

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

EMILLI KELLER BOL

**ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO A ZEARALENONA, OCRATOXINA A E
AFLATOXINA B1 ATRAVÉS DO CONSUMO DE BOLO, BISCOITO E MASSA
CONSIDERANDO OS EFEITOS DO PROCESSAMENTO DESSES ALIMENTOS**

Porto Alegre

2016/2

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

EMILLI KELLER BOL

**ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO A ZEARALENONA, OCRATOXINA A E
AFLATOXINA B1 ATRAVÉS DO CONSUMO DE BOLO, BISCOITO E MASSA
CONSIDERANDO OS EFEITOS DO PROCESSAMENTO DESSES ALIMENTOS**

Trabalho de conclusão do curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Dra. Juliane Elisa Welke

Porto Alegre

2016/2

**ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO A ZEARALENONA, OCRATOXINA A E
AFLATOXINA B1 ATRAVÉS DO CONSUMO DE BOLO, BISCOITO E MASSA
CONSIDERANDO OS EFEITOS DO PROCESSAMENTO DESSES ALIMENTOS**

EMILLI KELLER BOL

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Juliane Elisa Welke (Orientadora)
ICTA – UFRGS

Dr. Flávio Fonseca Veras
ICTA - UFRGS

Profa. Dra. Patrícia Malheiros
ICTA – UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

Aos meus pais, Carlos e Rosane, por estarem sempre ao meu lado, pelo amor, paciência, confiança e incentivo para superar os obstáculos e por terem me proporcionado o necessário para chegar até aqui.

Ao meu irmão e família que sempre estiveram presentes.

Aos professores do ICTA, em especial a minha orientadora Juliane Welke, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e por oferecer apoio para a realização deste trabalho, sempre muito atenciosa.

Às amigas que fiz durante a faculdade, Camila e Luiza, pelo companheirismo e por tornarem esses anos mais leves.

Aos colegas de laboratório, pelo aprendizado e auxílio para realizar os projetos.

Às amigas pelos momentos de diversão e pela paciência, principalmente nesse último semestre.

À Jacqueline e a EMATER pela oportunidade de estagiar e pelo aprendizado que me proporcionaram.

A UFRGS e ao ICTA pela infraestrutura e conhecimento proporcionado.

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos. Zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) são as micotoxinas mais importantes encontradas em trigo e derivados. Elas se destacam por seus efeitos estrogênico, nefrotóxico e hepatotóxico, respectivamente. O objetivo deste estudo foi estimar a exposição a estes compostos tóxicos através do consumo de bolo, biscoitos e massas alimentícias considerando o efeito de processamento desses alimentos sobre os níveis de micotoxinas. O bolo apresentou a maior porcentagem de redução dos níveis de micotoxinas (95, 90 e 50% para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente), seguido do biscoito (90, 85 e 40% para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente) e massa (75, 65 e 10% para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente). O consumo desses produtos poderia representar 8,8% do valor máximo da ingestão tolerável diária de ZEA e 19,5% da dose tolerável semanal de OTA. A margem de exposição relacionada a AFB1 foi de 41,5, valor inferior ao parâmetro considerado seguro pelo Comitê de Especialistas da FAO/WHO em Aditivos Alimentares (JECFA). A exposição à ZEA e OTA através do consumo de bolos, biscoitos e massas não representa risco para a saúde do consumidor, porém, outros alimentos podem ser fonte de exposição à ZEA, tais como milho e seus derivados ou contribuir para a ingestão de OTA, incluindo café, produtos de outros cereais e vinho. No entanto, a exposição à AFB1 representa risco, o que é preocupante pois esta toxina é comprovadamente carcinogênica para humanos.

Palavras-chave: Micotoxinas, farinha de trigo, bolo, biscoito, massas e avaliação de risco.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química da aflatoxina B1 (AFB1).....13
- Figura 2** – Estrutura química da ocratoxina A (OTA).....15
- Figura 3** – Estrutura química da zearalenona (ZEA).....16
- Figura 4** - Redução da concentração de zearalenona (ZEA; A), ocratoxina A (OTA; B) e aflatoxina B1 (AFB1; C) após a elaboração de bolo, biscoito e massa com farinha de trigo contendo o limite máximo permitido pela legislação brasileira para estas micotoxinas (ZEA: 200 mg/kg, OTA: 10 mg/kg e AFB1: 5 mg/kg). O desvio padrão das medidas de concentração de micotoxinas é representado pelas barras de erro. A porcentagem de redução de micotoxinas observada para cada um dos produtos em relação à concentração de micotoxinas de farinha de trigo está indicada acima das barras. Valores de porcentagem de redução seguida pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.....29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Ocorrência de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) em trigo, farinha de trigo, bolo, biscoito e massas. 18
- Tabela 2** - Consumo médio per capita de massa, bolo e biscoito de acordo com sexo, região do Brasil e faixa etária da população brasileira relatado através da Análise de Consumo Alimentar Pessoal feita pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).
.....25
- Tabela 3** - Valores médios (n = 6) para a recuperação (%), repetibilidade e precisão intermédia do método utilizado para a determinação simultânea de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) em farinha, biscoito, bolo e massa.28
- Tabela 4** - Exposição diária estimada para zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) através do consumo de massa, bolo e biscoito considerando o consumo médio per capita e os níveis de micotoxinas encontradas após o processamento destes alimentos elaborados com farinha contendo os níveis máximos de micotoxinas estabelecidos pela legislação brasileira.32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 MICOTOXINAS – CARACTERÍSTICAS E EFEITOS TÓXICOS	12
3.1.1 Aflatoxina B1	13
3.1.2 Ocratoxina A	14
3.1.3 Zearalenona	15
3.2 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM TRIGO, FARINHA, BOLO, BISCOITO E MASSA	17
3.3 LEGISLAÇÃO	19
3.4 AVALIAÇÃO DO RISCO DA EXPOSIÇÃO ÀS MICOTOXINAS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 PRODUTOS QUÍMICOS, REAGENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO	21
4.2 FORTIFICAÇÃO DA FARINHA DE TRIGO COM AFB1, ZEA E OTA	21
4.3 ELABORAÇÃO DE BISCOITO, BOLO E MASSA	22
4.4 EFEITO DO PROCESSAMENTO DO BOLO, BISCOITO E MASSA SOBRE OS NÍVEIS DE ZEA, OTA E AFB1	22
4.5 DETERMINAÇÃO DAS MICOTOXINAS	23
4.6 ESTIMATIVA DE EXPOSIÇÃO À ZEA, OTA E AFB1 ATRAVÉS DO CONSUMO DE BOLO, BISCOITO E MASSA	24
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOFRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS EM BOLO, BISCOITO E MASSA	27
5.2 EFEITO DO PROCESSAMENTO DE BOLO, BISCOITO E MASSAS SOBRE OS NÍVEIS DE MICOTOXINAS	28
5.3 ESTIMATIVA DE EXPOSIÇÃO ÀS MICOTOXINAS ATRAVÉS DO CONSUMO DE BOLO, BISCOITO E MASSA	31
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO RISCO	33
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

O trigo é uma gramínea do gênero *Triticum*, cuja produção mundial, na safra 2015/2016, foi de aproximadamente 735 milhões de toneladas e o consumo mundial foi em torno de 710 milhões de toneladas (ABIMAPI, 2016; DEPEC, 2016). Atualmente, o Brasil produz mais de 6 milhões de toneladas de trigo e importa mais de 4 milhões para atender ao consumo do país (ABITRIGO, 2016; EMBRAPA, 2016). Cerca de 75% da produção de trigo nacional é utilizado para fabricação de farinha (ABIMAPI, 2016).

A farinha de trigo é destinada ao uso doméstico, fabricação industrial e artesanal de pães, bolos, massas, biscoitos e outros produtos. As farinhas comercializadas nacionalmente atuam em diversos setores, que são distribuídos da seguinte forma: 56% panificação, 15% macarrão, 10% biscoitos, 10% uso doméstico e 9% em outros segmentos (ABITRIGO, 2016).

No ano de 2015, o Brasil foi o 5º maior consumidor de biscoito do mundo, com consumo *per capita* de aproximadamente 6 kg/ano, enquanto que a Argentina, em 1º lugar, obteve um consumo em torno de 12 kg/ano. O biscoito do tipo água e sal, por exemplo, representou 14,7% dos biscoitos vendidos. Para massas alimentícias, o Brasil foi o 9º maior consumidor, com consumo de 4,35 kg/ano, em 1º lugar ficou a Itália com consumo em torno de 26 kg/ano. Para o consumo de bolos industrializados, o Brasil foi o 8º maior consumidor, com consumo de 0,74 kg/ano e os Estados Unidos, em 1º lugar, obtiveram um consumo em torno de 2 kg/ano (ABIMAPI, 2016).

