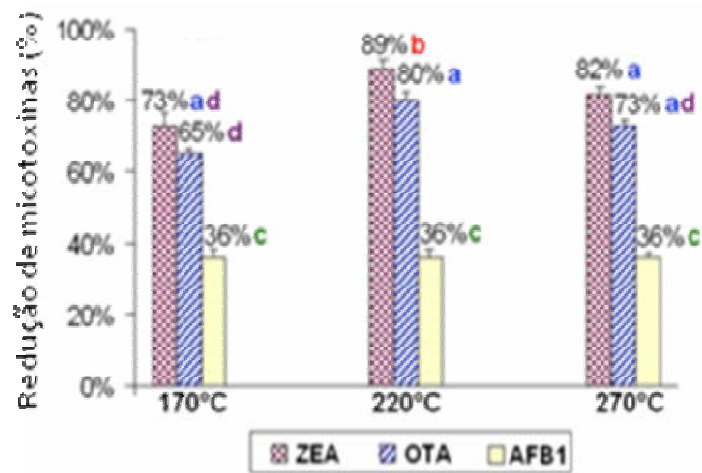
A redução devido ao assamento foi calculada como o percentual de diminuição da concentração das micotoxinas em relação à massa após a fermentação (Figura 6). Após o assamento, a ZEA foi a micotoxina que apresentou maior redução dentre as micotoxinas avaliadas, com taxa de redução de 89%. OTA apresentou uma taxa de redução de 80%. A AFB1 não mostrou redução após o assamento. A aflatoxina já foi classificada como uma das toxinas que

demonstraram maior resistência ao tratamento térmico (BULLERMAN et al., 2007).



**Figura 6.** Percentual de redução de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) durante a produção de pão (A porcentagem de redução das micotoxinas adicionadas no pão foi considerada na temperatura de assamento de 270° C durante 20 min).

Três diferentes combinações de tempo/temperatura (Figura 7) de assamento do pão foram empregadas com o intuito de verificar o efeito deste tratamento nos níveis de micotoxinas. Estes valores referem-se à taxa de redução em relação a todo o processo, considerando o nível inicial de micotoxinas na farinha de trigo em comparação com o nível final no pão assado.



**Figura 7.** Redução da zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) após o assamento do pão em três diferentes combinações de temperatura/tempo (170°C/50 min, 220°C/35min, 270°C/20 min). O pão foi elaborado com farinha contendo os seguintes níveis de micotoxinas: ZEA (800  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), OTA (40  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e AFB1 (20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Valores seguidos de mesma letra não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Alguns autores tem pesquisado o efeito do assamento sobre os níveis de OTA em pão (VIDAL et al., 2014; VALLE-ALGARRA et al., 2009; SCUDAMORE et al., 2003; SUBIRADE et al., 1996). Com o objetivo de avaliar a redução dos níveis de OTA em pão, Valle-Algarra et al. (2009), avaliou quatro combinações de tempo/temperatura (50min/190°C; 40min/207°C; 35min/223°C e 30min/240°C) para assamento do pão. Foi observado que a temperatura que maior obteve redução dos níveis de OTA foi a de 223°C (cerca de 45% considerando apenas o efeito do

assamento e não todo o processo). A taxa de redução de OTA encontrada neste trabalho foi maior, cerca de 59% considerando somente o efeito do assamento à 220°C.

Scudamore et al. (2003) encontram uma taxa de redução de 75% para a OTA em pão assado a 210°C por 21 min, percentual semelhante ao encontrado neste trabalho (80%). Assim como Osborne et al. (1996) e Boudra et al. (1995) também encontram percentuais de reduções semelhantes, 76% e 80% respectivamente. Entretanto, Vidal et al. (2014) observaram uma taxa de redução baixa (entre 20-50%) sobre os níveis de OTA em pão. Em relação à ZEA, Scudamore et al. (2003) encontraram redução de 89% (considerando o nível inicial de ZEA na farinha e a concentração final desta toxina) em pão assado a 220°C.

