



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**Metodologia, ocorrência e efeitos de processamento de tricotecenos do
grupo A e B em biscoitos tipo *Cracker***

Taiana Denardi de Souza
Engenheira de Alimentos

Prof^ª. Dra. Eliana Badiale Furlong
ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2014

Taiana Denardi de Souza

Metodologia, ocorrência e efeitos de processamento de tricotecenos do grupo A e B em biscoitos tipo *Cracker*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Rio Grande, RS

2014

AGRADECIMENTOS

À **Profª Eliana** pela oportunidade, pela confiança e apoio durante todos esses anos. Obrigada pela sua amizade e compreensão em todos os momentos, sempre me orientando para os melhores caminhos a serem seguidos. Excelente profissional, demonstra sempre muita dedicação e carinho pelo o que faz!

Ao meu noivo **Alex**, meu companheiro, amigo e grande incentivador! Obrigada por fazer parte da minha vida e tornar os meus dias tão felizes!! Obrigado por compreender as minhas ausências e estar sempre ao meu lado...Te amo!!

À minha mãe **Elaine**, aparentemente tão frágil, mas tão forte! Obrigada por estar sempre do meu lado, de sua maneira, mas sempre me apoiando em todas as minhas decisões. Te amo!

À minha irmã **Juliana**, minha companheira da vida toda!! Obrigada pelos momentos de descontração, amizade, carinho e por escutar meus anseios! Te amo!

À **Tia Lizi**, doce e carinhosa, sempre me confortando nos momentos difíceis e me contagiando com sua alegria. Você é muito especial para mim! Te amo!

À minha cunhada **Ariane**, sempre amiga! Obrigada pelos momentos de descontração e amizade... isto tornou meus dias mais leves!!

As amigas **Larine, Priscila e Cristiana** pela amizade, conselhos, ensinamentos, descontração e carinho... Sempre dispostas a ajudar! Gosto muito de vocês!!!

À **Profª Fernanda** pela amizade e dedicação, sempre me auxiliando quando eu precisava!
Obrigada pelo apoio!!

À **Profª Jacqueline** pelos ensinamentos e conselhos!! Obrigada...

Aos integrantes do Laboratório de Micotoxinas, **Adriana, Ana, Anelise, Annie, Antônio, Carol, Elisa, Fran, Guta, Jesus, Katerine, Lidiane, Luciana, Natalie, Mariane, Muriele, Paola, Paula, Paulo, Profª Leonor, Renata, Raquel, Rosana, Thiago**. Obrigada pela convivência, ajudas e momentos de descontração!

Ao **LACOM**, em especial ao **Profº Ednei** que permitiu a minha entrada em seu laboratório, obrigado pela confiança! À **Sergi** pelos ensinamentos e sempre disposta a me ajudar!

Ao **Profº Luiz Carlos Gutoski** e sua equipe pela cooperação nas análises.

Ao **LTA**, em especial, a **Profª Myriam**, e a **Louise** que auxiliou na cocção dos biscoitos!!

Obrigada!

A **Capes** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro concedido.

Enfim, agradeço **à todos** que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 Produtos de panificação	4
3.1.1 Biscoitos tipo <i>Cracker</i>	5
3.2 Micotoxinas	6
3.2.1 Característica química dos tricotecenos	8
3.2.2 Condições para produção de micotoxinas	8
3.2.3 Efeito tóxico.....	9
3.2.4 Ocorrência de tricotecenos em produtos de panificação	10
3.2.5 Métodos para determinação simultânea	11
3.2.6 Legislação para tricotecenos.....	13
3.2.7 Descontaminação de produtos de panificação	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Material	16
4.1.1 Instrumentos	16
4.1.2 Reagentes, solventes e padrões	17
4.2 Métodos.....	17
4.2.1 Preparo dos padrões de DON, toxinas HT-2 e T-2.....	17
4.2.2 Estabelecimento das condições cromatográficas para a determinação simultânea de DON, toxinas HT-2 e T-2 por cromatografia líquida de alta eficiência	18
4.2.3 Padronização do método para extração de DON e toxinas HT-2 e T-2 de biscoito tipo <i>Cracker</i>	20
4.2.4 Estudo do efeito de matriz	22
4.2.5 Levantamento de ocorrência de tricotecenos dos grupos A e B	23