Em diversas partes do mundo, estudos mostram a ocorrência de micotoxinas, através da contaminação por fungos em trigo (RIBA et al., 2010; EFSA, 2011; LIAO et al., 2011; KUMAR et al., 2012; SOLEIMANY et al., 2012; ALEXA et al., 2013; ALKADRI et al., 2014; STANCIU et al., 2016; TRALAMAZZA et al., 2016), farinha de trigo (SKRBIC et al., 2012; TAHERI et al., 2012; GHASEMI-KEBRIA et al., 2013; ARMORINI et al., 2015; STANCIU et al., 2016), farelo de trigo (VIDAL et al., 2013) e produto derivado de trigo (IQBAL et al., 2014). Sua ocorrência representa um risco importante para a saúde humana e animal e pode provocar perdas econômicas (SMITH et al., 2016).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, principalmente pelas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Essas toxinas têm sido detectadas em diversos produtos de origem vegetal, principalmente em grãos de cereais. A produção de micotoxinas depende de fatores ambientais pré e pós-colheita, tais como, clima, temperatura e umidade. Além disso, outros fatores como a disponibilidade de nutrientes e os danos mecânicos ou causados por pragas durante cultivo, transporte, colheita também influenciam no crescimento do fungo (SMITH et al., 2016).

As micotoxinas mais importantes encontradas no trigo e seus derivados são zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) (VIDAL et al., 2013). Diversos efeitos crônicos e agudos podem ocorrer em seres humanos e outros animais devido a exposição às micotoxinas, tais como, efeito hepatotóxico, genotóxico, imunossupressor, estrogênico, nefrotóxico, teratogênico e/ou efeitos cancerígenos (SMITH et al., 2016). Em virtude dos efeitos tóxicos, a legislação brasileira estabeleceu limites máximos para a presença de AFB1 (5 µg/kg) e OTA (10 µg/kg) em cereais e produtos à base de cereais e ZEA (100 µg/kg) em farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação (BRASIL, 2011).

A exposição humana às micotoxinas, através de alimentos consumidos pela população, é um problema de mundial. Considerando o trigo um alimento importante na dieta, consumido na forma de bolos, biscoitos e massas alimentícias, e a possível ocorrência de ZEA, OTA e AFB1 nestes produtos, faz-se importante a avaliação do risco da exposição à essas micotoxinas e também, a verificação dos efeitos dos processamentos desses alimentos nos níveis de ZEA, OTA e AFB1.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a exposição a ZEA, OTA e AFB1 através do consumo de bolo, biscoito e massa considerando o efeito do processamento desses alimentos elaborados com farinha de trigo contendo essas micotoxinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar um método cromatográfico para determinação simultânea dos níveis de ZEA, OTA e AFB1 presentes na farinha de trigo, bolo, biscoito e massa;
- Verificar o efeito da preparação do bolo, biscoito e massa nos níveis de ZEA, OTA e AFB1 presentes na farinha de trigo;
- Avaliar o risco de exposição às micotoxinas ZEA, OTA e AFB1 através do consumo de bolo, biscoito e massa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICOTOXINAS – CARACTERÍSTICAS E EFEITOS TÓXICOS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos, elas são capazes de causar doenças e morte em animais, plantas e microrganismos (BENNETT & KLICH, 2003; GONÇALEZ, 2013). Os metabólitos primários são fundamentais para o desenvolvimento dos fungos, e os secundários são produzidos durante o final da fase exponencial de crescimento e não são essenciais para a sobrevivência do fungo (STEFANELLO et al., 2012).

As micotoxinas mais relevantes em alimentos são as aflatoxinas, a ocratoxina A, a patulina, as fumonisinas, a zearalenona e o desoxinivalenol. Estas micotoxinas são produzidas principalmente por espécies fúngicas que pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SOARES et al., 2013), que podem contaminar os alimentos no campo, no armazenamento ou após a fabricação de um produto (GONÇALEZ, 2013). Aproximadamente 25% dos produtos agrícolas do mundo estão contaminados por micotoxinas (BENNETT & KLICH, 2003).

Para o desenvolvimento dos fungos e produção das micotoxinas são necessárias condições favoráveis de umidade, temperatura, pH e composição do substrato (PEREIRA et al., 2002; SMITH et al., 2016). O crescimento do fungo e a contaminação por micotoxinas depende da localização geográfica, das condições ambientais, da colheita e do armazenamento dos cereais (AL-TAHER et al., 2017).

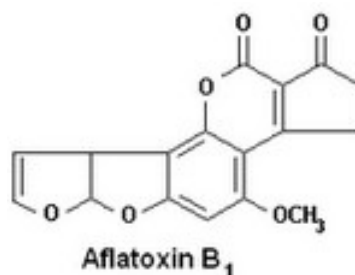
O processamento de alimentos, incluindo o tratamento térmico, pode reduzir os níveis de micotoxinas em produtos agrícolas, porém, pode não ser capaz de eliminá-las completamente (AL-TAHER et al., 2017). Apesar da dificuldade para eliminar as micotoxinas nos alimentos, o seu nível deve ser reduzido ao menor nível possível, para que não representem risco para a saúde (SOARES et al., 2013).

As micotoxinas podem estar relacionadas à efeitos estrogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunotóxicos e carcinogênicos. A exposição às micotoxinas pelos seres humanos ocorre principalmente através do consumo de cereais e produtos derivados de cereais (SMITH, et al., 2016; SALADINO et al., 2017). 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 devido à necessidade de mais estudos) (IARC, 1993).

3.1.1 Aflatoxina B1

As principais aflatoxinas são B1, B2, G1 e G2, sendo que a mais frequentemente detectada em alimentos e mais tóxica é a aflatoxina B1 (AFB1), que possui estrutura química representada na Figura 1. Esta toxina é considerada o composto natural com maior carcinogenicidade que se conhece até o momento. A AFB1 é encontrada em amendoim, milho, oleaginosas, cereais, especiarias e frutas. As espécies de fungos produtores de aflatoxinas pertencem na sua maioria ao gênero *Aspergillus* e as mais importantes são *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius* (SOARES et al., 2013).

Figura 1. Estrutura química da aflatoxina B1 (AFB1).



A umidade relativa do ar acima de 85% e uma temperatura ambiente acima de 27 °C favorecem o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas em alimentos, incluindo as aflatoxinas (MALLMANN et al., 2003). A atividade de água dos cereais, concentração de oxigênio no ambiente e secagem inadequada são

determinantes para produção de aflatoxinas em silos durante o armazenamento (GHASEMI-KEBRIA et al., 2013).

As aflatoxinas apresentam fluorescência quando expostas à luz ultravioleta. As letras B e G se referem à fluorescência azul e verde, respectivamente, quando estes compostos são observados sob a luz ultravioleta. Esta propriedade é conveniente para a identificação e quantificação destes compostos em alimentos (MIDIO & MARTINS, 2000; LANG, 2005).

As aflatoxinas são pouco solúveis em água (10-30 µg/mL) e solúveis em gorduras e solventes orgânicos polares tais como clorofórmio e metanol. São destruídas na presença de amônia, hipoclorito ou soluções fortemente alcalinas. Além disso, são instáveis a agentes oxidantes ou valores de pH extremos (<3 ou >10) (CANCIAMANI et al., 2007; TESSARI & CARDOSO, 2012).

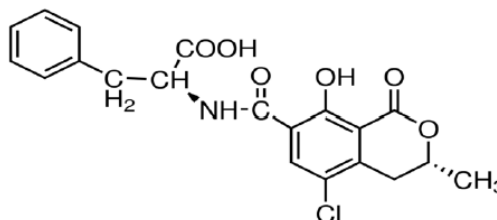
O fígado é o principal órgão afetado pela exposição às aflatoxinas (LANG, 2005). Além disso, estas micotoxinas podem causar distúrbios neurológicos, imunológicos e o aparecimento de câncer renal (FASSBINDER, 2010). As aflatoxinas têm sido relacionadas com a elevada incidência de câncer primário no fígado em Moçambique, Uganda, Tailândia, Quênia e Swazilândia (LANG, 2005). Exposições agudas às aflatoxinas estão sendo associadas com epidemias de hepatite em áreas da China e África com taxas de mortalidade entre 10 e 60% (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

3.1.2 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é a mais abundante e relevante ocratoxina. Os principais fungos produtores de OTA são das espécies *Aspergillus ochraceus*, que ocorre principalmente em lugares quentes e tropicais e *Penicillium verrucosum*, em climas temperados. Esses fungos crescem em uma grande variedade de produtos agrícolas. A OTA ocorre naturalmente em diversos produtos, entre eles: cereais, café, cerveja, vinho, cacau, frutas secas, queijo, suco de uva e condimentos (LINO et al., 2006;

FAPOHUNDA et al., 2014). Sua estrutura química apresenta uma molécula de cloro (Figura 2).