As diferenças encontradas nesses trabalhos nas taxas de redução em relação a ZEA (SCUDAMORE et al., 2009) e OTA em pão (VIDAL et al., 2014; VALLE-ALGARRA et al., 2009; SCUDAMORE et al., 2003) podem ser devido a diferenças na razão entre a quantidade de farinha e dos outros ingredientes utilizados nas formulações. Além disso, as diferenças no tamanho do produto e condições de temperatura e tempo de assamento também podem influenciar na estabilidade das micotoxinas.

## **7 CONCLUSÃO**

A avaliação dos efeitos do processamento do pão sobre os níveis de ZEA, OTA e AFB1 utilizando a técnica de CCD-DCA para a determinação simultânea destas micotoxinas juntamente com a análise quantitativa foi realizada pela primeira vez e demonstrou-se eficaz. Os percentuais de recuperação, por exemplo, ficaram acima de 95% para as três micotoxinas avaliadas tanto na farinha quanto no pão,

indicando a confiabilidade do método utilizado.

Reduções nos níveis das três micotoxinas foram observados ao comparar a farinha e a massa antes de fermentar, o que já era esperado em vista do efeito de diluição ocasionado pela adição dos ingredientes para o preparo do pão. A fermentação não apresentou efeito nos níveis de micotoxinas, o que foi observado ao analisar a massa antes e após a fermentação. Em relação ao assamento, reduções foram encontradas apenas ZEA e OTA, pois a AFB1 mostrou ser a micotoxina mais termorresistente.

Em relação as três temperaturas avaliadas no assamento dos pães, o tratamento térmico à 220°C apresentou a maior taxa de redução de ZEA e OTA. Desta maneira, o assamento do pão em temperaturas brandas por um tempo maior pode ser eficiente para a redução dos níveis de ZEA e OTA, pois a AFB1 não apresentou redução nas três temperaturas testadas no assamento do pão.

Apesar da legislação brasileira ter estabelecido limites máximos para estas micotoxinas em alimentos recentemente, a necessidade de revisão deste limites torna-se evidente em função dos efeitos do processamento mostrados neste trabalho. Com intuito de proteger a população da exposição à estes compostos tóxicos, seria conveniente que a concentração máxima de micotoxinas regulamentada para alimentos processados fosse menor do que aquela estabelecida para alimentos *in natura*.

## **8 BIBLIOGRAFIA**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO. Produção de pão

no Brasil. 2003. Disponível em : <<http://www.abip.org.br>>. Acesso em 12 de novembro de 2014.

ABRUNHOSA, L. J. *Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos*. 2008. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

ALKADRI, D.; RUBERT, J.; PRODI, A.; PISI, A. Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. *Food Chemistry*, Itália, v. 157, p. 111-118, 2014.

AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Alemanha, v. 29, p.79-90, 2006.

ALEXA E.; DEHELEAN C. A.; POIANA M. A.; RADULOV I.; CIMPEAN A. M.; BORDEAN D. M.; TULCAN C.; POP G. The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake. *Chemistry Central Journal*, Hungria, v. 99, p. 1–11, 2013.

ALMEIDA-FERREIRA G. C.; BARBOSA-TESSMANN I. P.; SEGA R.; MACHINSKI M. J. Occurrence of zearalenone in wheat- and corn-based products commercialized in the State of Paraná, Brazil. *Brazil Journal of Microbiology*, Paraná, v. 44, p. 371–375, 2013.

AMARAL, K. A; MACHINSKI JR, M. Métodos analíticos para a determinação de

aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. *Revista Analytica*, São Paulo, v. 5, p 56-58, 2006.

BEARDALL, J. M.; MILLER, J. D. Disease in humans with mycotoxins as possible causes. In J. D. Miller, & H. L. Trenholm (Eds.), *Mycotoxins in grains: Compounds other than aflatoxin*, EUA, p. 487-539, 1994.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology*, EUA, v.16, n. 3, p. 497–516, 2003.

BETINA, V. *Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification*. Amsterdam: Elsevier, EUA, v.38, n. 9, p. 193-243, 1984.