4.2.6	Caracterização química de farinha de trigo	23
4.2.7	Avaliação tecnológica da farinha de trigo	23
4.2.8	Elaboração de biscoitos <i>Cracker</i>	24
4.2.9	Redução dos níveis de DON pelo processamento de biscoitos tipo <i>Cracker</i>	26
4.2.10	Risco da exposição humana à contaminação de DON	27
4.2.11	Tratamento de dados	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Condições para determinação simultânea de DON, toxinas HT-2 e T-2 em HPLC-DAD	29
5.2	Padronização de método de extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoito tipo <i>Cracker</i> e farinha de trigo	34
5.3	Efeito da matriz na separação cromatográfica	39
5.4	Ocorrência de DON, toxinas HT-2 e T-2 em amostras de biscoitos tipo <i>Cracker</i> e farinha de trigo	43
5.5	Processamento de biscoito tipo <i>Cracker</i>	45
5.2.1	Caracterização química e tecnológica da farinha de trigo.....	45
5.2.2	Temperatura ideal de cocção	49
5.6	Efeito das operações de processamento nos níveis iniciais de DON	50
5.6.1	Efeito da fermentação	50
5.6.2	Redução pela cocção	53
5.7	Riscos da ingestão de biscoitos tipo <i>Cracker</i> contaminados com DON	53
5.7.1	Digestibilidade de biscoito tipo <i>Cracker</i> contaminado com DON	53
5.7.2	Risco de exposição humana x Contaminação de DON nos biscoitos tipo <i>Cracker</i>	55
6.	CONCLUSÕES	56
7.	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Métodos para determinação de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares ..	12
Tabela 2- Limites máximos tolerados de micotoxinas disposto na RDC nº7/11 e sem aditivo 2013.....	13
Tabela 3- Composições das fases móvel para separação cromatográfica de DON e toxinas HT-2 e T-2.....	18
Tabela 4- Métodos para extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoito tipo <i>Cracker</i>	20
Tabela 5- Valores reais e codificados das variáveis do DCC 2 ³ para recuperação de DON, toxinas HT-2 e T-2.....	22
Tabela 6- Formulação para elaboração de biscoito tipo <i>Cracker</i>	24
Tabela 7- Valores reais e codificados das variáveis do planejamento DCC 2 ² referentes ao efeito da fermentação	27
Tabela 8- Condições cromatográficas para determinação cromatográfica simultânea de DON, toxinas HT-2 e T-2 em HPLC-DAD.....	31
Tabela 9- Parâmetros cromatográficos obtidos da separação de tricotecenos	32
Tabela 10- Parâmetros analíticos de DON, toxinas HT-2 e T-2 em HPLC-DAD	33
Tabela 11- Recuperações das extrações de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoitos tipo <i>Cracker</i> sob diferentes condições	34
Tabela 12- Valores codificados e reais (em parênteses) do planejamento experimental DCC 2 ³ para recuperação de DON, toxina HT-2 e T-2.....	35
Tabela 13- Efeitos sobre as recuperações de DON, toxina HT-2 e T-2.....	36
Tabela 14- Recuperações de DON, toxina HT-2 e T-2 em biscoitos tipo <i>Cracker</i>	37
Tabela 15- Efeito matriz para biscoitos tipo <i>Cracker</i> na determinação de DON, toxinas HT-2 e T-2.....	40
Tabela 16- Efeito matriz para farinha de trigo na determinação de DON	41
Tabela 17- Parâmetros analíticos para o efeito matriz de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoitos tipo <i>Cracker</i>	41
Tabela 18- Parâmetros analíticos para o efeito matriz de DON em farinha trigo	41
Tabela 19- Ocorrência de DON em amostras de biscoito tipo <i>Cracker</i> e farinha de trigo	44
Tabela 20- Características tecnológicas de farinhas de trigo indicada para biscoitos (1) para uso geral (2).....	47