Figura 2. Estrutura química da ocratoxina A (OTA).



A OTA apresenta fluorescência azul quando exposta à luz ultravioleta e é solúvel em solventes orgânicos polares e ligeiramente solúvel em água (MIDIO & MARTINS, 2000; OGA et al., 2008).

Os efeitos tóxicos mais importantes associados ao consumo de alimentos contaminados com OTA incluem imunossupressão e danos nos rins e fígado. Em 1972, essa micotoxina foi associada à Nefropatia Endêmica dos Balcãs que ocorreu em famílias de agricultores da região da Bulgária, Romênia e antiga Iugoslávia, em meados de 1950. A doença é degenerativa e causa falência renal. Este episódio ocorreu porque a população foi exposta a altas doses da micotoxina através de alimentos produzidos na região dos Balcãs (DEVRIES et al., 2002).

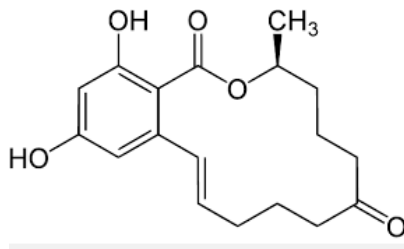
3.1.3 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é produzida por gênero *Fusarium*, especialmente por *F. graminearum* e *F. culmorum* que ocorrem em trigo, milho, sorgo, cevada, aveia e centeio. A presença desse fungo ocorre principalmente em regiões temperadas (SOARES et al., 2013). A ZEA possui propriedade fluorescente de cor azul-esverdeada, quando exposta a luz ultravioleta (BOEIRA, 2012).

A ZEA possui atividade estrogênica por apresentar uma estrutura (Figura 3) semelhante ao 7- β -estradiol, principal hormônio feminino produzido nos ovários

(BENNET & KLICH, 2003). ZEA e seus congêneres (α - e β - zearalenol), são capazes de se ligar a receptores de estrogênio na superfície celular. Após a exposição oral, a ZEA é metabolizada em vários tecidos, especialmente no fígado. O sistema reprodutivo é o principal alvo de toxicidade da ZEA, provocando alterações no trato reprodutivo de animais (MARIN et al., 2010).

Figura 3. Estrutura química da zearalenona (ZEA).



Os principais sintomas relacionados à exposição a esta micotoxina nos suínos incluem inchaço da vulva, desenvolvimento exacerbado do útero e glândulas mamárias, prolapsos da vagina e reto. Em gado os efeitos reprodutivos são menos pronunciados do que em suínos, mas essa toxina afeta a fertilidade desses animais e diminui a produção de leite (IAMANAKA et al., 2010). Em humanos, a ZEA tem sido relacionada a alguns casos de puberdade precoce em adolescentes, devido à sua atividade estrogênica (MARROQUIN-CARDONA et al, 2014).

3.2 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM TRIGO, FARINHA, BOLO, BISCOITO E MASSA.

Os cereais, incluindo o trigo, podem ser contaminados com micotoxinas (VIDAL et al., 2014). Entre as micotoxinas que ocorrem no trigo destaca-se a ZEA, OTA e AFB1 (Tabela 1). No Brasil, a ZEA foi detectada em 84 e 12% das amostras de grãos de trigo cultivados nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente (TRALAMAZZA et al., 2016). Na Síria e Itália, esta toxina foi encontrada em 25 e 30% das amostras de trigo avaliadas, respectivamente (ALKADRI et al., 2014). A ZEA também foi detectada em amostras de trigo e farinha de trigo em países europeus (EFSA, 2011), Romênia (ALEXA et al., 2013; STANCIU et al., 2016) e Sérvia (SKRBIC et al., 2012), assim como, OTA em Taiwan (LIAO et al., 2011), Romênia (ALEXA et al., 2013) e Índia (KUMAR et al., 2012), e AFB1 na Argélia (RIBA et al., 2010) e Irã (TAHERI et al., 2012; GHASEMI-KEBRIA et al., 2013).

A presença destas toxinas em produtos elaborados a partir da farinha de trigo tem sido pouco estudada. A ocorrência de ZEA e AFB1 em 30,9 e 35% das amostras de massas alimentícias foi relatada no Paquistão (IQBAL et al., 2014). Para bolos e biscoitos não foram encontrados estudos com ocorrência de ZEA, OTA e AFB1.

Tabela 1 - Ocorrência de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) em trigo, farinha de trigo, bolo, biscoito e massas.

Micotoxina	Alimento	Local	Amostras positivas/Total de amostras	Referência
ZEA	Trigo	Brasil	48/150	Tralamazza et al (2016)
	Trigo	Síria	10/40	Alkadri et al (2014)
		Itália	16/47	
	Trigo	Países europeus	432/3008	EFSA (2011)
	Trigo	Malásia	6/20	Soleimany et al (2012)
	Trigo	Romênia	38/52	Alexa et al (2013)
	Trigo e Farinha de trigo	Romênia	4/31 2/35	Stanciu et al (2016)
	Farinha de trigo	Sérvia	5/15	Skrbic et al (2012)
	Farelo de trigo	Espanha	10/67	Vidal et al (2013)
	Massas	Paquistão	34/110	Iqbal et al (2014)
OTA	Trigo	Romênia	33/52	Alexa et al (2013)
	Trigo	Taiwan	3/13	Liao et al (2011)
	Trigo	Malásia	7/20	Soleimany et al (2012)
	Trigo	Índia	29/50	Kumar et al (2012)
	Trigo	Síria	12/40	Alkadri et al (2014)
	Trigo	Itália	0/40	
	Farelo de trigo	Espanha	17/67	Vidal et al (2013)
AFB1	Farinha de trigo	Irã	-	Ghasemi-Kebrria et al (2013)
	Farinha de trigo	Irã	110/200	Taheri et al (2012)
	Farinha de trigo	Itália	0/40	Armorini et al (2015)
	Trigo	Argélia	30/53	Riba et al (2010)
	Trigo	Malásia	15/20	Soleimany et al (2012)
	Massas	Paquistão	35/110	Iqbal et al (2014)

3.3 LEGISLAÇÃO

Os níveis máximos de micotoxinas nos alimentos para consumo humano têm sido legislados em muitos países, variando de 1 a 20 mg/kg para AFB1, 0,2 a 50 mg/kg para OTA e 20 a 1000 mg/kg para ZEA, dependendo do tipo de alimento.

A legislação brasileira, através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 07 de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabeleceu limites para a presença de micotoxinas em diversos tipos de alimentos. Limites máximos foram estabelecidos, por exemplo, para OTA (10 µg/kg) e AFB1 (5 µg/kg) em cereais e produtos de cereais, e ZEA (200 µg/kg) para farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação (BRASIL, 2011).

A legislação europeia, estabeleceu limites máximos para micotoxinas através do Regulamento nº 1881 de 19 de Dezembro de 2006. A AFB1 tem limite máximo tolerável de 2 e 0,1 µg/kg para cereais e alimentos à base de cereais, respectivamente. A OTA tem um limite máximo de 3 e 0,5 µg/kg para cereais e alimentos à base de cereais, respectivamente. A ZEA tem um limite máximo de 75 e 20 µg/kg para cereais e alimentos à base de cereais, respectivamente (EUR-Lex, 2006).

Comparando a legislação brasileira e europeia, pode-se observar uma diferença em relação aos limites máximos permitidos de AFB1, OTA e ZEA. Para estas micotoxinas, estes valores são menores na legislação da Europa do que na brasileira. Também pode-se verificar que existe uma diferença entre limites máximos estabelecidos para cereais e para alimentos à base de cereais na legislação europeia, o que não é visto na legislação do Brasil. Isso pode indicar que o efeito do processamento sobre os níveis de micotoxinas não foi considerado na legislação brasileira.