BIRCK N. M. M.; LORINI I; SCUSSEL V. M. Fungus and mycotoxins in wheat grain at post harvest. 9th International Working Conference on Stored Product Protection, Paraná, p. 198-205, 2006.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2011.

BRYDL, E.; VÁNYT, A.; GLÁVITS, R.; KÖNYVES, L.; RAFAI, P. Reduction of the oestrogenic effect of zearalenone in pigs by a feed additive. *Acta Veterinaria Brno*, Hungria, v. 83, p 33–38, 2014.

BOUDRA H.; LE BARS P.; LE BARS J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, França, v. 61, p. 1156-1158, 1995.

BULLERMAN L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, EUA, v. 119, p. 140–146, 2007.

SUPRIYA, C.; GIRISH, B. P.; REDDY, P. S. Aflatoxin B1-Induced Reproductive Toxicity in Male Rats: Possible Mechanism of Action. *International Journal of Toxicology*, Índia, v. 33, p. 155-161, 2014.

COSTA, T. P.; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Segurança alimentar e a cerveja: o perigo das micotoxinas. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 19, p. 39-44, 2005.

EFSA. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, Itália, v. 9, p.1-124, 2011.

EL-NEZAMI, H.; POLYCHRONAKI, N.; SALMINEN, S.; MYKKANEN, H. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -zearalenol. *Applied Environmental Microbiology*, Finlândia, v. 68, p. 3545-3549, 2002.



FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013). FAO Statistical Yearbook 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107.htm>> Acesso em: 20 de Agosto de 2014.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology*, EUA, v. 5, p. 72-125, 2014.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control*, Tunísia, v. 19: 921-924, 2008.

GARCIA, M. J. M.; BIAGGIONI, M. A. M.; FERREIRA, W. A.; KOHARA, E. Y.; ALMEIDA, A. M. Sucessão de espécies de fungos em milho armazenado em sistema aerado. *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, v. 27, p. 14-22, 2003.

GOLDBLATT, L. A. Aflatoxin. Academic Press, EUA, 1969.

HADIANI, M. R.; YAZDANPANA, H.; GHAZI-KHANSARI, M.; CHERAGHALI, A. M.; GOODARZI, M. Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from northern Iran by thin-layer chromatography densitometry. *Food Additives and Contaminantes*, Irã, v. 20, p. 380–385, 2003.

HOELTZ, M.; WELKE, J. E.; NOLL, I. B.; DOTTORI, H. A. Photometric procedure for quantitative analysis of Aflatoxin B1 in peanuts by thin-layer chromatography using

charge coupled device detector. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, p. 43-47, 2010.

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

IARC. International Agency for Research on Cancer. (1993, 2012) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Disponível em <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>> . Acesso em 21 de Novembro de 2014.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996.

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; JINAP, S.; RASHID, U. Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. *Food Control*, Malasia, v. 35, p. 223–226, 2014.

JIMENEZ, M.; MATEO, R. Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolates from banana fruits by Capilar gás chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, EUA, v. 778, p. 363–372, 1997.

JECFA. 2001. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 56th Meeting, Genebra, 6-15 February 2001.

JUAN, C.; RITIENI, A.; MANES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, Espanha, v. 134, p. 2389-2397, 2012.

KACHUEI, R.; YADEGARI, M. H.; REZAIE, S.; ALLAMEH, A.; SAFAIE, N.; ZAINI, F.; KHANEZAD, Y. F. Investigation of stored wheat mycoflora, reporting the *Fusarium cf. langsethiae* in three provinces of Iran during 2007. *Annals of Microbiology*, Irã, v. 59, p. 383-390, 2009.

KIESSLING, K. H. Biochemical mechanism of action mycotoxins. *Pure & Applied Chemistry*, Inglaterra, v.58, p.327-338, 1996

KIRINCIC S.; SKRJANC B.; KOS, N.; KOZOLC, B. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia – Official control of foods. *Food Control*, Eslovênia, v. 50, p. 157-165, 2014.