Tabela 21- Valores codificados e reais (em parênteses) do planejamento experimental DCC 2 ² para redução de DON	51
Tabela 22- Efeitos sobre as recuperações de DON.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tipos de biscoitos consumidos no Brasil.....	5
Figura 2- Biossíntese do tricotecenos por <i>Fusarium</i> sp.....	7
Figura 3- Estrutura básica dos tricotecenos.....	8
Figura 4- Esquema das etapas de elaboração de biscoitos tipo <i>Cracker</i>	25
Figura 5- Espectros de absorção obtidos no HPLC-DAD para DON (a), toxina HT-2 (b) toxina T-2, respectivamente, na faixa de 190 a 400 nm.....	30
Figura 6- Cromatograma de DON (217,9 nm) e toxinas HT-2 e T-2 (192,2 nm).....	32
Figura 7- Etapas do método de extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoitos tipo <i>Cracker</i> e farinha de trigo	39
Figura 8- Cromatograma do efeito matriz em biscoitos tipo <i>Cracker</i> para DON (217,9 nm), HT-2 e T-2 (192,2 nm).....	42
Figura 9- Cromatograma do efeito matriz em farinha de trigo para DON (217,9 nm)	42
Figura 10- Parâmetros de cor L e b* durante o cozimento em diferentes temperaturas na elaboração de biscoitos tipo <i>Cracker</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA- absorção de água
ACN- acetonitrila
CV- coeficiente de variação
DAD- detector por arranjo de diodos
DCC- Delineamento Composto Central
DON- desoxinivalenol
DP- desvio padrão
E- elasticidade
FM- fase móvel
GC- *Gas chromatography*
HPLC- *High Performance/Pressure Liquid Chromatography*
ITD- ingestão diária tolerável
ITM- índice de tolerância a mistura
k- fator de retenção
L- extensibilidade
LC- *Liquid chromatography*
LOD- limite de detecção
LOQ- limite de quantificação
MeOH- metanol
MS- *mass spectrometry*
nd- não detectado
NIV- nivalenol
P- tenacidade
Rs- resolução
TD- tempo de desenvolvimento
 t_R - tempo de retenção
W- força do glúten
 α - fator de separação

Metodologia, ocorrência e efeitos de processamento de tricotecenos dos grupos A e B em biscoitos tipo *Cracker*

Resumo

As micotoxinas são metabólitos secundários biossintetizados e excretados por fungos toxigênicos através de um conjunto de vias metabólicas induzidas por situações de estresse, contaminando alimentos destinados ao consumo humano e animal. Os tricotecenos são um grupo de micotoxinas, encontradas principalmente no trigo em todo mundo, que previamente foram infectados por fungos do gênero *Fusarium* durante o cultivo. A farinha de trigo é um dos principais veículos de introdução micotoxinas no ambiente industrial, sendo matéria-prima de diversos produtos de panificação, tais como massas, bolos, pães e biscoitos. O objetivo deste trabalho, foi realizar estudos sobre a ocorrência de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoitos tipo *Cracker* e fornecer subsídios para manejo estratégico da contaminação por estas micotoxinas. Para isto, foi padronizado método para determinação simultânea dos tricotecenos DON, toxinas HT-2 e T-2 que permitisse identificar o efeito do processamento de biscoitos tipo *Cracker* nos níveis de contaminantes. A determinação dos tricotecenos dos grupos A e B foi realizada em HPLC-DAD que foram extraídos com ACN:H₂O (96:4, v/v). As recuperações de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoito *Cracker* foram de 98,6%; 84,0% e 80,9% cujo efeito de matriz aumentava o sinal em 14,3%; 2,8% e 9,9%, respectivamente. Em farinha de trigo foi possível recuperar satisfatoriamente apenas DON (97,2%) com efeito de matriz suprimindo o sinal em 1,3%. O levantamento de ocorrência demonstrou que das 23 amostras de biscoito *Cracker* comerciais analisadas, 18 amostras estavam contaminadas com DON (378-5296 µg.kg⁻¹), das quais 22% estavam acima dos limites máximos tolerados dispostos em legislação. As toxinas T-2 e HT-2 não foram detectadas nas amostras. Para farinha de trigo, 3 das 8 amostras analisadas apresentam contaminação por DON em níveis entre 136- 207 µg.kg⁻¹. O estudo do efeito de processamento dos biscoitos tipo *Cracker* mostrou que o tempo de fermentação é fator importante na redução dos níveis de DON, sendo que 20 h da fermentação da esponja são capazes de reduzir em 39- 43% a contaminação. O tempo de cozimento não influenciou na redução da contaminação. Os riscos da ingestão de DON demonstrou que podem ser ingeridos 0,08 µg de DON.kg⁻¹ de peso corporal por dia, pelo consumo de biscoitos tipo *Cracker*, sendo a maior parte absorvido no duodeno. Considerando que a alimentação à base de farinha de trigo é muito ampla e os resultados deste estudo é imprescindível o incentivo ao estabelecimento de condições de processos para produtos de panificação sob parâmetros que diminuam a ingestão diária decorrente de cada grupo de alimento.