3.4 AVALIAÇÃO DO RISCO DA EXPOSIÇÃO ÀS MICOTOXINAS

A avaliação do risco da exposição a compostos tóxicos é um processo de base científica e o gerenciamento do risco envolve tomada de decisões pelas agências reguladoras que levam em conta as principais informações técnicas relacionadas ao dano à saúde e ao risco, os fatores políticos e socioeconômicos. No Brasil, a avaliação do risco da exposição humana a contaminantes de alimentos é conduzida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Internacionalmente, a avaliação do risco é conduzida pelos comitês científicos da Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês: *World Health Organization*) e Organização para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius*. O Comitê de Especialistas da FAO/WHO em Aditivos Alimentares (JECFA, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) avalia questões relativas a aditivos alimentares, contaminantes e drogas veterinárias (JARDIM & CALDAS, 2009).

O “perigo” é a capacidade da micotoxina causar um efeito adverso. O “risco” é a probabilidade de um efeito adverso ocorrer devido à exposição da micotoxina. A avaliação do risco é um processo sistemático pelo qual o perigo, a exposição e o risco são identificados e quantificados (JARDIM & CALDAS, 2009).

A avaliação do risco da exposição humana a uma substância na dieta é fundamental para o desenvolvimento de padrões alimentares seguros (JARDIM & CALDAS, 2009). Uma avaliação de risco correta é essencial para evitar medidas desnecessárias, que incluem o recolhimento de produtos do mercado, medidas de restrição e para evitar preocupações, sem justificativa, pelo público em geral (GERAETS et al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUTOS QUÍMICOS, REAGENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO

As soluções-padrão de ZEA, OTA e AFB1 foram adquiridas da Sigma (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). Tolueno, clorofórmio, hexano, acetonitrila, acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e sulfato de amônio, com grau de pureza analítica (P.A.), foram adquiridos da Nuclear (São Paulo, Brasil). Metanol grau HPLC (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*), o acetato de amônia P.A. foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Os papéis filtro (Whatman nº 4) foram adquiridos da Whatman (Maidstone, Reino Unido). A água ultrapura foi obtida a partir de um aparelho Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA).

As soluções estoque de OTA e AFB1 foram preparadas dissolvendo 1 mg de padrão de cada micotoxina em tolueno-ácido acético (99:1, v/v) para atingir a concentração de 40 e 80 mg/mL, respectivamente. A solução de ZEA foi preparada dissolvendo 5 mg de padrão da toxina em metanol para obter a concentração de 100 mg/mL. As soluções-padrão foram mantidas congeladas (-18 °C) em recipientes escuros e vedados até sua utilização.

4.2 FORTIFICAÇÃO DA FARINHA DE TRIGO COM AFB1, ZEA E OTA

O lote de farinha de trigo utilizado nos experimentos foi obtido em um supermercado da cidade de Porto Alegre, Rio Grande de Sul, Brasil. A farinha foi previamente analisada para verificar os níveis de ZEA, OTA e AFB1. No lote analisado não foram encontradas estas micotoxinas (níveis abaixo dos limites de detecção do método mencionados no item 4.5). Na farinha de trigo foi adicionada a concentração de solução padrão que corresponde ao limite máximo de cada micotoxina estabelecido pela ANVISA: OTA (10 µg/kg), AFB1 (5 µg/kg) e ZEA (200 µg/kg) (Brasil,

2011). Estas micotoxinas foram adicionadas simultaneamente em 100 g de farinha de trigo e mudanças na textura de farinha não foram observadas após a adição das toxinas. Após 30 minutos (tempo esperado para a evaporação do solvente orgânico no qual as micotoxinas estavam solubilizadas) da adição dos padrões AFB₁, OTA e ZEA, a farinha fortificada foi usada para preparar os produtos.

4.3 ELABORAÇÃO DE BISCOITO, BOLO E MASSA

A preparação do bolo foi feita com 100 g de farinha de trigo, 4,2 g de bicarbonato em pó, 15 g de sacarose, 4,7 g de óleo vegetal e 25 mL de água. Os biscoitos foram preparados com 100 g de farinha de trigo, 1 g de sal, 4 g de bicarbonato em pó e 64 mL de água. Após todos os ingredientes serem misturados, a massa do biscoito foi dividida e moldada em porções de 8 g, para simular a influência do tratamento térmico em pequenos pedaços, como ocorre tanto na indústria quanto na elaboração caseira desse alimento.

A massa foi preparada com 100 g de farinha de trigo, 0,9 g de sal, 2 mL de óleo e 14 mL de água. Após a mistura dos ingredientes, um rolo foi usado para deixar a massa com uma espessura de aproximadamente 3 cm. A massa foi cortada manualmente em formato *fettuccine*.

4.4 EFEITO DO PROCESSAMENTO DO BOLO, BISCOITO E MASSA SOBRE OS NÍVEIS DE ZEA, OTA E AFB₁

O efeito do processamento do bolo, biscoito e massa foi avaliado através da análise de amostras de farinha e dos produtos após tratamento térmico em relação aos níveis de ZEA, OTA e AFB₁. As condições de tempo e temperatura foram previamente definidas de modo a se obter um produto com grau de assamento (bolo e biscoito) ou cozimento (massa) adequados. O bolo e o biscoito foram assados a 220 °C por 20 minutos. A massa foi cozida por 15 min em 800 mL de água fervente.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS MICOTOXINAS

A extração de ZEA, OTA e AFB1 foi feita seguindo o método desenvolvido por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), com pequenas modificações. A amostra (25 g) foi homogeneizada durante 5 minutos em um liquidificador juntamente com 135 mL de metanol e 15 mL de solução aquosa de cloreto de potássio (4%). A mistura foi filtrada em filtro de papel e 75 mL do filtrado 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 uma segunda 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 utilizado para remover os compostos lipídicos que podem 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 análises foram feitas em triplicata.

As análises quantitativas de micotoxinas na farinha e nos produtos após o processamento térmico (bolo, biscoitos e massa) e na água usada para cozinhar a massa foram feitas através da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). A confirmação das micotoxinas foi realizada por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa em sequência (LC-MS/MS, micrOTOF-Q III, Agilent, EUA). A Coluna C18 (XBridge TM Shield RP 18; 5 µm; 4.6 mm x 150 mm, Waters, Irlanda) foi utilizada tanto no HPLC-DAD quanto no LC-MS/MS.

As condições utilizadas na análise por HPLC-DAD foram: fase móvel composta de acetonitrila: água (50:50, v/v) com pH ajustado para 3 com ácido acético (1:1, v/v), fluxo constante de 0,7 mL/min; 20 µL de volume de injeção; comprimento de onda de 254 nm e tempo de análise de 10 min. Nas análises por LC-MS/MS, as seguintes condições foram usadas: fase móvel composta por metanol: 5 mM de acetato de amônio em água e 0,5% de ácido acético (90:10, v/v); fluxo de 0,2 mL/min; 10 µL de volume de injeção e 5 min de análise. No espectrômetro de massas (MS), a voltagem capilar foi de 3,5 kV, a temperatura da fonte foi de 120 °C, e a temperatura de

dessolvatação foi de 400 °C. A ionização por *electrospray* (ESI) foi utilizada para a determinação da OTA e AFB1 no modo positivo e ZEA no modo negativo. O MS foi operado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os íons precursores (P) e produtos (Q) de cada micotoxina foram: ZEA (P: 317; Q: 131 e 175), OTA (P: 404; Q: 239 e 358) e AFB1 (P: 313; Q: 241 e 285).

A validação do método usado para a quantificação das micotoxinas foi realizada para as quatro matrizes alimentares (farinha de trigo, bolo, biscoitos e massas) em dois diferentes níveis de cada micotoxina que incluiu a menor e a maior concentração das curvas de calibração (0,16 e 25 µg/kg para AFB1, 0,25 e 40 µg/kg para OTA, 1,50 e 500 µg/kg para ZEA). Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados: linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). Estes procedimentos foram realizados de acordo com a Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1996).

Os níveis de micotoxinas foram expressos em matéria seca, para facilitar a comparação dos resultados das diferentes amostras avaliadas neste estudo. Nesta proposta, o teor de umidade foi determinado através da secagem das amostras em estufa durante 2 horas a 131 ± 3 °C (ISO, 2009).