KRUPPA, P. C. *Claviceps*. *Instituto Biológico*, São Paulo, v. 66, p.35-37, 2004.

GOODMAN, K. T.; SCOTT, P. M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedic and Environmental Science*, China, v. 2, p. 179-248, 1989.

LIAO, C.; LIN, H.; CHIUEH, L.; SHIH, D. Y. Simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in cereals by LC-MS/MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, China, v. 19, p. 259-268, 2011.

LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; SULYOK, M.; BÖRJESSON, T.; KRŠKA, R.; OLSEN, M.; FREDLUND, E. Deoxynivalenol and other selected Fusarium toxins in Swedish wheat — Occurrence and correlation to specific Fusarium species. *International Journal of Food Microbiology*, Suécia, v. 167, p. 284–291, 2013.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros – Uma revisão. *Revista da FZVA. Uruguaiana*, v.14, p. 235-257, 2007.

MALLMANN, C. A.; KOWALSKI, C. H.; ALMEIDA, C. A.; MÜRMAN, L.; SILVEIRA, V. G. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no Estado do Rio Grande do Sul. *Anais 2º Simpósio em Ciência de Alimentos*, Porto Alegre, 2003.

MARAGOS, C. M. Zearalenone occurrence and human exposure. *World Mycotoxin Journal*, EUA, v. 3, p. 369-383, 2010.

MIROCHA, C. J.; SCHAUERHAMER, B.; PATHRE, S. V. Isolation, detection, and quantitation of zearalenone in maize and barley. *Journal Association Off Analytical Chemists*, v. 57, p. 1104–1110, 1974.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, EUA, v.71, p.51-65, 2006.

MUTHOMI, J. W.; NDUNG’U, K. K.; GATHUMBI, J. K.; MUTITU, E. W.; WAGACHA, J. M. The occurrence of Fusarium species and mycotoxins in Kenyan wheat. *Crop Protection*, Quênia, v. 27, p. 1215-1219, 2008.

NORDIN, N. S. D. Detecção de aflatoxinas e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. Dissertação de mestrado, Porto alegre: UFRGS, 1995.

OSBORNE, B. G.; IBE, F. I.; BROWN, G. L.; PATAGINE, F.; SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J. N.; HETMANSKI, M. T. The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, EUA, v. 13, p. 141–153, 1996.

PANDE, N.; SAXENA, J.; PANDEY, H. Natural occurrence of mycotoxins in some cereals. *Mycoses*, EUA, v. 33, p. 126–128, 1990.

PITT, J. I., HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic & Professional, EUA, p. 529, 1997.

PLÉSTINA, R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, Suiça, v. 13, p. 49-50, 1996.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in cereals using HPLC-FLD. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure, Risk Assessment*, Malásia, v. 27, p. 1683–1693, 2010.

ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA,

D. Mycotoxins and their effects on human and animal Walt. *Food Control*, EUA, v. 36, p. 159-65, 2014.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brazil Journal of Microbiology*, São Paulo, v.33, p.1-11, 2002.

ROSA, C. A. R.; PALACIOS, V.; COMBINA, M.; FRAGA, M. E.; REKSON, A. O.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, Rio de Janeiro, v. 19, p. 408-414, 2002.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium spp* na avicultura comercial. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, p.185-190, 2000.

SANTOS, E. A.; VARGAS, E. A. Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure, Risk Assessment*, Belo Horizonte, v. 19, p. 447–458, 2010.

SARTORI, D.; FURLANETO, M. C. ; MARTINS, M. K. ; PAULA, M. R. F.; PIZZIRANIKLEINER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P . PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. *Research in Microbiology*, Paris, v. 157, p. 350-354, 2006.

SCHLATTER, C. H.; STUDER-ROHR, J.; RÁSONYI, T. H. Carcinogenicity and

kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, Suíça, v. 13, p. 43 e 44, 1996.

SCUDAMORE, K. A.; BANKS, J.; MACDONALD, S. J. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure, Risk Assessment*, EUA, v. 20, p. 1153–1163, 2003.