PALAVRAS-CHAVE: Biscoitos, micotoxinas, tricotecenos.

Methodology, occurrence and effects of processing on trichothecene in groups A and B type *Cracker* biscuits

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites biosynthesized and secreted by toxigenic fungi through a set of metabolic pathways induced by stressful situations, contaminating food for human and animal consumption. Trichothecenes are a group of mycotoxins, mainly found in wheat worldwide, that have been previously infected by *Fusarium* fungi during cultivation. Wheat flour is one of the main vehicles for mycotoxin introduction into the industrial environment, with raw material of various bakery products, such as pasta, cakes, breads and cookies. The objective of this work is to conduct studies on the occurrence of DON, HT-2 toxin and T-2 in type *Cracker* biscuits and provide subsidies for strategic management of contamination by these mycotoxins. To this, a method for the simultaneous determination of the trichothecene DON, HT-2 and T-2 toxin was standardized in order to identify the effect of type of processing *Cracker* biscuits on these contaminants levels. The determination of trichothecenes in groups A and B was carried out on HPLC -DAD after extraction with ACN:H₂O (96:4, v/v). The recoveries of DON, HT-2 toxin and T-2 in *Cracker* biscuits were 98.6%, 84.0% and 80.9% whose matrix effect increased signal in 14.3%, 2.8% and 9.9%, respectively. In wheat flour was only possible to satisfactorily recover DON (97.2%) with a matrix effect by suppressing the signal at 1.3%. The survey showed that on the 23 commercial *Cracker* biscuits samples analyzed 18 were contaminated with DON (378-5296 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), in which 22% were above the maximum tolerated arranged in legislation. The T-2 and HT-2 were not detected in the samples. For wheat flour, 3 of 8 samples have DON contamination levels between 136-207 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The study of the effect of processing type *Cracker* biscuits showed that the fermentation time is an important factor to reduce the levels of DON, and 20 h of sponge fermentation are capable of reducing by 39-43% the contamination. Cooking time did not influence the contamination reduction. The risks DON intake demonstrated that can be ingested 0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ of body weight per day by eating *Cracker* biscuits type, being the most absorbed in the duodenum. Considering that a diet based on wheat flour is very wide, the results of this study are essential to encourage the establishment of process conditions for bakery products under parameters that reduce the daily intake derived from each food group.

KEYWORDS: Biscuits, mycotoxins, trichothecenes.

1. INTRODUÇÃO

Alimentos destinados ao consumo humano podem ser contaminados sob circunstâncias diversas ao longo da cadeia produtiva, porém a ocorrência de algumas espécies de fungos em alimentos tem servido de alerta para o risco de contaminação com micotoxinas, contribuindo para a perda de qualidade do produto com conseqüentes danos à saúde de humanos e de animais de criação (MISHIRA et al., 2013).

As micotoxinas são metabólitos secundários biossintetizados e excretados por fungos toxigênicos, contaminantes de cereais, através de um conjunto de vias metabólicas induzidas por estresse, desbalanço de nutrientes e condições ambientais (SWEENEY e DOBSON, 1998). Quando ingeridas através alimentos destinados ao consumo humano ou animal, podem provocar manifestações imunossupressoras, mutagênicas e carcinogênicas (BOK et al., 2004).