4.6 ESTIMATIVA DE EXPOSIÇÃO À ZEA, OTA E AFB1 ATRAVÉS DO CONSUMO DE BOLO, BISCOITO E MASSA

A simulação da exposição teórica estimada à ZEA, OTA e AFB1 através do consumo de massas, bolo e biscoito foi calculada de acordo com a equação (1). Para este cálculo foram utilizados, a concentração da micotoxina no alimento (ng/g), a quantidade de alimento consumido (g) por dia e o peso corpóreo (kg), assumindo 60 kg conforme recomendado pelo Codex Alimentarius (2014). A exposição às micotoxinas é dada por ng/kg de peso corpóreo por dia.

$$\text{Exposição} = \frac{\text{Concentração da micotoxina} \times \text{Consumo do alimento (1)}}{\text{Peso corpóreo}}$$

As concentrações de ZEA, OTA e AFB1 foram obtidas considerando-se que os produtos (massa, bolo e biscoito) foram produzidos com farinha de trigo contendo o limite máximo permitido pela legislação brasileira para cada micotoxina. Os efeitos do processamento sobre os níveis de micotoxinas foram considerados para cada produto conforme descrito no item 4.4.

Os dados sobre o consumo dos alimentos foram obtidos a partir da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011). A POF foi feita com 34.003 pessoas com idade igual ou superior a 10 anos. Cada pessoa informou os alimentos consumidos durante dois dias não consecutivos. No total, os participantes mencionaram 1.121 itens alimentares, incluindo massas, bolo e biscoitos (IBGE, 2011). Os dados de consumo alimentar (Tabela 2) foram dispostos em subgrupos de acordo com o sexo (masculino e feminino), a idade (adolescentes, adultos e idosos) e a região do Brasil (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste).

Tabela 2 - Consumo médio per capita de massa, bolo e biscoito de acordo com sexo, região do Brasil e faixa etária da população brasileira relatado através da Análise de Consumo Alimentar Pessoal feita pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Produto	Consumo médio de alimento per capita (g/dia)										
	Média de consumo	Sexo ^a		Região do Brasil ^b					Idade ^c		
		M	F	N	NE	SE	S	CO	Adolescentes	Adultos	Idosos
Massa	46,7	50,7	42,8	41,4	40,1	45,3	69,3	38,5	49,5	48,8	31,1
Bolo	13,9	13,7	14,1	11,2	10,5	14,6	17,3	18,6	13,8	14,0	13,6
Biscoito	6,8	6,7	6,9	7,4	8,8	6,8	3,9	4,4	9,1	6,2	6,6

^a Sexo - M: Masculino; F: Feminino

^b Região do Brasil - N: Norte; NE: Nordeste; SE: Sudeste; S: Sul; CO: Centro-Oeste.

^c Faixa etária: Adolescentes: 10 a 18 anos; Adultos: 19 a 59 anos; Idosos: + 60 anos.

A ZEA e a OTA são consideradas substâncias carcinogênicas não genotóxicas, logo, existe uma dose limiar abaixo da qual não se observam efeitos adversos à saúde (JECFA, 2007). A comparação da estimativa de exposição à ZEA e OTA através do consumo de bolo, biscoito e massa com o parâmetro de ingestão segura estabelecido pelo JECFA foi utilizada para avaliar os riscos potenciais para a saúde humana:

- (i) ZEA → Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória (do inglês: *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*, PMTDI) que corresponde à 0,5 µg/kg de peso corpóreo;
- (ii) OTA → Ingestão Semanal Tolerável Provisória (do inglês: *Provisional Tolerable Weekly Intake*, PTWI) para OTA, que corresponde à 0,112 µg/kg de peso corpóreo.

O risco pode existir se o consumo estimado ultrapassa os limites toleráveis estabelecidos pelo JECFA (2007).

Em relação à AFB1 não existe limite seguro de exposição, devido ao potencial genotóxico e carcinogênico dessa toxina (JECFA, 2007). A caracterização do risco da exposição a esta toxina foi feito através do cálculo da margem de exposição (do inglês: *Margin of Exposure*, MOE), que é calculada através da razão entre a dose que produziu um efeito específico (dose de referência, do inglês: *benchmark dose*, BMD) e da ingestão estimada de AFB1 através do consumo de alimentos. A BMD é uma referência a partir dos dados obtidos em experimentos com animais e modelagem matemática. Neste trabalho foi utilizada o limite inferior da dose em que se observou um aumento de 10% na incidência de um efeito tóxico em um grupo de animais (BMDL10 = 170 ng/kg de peso corporal por dia). O risco para humanos ocorre quando MOE é menor que 10.000 (EFSA, 2007).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas as análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa *Statística 7.1* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK) para verificar se há diferença entre os níveis de exposição às micotoxinas pelos diferentes grupos

avaliados de acordo com o sexo (masculino e feminino), a idade (adolescentes, adultos e idosos) e a região do Brasil (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOFRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS EM BOLO, BISCOITO E MASSA

A média de recuperação do método cromatográfico foi de 97,3% (ZEA), 98,1% (OTA) e 98,3% (AFB1) (Tabela 3). Estes valores de recuperação correspondem a média para cada micotoxina estudada nas quatro matrizes e duas concentrações de micotoxinas avaliadas no procedimento de validação. A repetibilidade e precisão intermediária variaram de 2,5 a 9,0% e 3,4 a 9,8%, respectivamente, para todas as micotoxinas. LOD foi 0,76, 0,12 e 0,04 µg/kg para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente, e LOQ foi de 1,50, 0,25 e 0,16 µg/kg para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente. Estes resultados qualificam o método de quantificação utilizado para determinar estas micotoxinas.

Tabela 3 - Valores médios (n = 6) para a recuperação (%), repetibilidade e precisão intermédia do método utilizado para a determinação simultânea de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) em farinha, biscoito, bolo e massa.

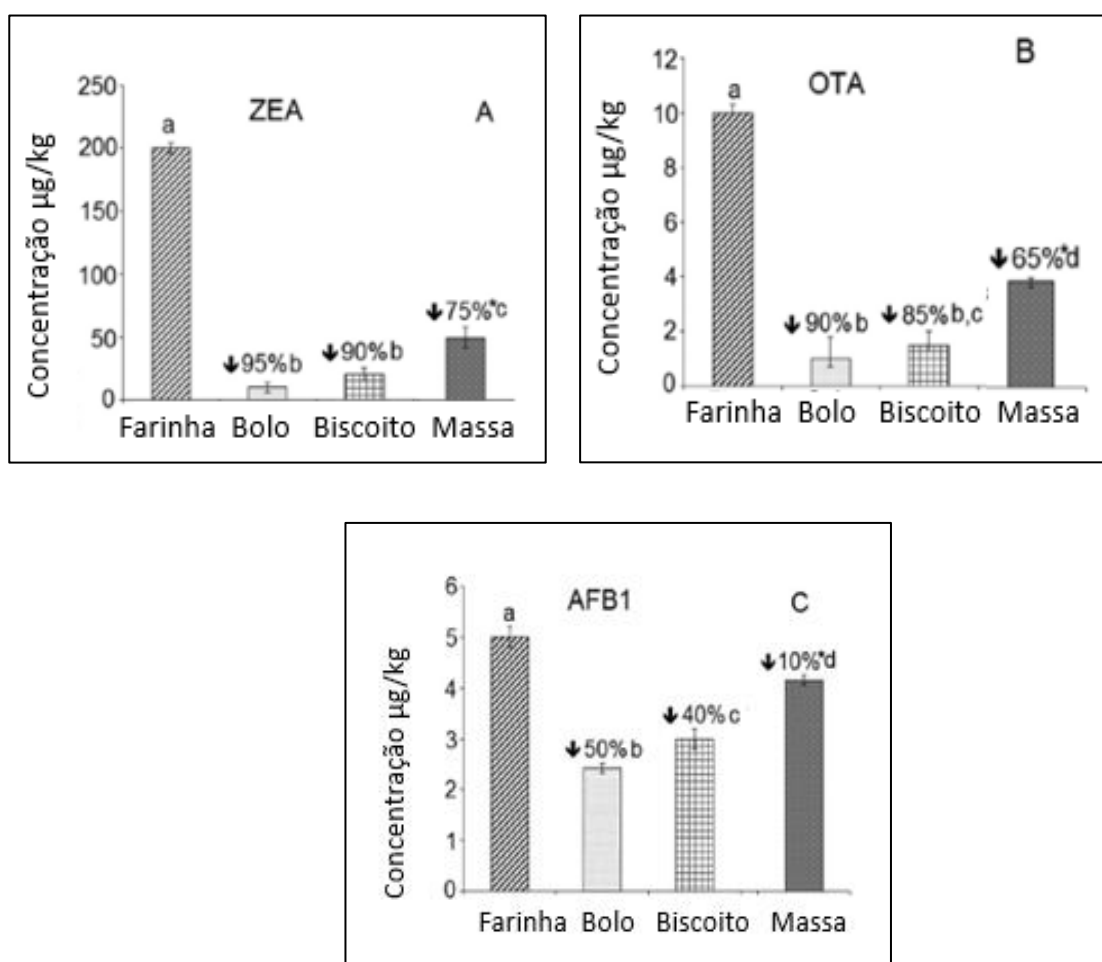
Micotoxina	Concentração (µg/kg)	Alimento	Recuperação (%)	Repetibilidade CV (%) ^a	Precisão Intermediária CV (%) ^b
ZEA	1,50	Farinha	98,3	3,7	4,0
		Biscoito	97,3	6,8	7,3
		Bolo	97,0	9,0	9,8
		Massa	96,5	8,8	9,7
	500	Farinha	97,9	4,0	4,5
		Biscoito	96,0	8,9	9,4
		Bolo	97,5	7,5	8,9
		Massa	98,0	5,5	6,3
OTA	0,25	Farinha	99,0	3,9	4,2
		Biscoito	97,8	8,0	8,5
		Bolo	98,0	4,9	7,8
		Massa	96,4	7,0	8,8
	40	Farinha	98,7	2,9	4,4
		Biscoito	97,4	6,7	7,6
		Bolo	97,8	4,5	8,8
		Massa	98,9	5,7	7,8
AFB1	0,16	Farinha	99,6	2,5	4,8
		Biscoito	97,3	6,7	7,1
		Bolo	98,1	5,9	6,9
		Massa	97,4	7,7	8,2
	25	Farinha	98,6	3,2	3,4
		Biscoito	97,9	7,1	7,6
		Bolo	98,6	8,4	8,9
		Massa	99,6	4,5	7,7