SCUDAMORE, K. A.; HAZEL, C. M.; PATEL, S.; SCRIVEN, F. Deoxynivalenol and other *Fusarium* mycotoxins in bread, cake, and biscuits produced from UK-grown wheat under commercial and pilot scale conditions. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure, Risk Assessment*, EUA, v. 26, p. 1191–1198, 2009.

SFORZA, S.; DALL'ASTA, C.; MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxindetermination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, Itália, v. 25, p. 54-76, 2006.

SKRBIC, B.; ZIVANCEV, J.; DURISIC-MLADENOVIC, N.; GODULA, M. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. *Food Control*, Sérvia, v. 25, p. 389–396, 2012.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-

layer chromatographic method. *Journal Association Off Analytical Chemists*, São Paulo, v. 72, p. 22–26, 1989.

SOARES, L. M. V. Ocorrência de micotoxinas em alimentos: situação em São Paulo. *Ciência de alimentos avanços e perspectivas*, São Paulo, v.2, p.94-95, 1997.

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

SUBIRADE, I. Fate of Ochratoxin A during breadmaking. *Food Additives and Contaminants*, França, v. 13, p. 25–26, 1996.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, A.A.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. A.; ALVES, M. C. Determinação de aflatoxina B1 em pimenta ( *Piper nigrum L.*) e orégano (*Origanum vulgare L.*) por cromatografia em camada delgada e densitometria. *Química Nova*, v.3, p. 514-517, 2008.

TATEO, F.; BONONI, M.; LUBIAN, E. Survey on Ochratoxin A in wines. Data concerning the market of table wines in brik; *Bulletin O.I.V.*; v. 73, p. 772-783, 2000.

TERKEN, B.; AYSE, B. E.; GOZDE, G.; SEVTAP, A.; GONUL, S. Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Turquia, v. 12: p. 193–197, 2005.



VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, E. M.; MEDINA, Á.; MATEO, F.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; JIMÉNEZ, M. Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure, Risk Assessment*, Espanha, v. 26, p. 896–906, 2009.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature*, Inglaterra, v. 205, p. 1113, 1965.

VAR, I.; KABAK, B.; GOK, F. Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC. *Food Control*, Turquia, v. 18, p. 59–62, 2007.

VEKIRU, Elisavet; HAMETNER, Christian; MITTERBAUER, Rudolf; RECHTHALER, Justyna; ADAM, Gerhard; SCHATZMAYR, Gerd; KRŠKA, Rudolf; SCHUHMACHER, Rainer. Cleavage of Zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a Novel Nonestrogenic Metabolite. *Applied and Environmental Microbiology*, Áustria, v. 76, p. 2353-2359, 2010.

VIDAL, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*, Espanha, v. 53, p. 133–138, 2013.

VIDAL, A.; MORALES, H.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Stability of DON and OTA during the breadmaking process and determination of process and performance criteria. *Food Control*, Espanha, v. 40, p. 234–42, 2014.

WARTH, B.; PARICH, A.; ATEHNKENG, J.; BANDYOPADHYAY, R.; SCHUHMACHER, R.; SULYOK, M. Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Áustria, v. 60, p. 9352-9363, 2012.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Determination of ochratoxin a in wine by high-performance thin-layer chromatography using charged coupled device. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Porto Alegre, v. 21, p. 441-446.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A.; NOLL, I. B. Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure, Risk Assessment*, Porto Alegre, v. 26, p. 754-758, 2009.

YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T.; AIURA, Y.; SANCHEZ, P. C.; DIZON, E. I.; ARIM, R. H. Fusarium mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Japão, v. 59, p. 1804–1807, 1995.

YAN-JUN, H.; BO, X.; WEI-JIANG, Z.; XING, D.; XIANG-SHUN, C.; NAM-HYUNG,

K.; QIANG, W.; YIN-XUE, X.; SHAO-CHEN, S. Oocyte Quality in Mice is Affected by a Mycotoxin-Contaminated Diet. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, China, v. 55, p. 354-362, 2014.