A contaminação fúngica por “fungos de campo”, do gênero *Fusarium*, ocorre especialmente quando estes não atingiram latência completa (PRONK, SCHOTHORST e VAN EGMOND, 2002). Neste gênero estão espécies produtoras de tricotecenos que são classificadas em quatro grupos (A-D), de acordo com seus grupos funcionais característicos na estrutura básica. Os grupos A e B são os mais comuns em matrizes alimentícias, sendo os do grupo A representados principalmente pelas toxinas HT-2 e T-2, e os grupo B incluem nivalenol (NIV), desoxinivalenol (DON) e seus derivados (KRSKA e MOLINELLI, 2007).

A toxicidade entre os tricotecenos está determinada pelo anel epóxido nos carbonos 12-13 e da dupla ligação nos carbonos 9-10 e seus substituintes que afetam o papel deles no metabolismo do contaminado (SNYDER, 1986). De maneira geral, eles inibem a síntese protéica e do próprio DNA, os mais tóxicos (toxina T-2 e NIV) atuam como inibidores dos passos de iniciação da síntese protéica, e os outros (DON) atuam no passo de alongação-terminação da cadeia polipeptídica (KIESSLING, 1986).

A polaridade intermediária dos tricotecenos encontrados em matrizes alimentares dificulta a sua extração, pois são necessários solventes que retirem também uma série de compostos interferentes. A diferença das polaridades dos substituintes da família química é fator importante para quantificação simultânea dos grupos A e B, o que resulta na necessidade de padronização de metodologia para determinação em matrizes específicas, preferentemente

com geração mínima de resíduos (IBÁÑEZ-VEA, LIZARRAGA e PEÑAS, 2011; KÖPPEN et al, 2010).

O grão de trigo é um dos principais veículos de introdução de tricotecenos no ambiente industrial, pois é um dos substratos preferenciais para fungos do gênero *Fusarium*, e amplamente utilizada como matéria-prima de diversos produtos de panificação, tais como pães, biscoitos, massas, bolos, e outros (OLIVEIRA et al., 2002; PACIN et al., 2010). Dado a frequência do consumo destes produtos, a farinha contaminada representa um grande impacto na saúde humana, requerendo estratégias para reduzir os riscos de consumo frequente com elas (CHELI et al., 2013).

Em geral, as micotoxinas que contaminam o grão e a farinha permanecem no produto final, pois elas são termoestáveis e resistentes às condições de processamento (SCUMADORE et al., 2009). Portanto, o plantio, as condições climáticas, a colheita, o armazenamento da matéria-prima, o processamento e a comercialização do produto final, bem como sua composição química, podem influenciar de maneira marcante o grau e o tipo de contaminação de um determinado produto. Estes fatos indicam que processos para fabricação de alimentos à base de farinha de trigo que apresentem resultados satisfatórios para inativação, destruição ou remoção da contaminação por micotoxinas são importantes. Visto que, a principal via de exposição à micotoxinas é através da ingestão de alimentos contaminados (PACIN et al., 2010).

Os processos utilizados para panificação variam consideravelmente, com relação as condições de fermentação e cozedura, tempo e temperatura, inclusão de aditivos, e outros. Sendo assim, a identificação da contaminação e o estabelecimento de parâmetros operacionais que propiciem a diminuição dos riscos a saúde humana são viáveis e seu estabelecimento com este foco pode contribuir para a segurança (SCHOTHORST e VAN EGMOND, 2005; MITSOULIS e HATZIKIRIAKOS, 2009).

Estes aspectos têm motivado a busca de procedimentos e parâmetros específicos durante as etapas de processamento que promovam a descontaminação (HWANG e LEE, 2006). No entanto, ainda são poucos os dados experimentais para alguns processamentos, tais como a produção de biscoitos tipo *Cracker*. Assim, identificar o problema de ocorrência de um contaminante e simultaneamente estabelecer parâmetros de processos que auxiliem a manutenção da contaminação dentro do aceitável é um grande desafio para indústria de panificação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudo sobre a ocorrência de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoitos tipo *Cracker* e fornecer subsídios para manejo estratégico da contaminação.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar metodologia para determinação simultânea dos tricotecenos do grupo A (toxinas T-2 e HT-2) e do grupo B (DON) em biscoitos tipo *Cracker*;
- Estudar a ocorrência de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoitos tipo *Cracker* e farinhas de trigo;
- Identificar durante o processamento de biscoito tipo *Cracker* a operação que pode contribuir para a diminuição dos níveis de contaminantes.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Produtos de panificação