^a Coeficiente de variação do ensaio realizado no mesmo dia; ^b Coeficiente de variação do ensaio realizado em dois dias diferentes.

5.2 EFEITO DO PROCESSAMENTO DE BOLO, BISCOITO E MASSAS SOBRE OS NÍVEIS DE MICOTOXINAS

Os níveis de ZEA, OTA e AFB1 após o processamento térmico são mostrados na Figura 1. Os níveis de micotoxinas foram expressos em matéria seca, considerando as umidades médias de 39,7, 23,3 e 41% para o bolo, biscoito e massa, respectivamente.

Figura 4 - Redução da concentração de zearalenona (ZEA; A), ocratoxina A (OTA; B) e aflatoxina B1 (AFB1; C) após a elaboração de bolo, biscoito e massa com farinha de trigo contendo o limite máximo permitido pela legislação brasileira para estas micotoxinas (ZEA: 200 mg/kg, OTA: 10 mg/kg e AFB1: 5 mg/kg). O desvio padrão das medidas de concentração de micotoxinas é representado pelas barras de erro. A porcentagem de redução de micotoxinas observada para cada um dos produtos em relação à concentração de micotoxinas de farinha de trigo está indicada acima das barras. Valores de porcentagem de redução seguida pela mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.



A maior porcentagem de redução dos níveis de micotoxinas foi observada na produção do bolo (95, 90 e 50% para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente). No biscoito, a redução nos níveis de micotoxinas foi de 90%, 85% e 40% pra ZEA, OTA e AFB1, respectivamente. Scudamore et al. (2009) avaliaram o efeito do processamento sobre os níveis de ZEA em biscoitos preparados com farinha adicionada de gordura e açúcar, sendo que as proporções de cada ingrediente não foram mencionadas. Os autores demonstraram que a redução de ZEA foi de 27,5%. As diferenças nas taxas de redução encontradas neste estudo comparando com o

resultado obtido por Scudamore et al. (2009) pode ser devido à discrepância de dimensão do produto (o tamanho dos biscoitos elaborados por Scudamore não foi mencionado), que influencia no tempo do tratamento térmico necessário para o assamento. Além disso, as diferenças de temperatura e tempo de cozimento utilizados neste trabalho (220 °C durante 20 minutos) e no do estudo citado (SCUDAMORE et al., 2009) (280 °C durante 3 minutos) também podem influenciar na estabilidade das micotoxinas.

No bolo, embora a quantidade de farinha (67%) utilizada na formulação seja maior do que no biscoito (59%), uma maior redução dos níveis de micotoxinas foi observada (Figura 1). A maior quantidade de óleo e menor quantidade de água usada na formulação do bolo, e a característica lipossolúvel das micotoxinas (MAGAN & OLSEN, 2004) pode explicar esse fato. A hipótese é de que as toxinas são facilmente solubilizadas na fracção de gordura do bolo, o que pode facilitar a degradação das micotoxinas pela ação de calor usado durante o cozimento.

Na elaboração da massa foi observada menor redução dos níveis de micotoxinas do que nos produtos de padaria. Reduções de 75, 65 e 10% foram verificadas após a preparação de massa para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente. Na água em que a massa foi fervida foram encontrados 10,3, 8,1 e 5,0% de ZEA, OTA e AFB1, respectivamente. A mesma porcentagem de redução de OTA foi relatada por Sakuma et al. (2013) que encontraram níveis 65,4% menores dessa toxina na massa após o cozimento.

A menor redução dos níveis de micotoxinas na massa em comparação com o bolo e biscoito pode ser atribuída à forma de calor usada durante a preparação dos alimentos, que incluiu o cozimento em água fervente para massas e o assamento no forno para o bolo e biscoito. Além disso, a temperatura mais baixa utilizada no cozimento da massa, em comparação com os outros produtos, pode ter contribuído para as diferenças observadas nos níveis de toxinas depois do tratamento térmico. A temperatura de cozimento das massas variou entre 85 a 98 °C (98 °C era a temperatura da água no momento da adição da massa e no final do cozimento da massa; 85 °C foi a temperatura da água após a massa ter entrado em contato com água de cozimento). O bolo e o biscoito foram assados a 220 °C.

A extensão da redução dos níveis de micotoxinas em produtos de padaria e massa depende da proporção de farinha em relação aos demais ingredientes (óleo, açúcar e água) utilizados na formulação e das condições de processamento térmico (temperatura e tempo), os quais estão relacionados com a estabilidade da micotoxina. A ZEA provou ser a micotoxina mais termossensível e a AFB1 foi a mais resistente ao calor empregado na elaboração dos produtos de panificação e massas. A maior redução nos níveis de ZEA e OTA quando comparada com a AFB1 (Figura 1) pode ser relacionada com a sensibilidade individual de cada micotoxina ao aquecimento (BULLERMAN & BIANCHINI, 2007).

5.3 ESTIMATIVA DE EXPOSIÇÃO ÀS MICOTOXINAS ATRAVÉS DO CONSUMO DE BOLO, BISCOITO E MASSA

Os dados de consumo de bolo, biscoito e massas obtidos pela POF (IBGE, 2011) são mostrados na Tabela 2. O produto consumido em maior quantidade pela população brasileira é a massa (46,7 g/dia). O consumo deste produto é maior pelos homens (50,7 g/dia), adolescentes (49,5 g/dia) e para aquelas pessoas que vivem na região sul do Brasil (69,3 g/dia).

A simulação de exposição diária às micotoxinas nos diferentes grupos de acordo com sexo, idade e região do Brasil foi realizada para verificar quais grupos estão mais expostos ao risco à saúde e os resultados estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Exposição diária estimada para zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA) e aflatoxina B1 (AFB1) através do consumo de massa, bolo e biscoito considerando o consumo médio per capita e os níveis de micotoxinas encontradas após o processamento destes alimentos elaborados com farinha contendo os níveis máximos de micotoxinas estabelecidos pela legislação brasileira.

Micotoxina	Exposição (ng/kg de peso corporal por dia)											
	Alimento	Média ^a	Sexo ^b		Região do Brasil ^c					Idade ^d		
			M	F	N	NE	SE	S	CO	Adolescentes	Adultos	Idosos
ZEA	Massa	38,8a	42,3a	35,7a	34,5a	33,4a	37,8a	57,8b	32,1a	41,3a	40,7a	25,9a
	Bolo	2,3c	2,3c	2,4c	1,9c	1,8c	2,4c	2,9d	3,1d	2,3c	2,3c	2,3c
	Biscoito	2,3e	2,2e	2,3e	2,5e	2,9e	2,3e	1,3f	1,5f	3,0e	2,1e	2,2e
OTA	Massa	2,7g	3,0g	2,5g	2,4g	2,3g	2,6g	4,0h	2,2g	2,9g	2,8g	1,8i
	Bolo	0,2j	0,2j	0,2j	0,2j	0,2j	0,2j	0,3j	0,3j	0,2j	0,2j	0,2j
	Biscoito	0,2L	0,2L	0,2L	0,2L	0,2L	0,2L	0,1L	0,1L	0,2L	0,2L	0,2L
AFB1	Massa	3,5m	3,8m	3,2m	3,1m	3,0m	3,4m	5,2n	2,9m	3,7m	3,7m	2,3m
	Bolo	0,3o	0,3o	0,4o	0,3o	0,3o	0,4o	0,4o	0,5o	0,3o	0,4o	0,3o
	Biscoito	0,3p	0,3p	0,3p	0,4p	0,4p	0,3p	0,2p	0,2p	0,5p	0,3p	0,3p

^a Média de consumo masculino e feminino; ^b Sexo - M: Masculino; F: Feminino; ^c Região do Brasil - N: Norte; NE: Nordeste; SE: Sudeste; S: Sul; CO: Centro-Oeste; ^d Faixa etária: Adolescentes: 10 a 18 anos; Adultos: 19 a 59 anos; Idosos: + 60 anos. As letras foram usadas para mensurar os resultados do teste de Tukey. Nas linhas, a mesma letra indica que os valores não são significativamente diferentes em $P < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

A massa foi a mais importante fonte de micotoxinas na dieta em todos os grupos avaliados (Tabela 4). A maior exposição às micotoxinas através do consumo de massas ocorreu devido à menor redução nos níveis de micotoxinas durante a preparação da massa (75, 65 e 10% para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente) em comparação com os outros produtos e também por ser o produto consumido em maior quantidade pelos brasileiros. Outra informação interessante é que na região Sul do Brasil, a exposição à micotoxinas através do consumo de massas foi significativamente diferente dos outros grupos avaliados (sexo: feminino e masculino; região do Brasil: Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste; faixa etária: adolescentes, adultos e idosos). Na região Sul, a ingestão diária teórica estimada da ZEA, OTA e AFB1 foi 57,8; 4,0 e 5,2 ng/kg de peso corporal por dia, enquanto os valores médios de consumo pela população brasileira foram menores: 38,8; 2,7 e 3,5 ng/kg de peso corporal, respectivamente (Tabela 4). O elevado número de descendentes italianos

na região Sul do Brasil, que frequentemente consomem massas, poderia explicar o consumo considerável deste produto nessa região. Poucos estudos publicados na literatura estão focados na avaliação da exposição a estas toxinas através do consumo de produtos derivados do trigo, incluindo massas. Sakuma et al. (2013) avaliaram a exposição à OTA através do consumo de massas naturalmente contaminadas com esta toxina (níveis médios de OTA de 2,2 ng/g) e a exposição média (0,11 ng/kg de peso corporal por dia) foi menor do que no presente estudo em que a exposição da população brasileira foi de 2,7 ng/kg de peso corporal por dia.

A exposição média às micotoxinas através do consumo de bolo e biscoito foi menor do que a observada para massas. Em relação à exposição a ZEA através do consumo de bolo, as regiões Centro-Oeste e Sul apresentaram os maiores níveis de exposição (3,1 e 2,9 ng/kg de peso corporal por dia, respectivamente). Em relação ao consumo de biscoitos, a exposição foi maior para os adolescentes (3,0 ng/kg de peso corporal por dia) e para a população do Nordeste (2,9 ng/kg de peso corporal por dia). Para OTA e AFB1 em bolo e biscoito, não houve diferença significativa relacionada à média de exposição à essas micotoxinas através do consumo desses produtos para todos os grupos avaliados.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO RISCO

A exposição às micotoxinas através da soma do consumo de biscoito, bolo e massas representou 8,8% da PMTDI da ZEA e 19,5% da PTWI da OTA. Nestes casos, o consumo desses alimentos não caracteriza risco para a saúde do consumidor. No entanto, outros alimentos podem ser uma fonte de exposição à ZEA, tais como milho e seus derivados ou podem contribuir para a ingestão de OTA, incluindo café, produtos de outros cereais e vinho (WASEEM et al., 2014).

A exposição à ZEA e OTA através do consumo de massas representou a maior porcentagem da ingestão tolerável destas micotoxinas estabelecida pelo JECFA (7,8% da PMTDI para ZEA e 17% da PTWI para OTA). O biscoito e o bolo tiveram porcentagem semelhante de contribuição para a PMTDI da ZEA (0,5% tanto para

biscoito e bolo) e PTWI da OTA (de 1,1% e 1,4% para biscoito e bolo, respectivamente). Esta abordagem confirma que o consumo de biscoito e bolo, nas condições testadas, podem ser menos preocupantes em relação as micotoxinas avaliadas do que a massa.

A exposição total estimada teórica para AFB1 através do consumo de massas, bolo e biscoito foi de 4,1 ng/kg de peso corporal por dia. O valor MOE estimado foi de 41,5, logo, o valor da MOE representa risco pois é menor do que 10.000 (parâmetro recomendado pelo JECFA (JECFA 2007).

Outros estudos têm demonstrado que o amendoim é a maior fonte de exposição à AFB1 (SHEPHARD, 2008; DING, 2012 e ANDRADE, 2013). Na China, a exposição da população à AFB1 através do consumo de amendoim resultou em um valor de MOE de 1273 (DING et al., 2012). Um estudo semelhante realizado na África e relacionado com o consumo de amendoim apresentou um valor de MOE de 121,4 (SHEPHARD, 2008). No Brasil, a avaliação de risco da população relacionada com a exposição à soma de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2), em que o consumo de amendoim, produtos de amendoins, castanhas, produtos de milho e arroz foram considerados, a MOE foi de 25 (ANDRADE et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível observar um considerável efeito sobre os níveis de ZEA, OTA e AFB1 durante o processamento de bolo, biscoito e massa utilizando farinha de trigo contendo os limites máximos de cada micotoxina estabelecidos pela legislação brasileira. A maior porcentagem de redução de micotoxinas na produção de bolo (95, 90 e 50% para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente), comparada ao biscoito, que obteve redução nos níveis de micotoxinas de 90%, 85% e 40% pra ZEA, OTA e AFB1, respectivamente, e a massa, com reduções de 75, 65 e 10% para ZEA, OTA e AFB1, respectivamente.

Embora a porcentagem de farinha do bolo seja de 67%, a do biscoito 59% e a da massa 85,5%, o bolo foi o produto em que ocorreu maior redução nos níveis das toxinas. A maior quantidade de óleo e menor quantidade de água usada na formulação do bolo aliada à característica lipossolúvel das micotoxinas pode ser sugerida como um fator que contribuiu para a redução mais pronunciada dos níveis de micotoxinas no produto que apresentou maior proporção de gordura.

A massa foi o produto em que obteve menor redução nos níveis de micotoxina. Esse fato pode ter ocorrido, pois o cozimento desse alimento se faz em uma grande quantidade de água, e as micotoxinas são pouco solúveis em água. Além disso, outro fator importante a ser considerado é a temperatura e o tempo de processamento do alimento, sendo que o bolo e o biscoito foram assados à temperatura de 220 °C durante 20 minutos, e a massa foi cozida a temperatura em menor tempo e temperatura (85 e 98 °C por 15 minutos).

A ZEA provou ser a micotoxina mais termossensível e a AFB1 foi a mais resistente ao calor empregado na elaboração dos produtos. Além disso, a exposição à AFB1 é preocupante, pois pode representar risco para o consumidor, uma vez que, essa toxina é comprovadamente carcinogênica para humanos e possui estabilidade ao tratamento térmico aplicado nos alimentos. Ainda que, a exposição à ZEA e OTA não represente risco para a saúde do consumidor, deve-se considerar que a população consome diariamente outros alimentos que também podem conter estas micotoxinas, como milho, cevada, centeio, aveia, pão e frutas secas, entre outros.

REFERÊNCIAS

ABIMAPI. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados. São Paulo: ABIMAPI. 2016. Disponível em: <<http://www.abimapi.com.br>>. Acessado em: 12 de novembro de 2016.

ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria de Trigo. 2016. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/trigo.php>>. Acesso em: 10 de novembro de 2016.

ALEXA, E.; DEHELEAN, C. A.; POIANA, M. A.; RADULOV, I.; CIMPEAN, A. M. The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake. **Chemistry Central Journal**, Romênia, v. 7, n. 99, p. 1-11, junho 2013.

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

AL-TAHER, J. F.; CAPPOZZO, J.; ZWEIGENBAUM, J.; LEE, H. J.; JACKSON, L.; RYU, D. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Food Control**, v. 72, p. 27-35, fevereiro 2017.

ANDRADE, P. D.; DE MELLO, M. H.; FRANÇA, J. A.; CALDAS, E. D. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment. **Food Additives & Contaminants**, Brasília, v. 30, p. 127-136, 2013.

ARMORINI, S.; ALTAFINI, A.; ZAGHINI, A.; RONCADA, P. Occurrence os Aflatoxin B1 in convencional and organic flour in italy and the role of sampling. **Food Control**, Itália, v. 50, p. 858-863, 2015.

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

BOEIRA, S. P. Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos. 2012, p. 1-101. Dissertação de grau de Mestre em Bioquímica, UNIPAMPA, Itaqui, RS, Brasil, 2012.

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. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/af3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966>. Acesso em: 24 de Agosto de 2016.

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

CANCIAMANI, J. L.; PEREZ, G. L.; GARDA, J.; FURLONG, E. B. Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A presentes em farelo e farinha cereais. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, p. 157-164, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS. International Food Standards. Guidelines for the Simple Evaluation of Food Additive Intake. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/input/download/standards/6/cxg_003e.pdf>. Acesso em: 29 de outubro de 2016.

DEPEC. Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos -Trigo. BRADESCO: 2016. Disponível em: <https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_trigo.pdf>. Acesso em: 12 de Novembro de 2016.

DEVRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. Mycotoxins and Food Safety. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Nova York, v. 504, p. 295, 2002.

DING, X.; LI, P.; BAI, Y.; ZHOU, H. Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. **Food Control**, China, v. 23, p. 143-148, 2012.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food Chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. **EFSA Journal**, Itália, v. 446, p. 1-127, 2007.

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.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília: EMBRAPA. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/trigo/cultivos>>. Acesso em: 12 de Novembro de 2016.

EUR-Lex. Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento nº 1881 de 19 de Dezembro de 2006. Regulamento sobre limites máximos tolerados de alguns contaminantes presentes nos alimentos. Europa. 2006. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex:32006R1881>>. Acesso em 24 de Agosto de 2016.

FAPOHUNDA, S. O.; NEGEDU, A.; OKEKE, O. F. I.; FAPOHUNDA, T.; WAHAB M. K. A.; OKEKE, F. Ochratoxins - A review. **Basic Research Journal of Agricultural Science and Review**, Nigéria, v, 3, p. 105-115, Novembro 2014.

FASSBINDER, E. F. Estudo Bibliográfico sobre a incidência de aflatoxina em alimentos, e o poder carcinogênico da aflatoxina B1. 2010. P. 1-74, Monografia de Conclusão de Curso, Área Ciências da Saúde - UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ – UNOCHAPECÓ, Chapecó – SC, 2010.

GERAETS, L.; NIJKAMP, M. M.; BURG, W. Critical elements for human health risk assessment of less than lifetime exposures. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 362-371, 2016.

GHASEMI-KEBRIA, F.; JOSHAGHANI, H.; TAHERI, N. S.; SEMNANI, S.; AARABI, M.; SALAMAT, F.; ROSHANDEL, G. Aflatoxin contamination of wheat flour and the risk of esophageal cancer in a high risk area in Iran. **Cancer Epidemiology**, v. 37, p. 290-293, 2013.

GONÇALEZ, E.; SILVA, J. L.; REIS, T. A.; NAKAI, V. K.; FELICIO, J. D.; CORRÊA, B. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 312-317, 2013.

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

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p.138-161, 2010.

IARC. International Agency for Research on Cancer. (1993, 2012) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. França. 1993, 2012. Disponível em <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>>. Acesso em 24 de Agosto de 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009>. Acesso em 29 de outubro de 2016.

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

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

ISO. Organização Internacional para Padronização. 2009. Padrão N° 712, Determinação de umidade em cereais e produtos de cereais. Disponível em: <www.ivegetal.com.br/cvegetal/Legislação%20Correlata/ISO712-UMIDADE.doc>. Acesso em: 29 de outubro de 2016.

JARDIM, A.; CALDAS, E. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, Brasília, v. 32, n. 7, p. 1898–1909, 2009.

JECFA. Joint Expert Committee on Food Additives. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2007. Disponível em: <<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx>>. Acesso em: 29 de outubro de 2016.

KUMAR, R.; ANSARI, K. M.; SAXENA, N.; DWIVEDI, P. D.; JAIN, S. D.; DAS, M. Detection of ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. **Food Control**, Índia, v. 26, p. 63-67, 2012.

LANG, R. M. Ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St, Hil, var, *paraguariensis*) comercializada em Santa Catarina. 2005. p. 1-57, Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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.

LINO, C. M.; BAETA, L.; PENA, A. S.; SILVEIRA, I. N. Determinação de ocratoxina A em coentro (*Coriandrum sativum* L.) por detecção de HPLC / fluorescência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, 2006.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in Food - Detection and Control**, USA, Sawston: Woodhead Publishing Limited, p. 3–461, 2004.

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 Ciências de Alimentos**, Porto Alegre, 2003.

MARIN, D. E.; TARANU, I.; BURLACU, R.; TUDOR, D. S. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. **Toxicon**, v. 56, p. 956-963, novembro 2010.

MARROQUIN-CARDONA, A. G.; JOHNSON, N. M.; PHILLIPS, T. D.; HAYES, A. W. Mycotoxins in a changing global environment – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220-230, 2014.

MARTINS, F. A.; FERREIRA, F. M. D.; FERREIRA, F. D.; BANDO, E.; SA NERILLO, S. B.; HIROOKA, E. Y.; MACHINSKI JR. M. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. **Food Control**, Paraná, v. 26, p. 614-618, agosto 2012.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**, São Paulo, Varela Editora e Livraria LTDA, v. 1, 2000.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**, 3, ed, São Paulo, Atheneu Editora, 2008.

PEREIRA, M. L. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 1, p.141-156, 2002.

RIBA, A.; BOURAS, N.; MOKRANE, S.; MATHIEU, S.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. *Aspergillus Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derivated products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2772-2777, 2010.

SAKUMA, H.; WATANABE, Y.; FURUSAWA, H.; YOSHINARI, T.; AKASHI, H.; Kawakami, H.; Saito, S.; Sugita-Konishiet, Y. Estimated dietary exposure to mycotoxins after taking into account the cooking of staple foods in Japan. **Toxins**, Japão, v. 5, p. 1032-1042, 2013.

SALADINO, F.; QUILES, J. M.; MAÑES, J.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; LUCIANO, F. B.; MECA, G., Dietary exposure to mycotoxins through the consumption of

commercial bread loaf in Valencia, Spain. **LWT - Food Science and Technology**, Espanha, v. 75, p. 697–701, janeiro 2017.

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 & Contaminants**, EUA, v. 26, p. 1191-1198, 2009.

SHEPHARD, G. S. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. **Food Additives & Contaminants**, África, v. 25, p. 1246-1256, 2008.

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

SMITH, M. C.; MADEC, S.; COTON, E.; HYMERY, N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. **Toxins**, v.8, p.94, 2016.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas: impacto na segurança alimentar. **Portuguese Society for Microbiology Magazine**, Portugal, v. 2, p. 1-6, 2013.

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 of Official Analytical Chemists**, São Paulo, v. 72, p. 22-26, 1989.

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.

STANCIU, O.; JUAN, C.; MIERE, D.; LOGHIN, J. F.; MANES, J. Occurrence and co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat grains and wheat flour from Romania. **Food Control**, Disponível em: <<http://dx.doi.org.ez45.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.foodcont.2016.07.042>>. 2016.

STEFANELLO, J.; BACHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; HIRATA, L. M.; PONTIM, B. C. A. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.,42, n. 4, p. 476-481, 2012.

TAHERI, N.; SEMMANI, S.; ROSHANDEL, G.; NAMJOO, M.; KESHAVARZIAN, H.; CHOGAN, A. G.; KEBRIA, F. G.; JOSHAGHANI, H. Aflatoxin Contamination in Wheat Flour Samples from Golestan Province, Northeast of Iran. **Iranian Journal of Public Health**, Irã, v. 41, n. 9, p. 42-47, 2012.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. A. L. S. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 18, janeiro 2012.

TRALAMAZZA, S. M.; BEMVENUTI, R. H.; ZORZETE, P.; GARCIA, F. S.; CORRÊA, B. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil, **Food Chemistry**, Brasil, v. 196, p. 445–450, 2016.

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 bread making process and determination of process and performance criteria. **Food Control**, Espanha, v. 40, p. 234-242, 2014.

WASEEM, A.; SHAH, S. A.; SAJJAD, A.; SIDDIQI, A. R.; NAFEES, M. Human exposure to mycotoxins: a retrospective review of leading toxins and metabolites in human biological matrices. **Journal of The Chemical Society Of Pakistan**, Paquistão, v. 36, p. 1196-1214, 2014.