O trigo é uma planta herbácea pertencente à família das Gramíneas, cientificamente conhecida por *Triticum*, é uma das primeiras espécies domesticadas pelo homem, e tem sido fundamental na base alimentar da humanidade. Os trigos de importância comercial são espécie *Triticum aestivum*, *T. compactum* e *T. durum* (POSSAMAI, 2005).

Embora seja uma cultura melhor adaptada as latitudes 30°-60°N e 27-40°S, pode ser cultivado fora destes limites, inclusive próximo à área equatorial (NUTTONSON, 1955). A produção mundial de trigo é de, aproximadamente, 655.2 milhões de toneladas por ano (EMBRAPA, 2013) e o rendimento de grãos e as características de qualidade tecnológica são fortemente influenciados pelas condições climáticas de cada região e meteorológicas durante a safra (EMBRAPA, 2009).

No Brasil, a produção em 2012/2013 foi de 4300,4 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Podemos classificar as cultivares de trigo brasileiro em Trigo Brando, Trigo Pão e Trigo Melhorador, com base nos valores de alveografia e número de queda, testes que avaliam, respectivamente, a força de glúten e a atividade das enzimas amilases, afetadas pela germinação pré-colheita, como indicativos da qualidade do trigo para os diferentes usos (MACIEL, 2006).

Por exemplo, o trigo Brando, é indicado para uso na fabricação de bolachas, biscoitos, bolos e outros produtos que necessitem baixa força de glúten. O trigo Pão é indicado para a fabricação de pães, massas alimentícias, *crackers*, considerado um trigo forte, e o trigo Melhorador é indicado para uso em mesclas com outros trigos para aumentar a força de glúten, podendo também ser usado na fabricação de massas alimentícias e *crackers* (EMBRAPA, 2009).

A maior parte do trigo brasileiro é convertido em farinha de trigo. A farinha de trigo é a matéria-prima largamente utilizada na elaboração de diversos alimentos, como pães, biscoitos, bolos e massas (MAPA, 2005). Em torno de 55% do trigo beneficiado se destinam à panificação, 17%, para uso doméstico, 15% para a produção de massas alimentícias, 11% para a fabricação de biscoitos e 2% para outros usos, em produtos de confeitaria (SHEUER et al., 2011).

Em contra partida, a farinha de panificação é um dos principais veículos de introdução de esporos fúngicos no ambiente industrial, especialmente em pequenos estabelecimentos, onde diferentes processos de fabricação são conduzidos em ambientes próximos (FREIRE, 2011).

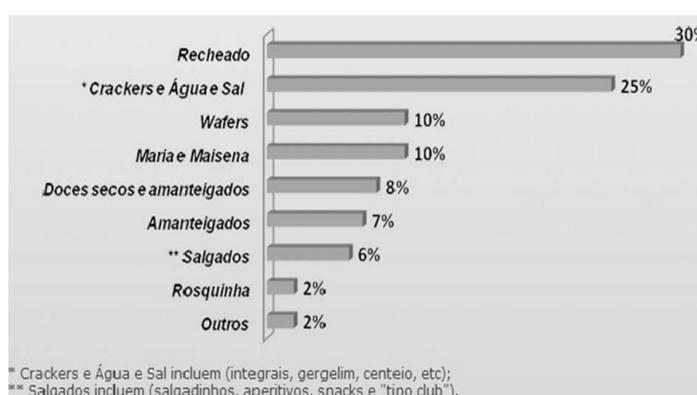
Diante disto, a produção de produtos de panificação sob condições que os tornem mais seguros é fundamental dado ao frequente consumo em nível mundial e a grande exposição diária a esses alimentos, veículo de diferentes contaminantes onde se incluem as micotoxinas.

3.1.1 Biscoitos tipo Cracker

O termo biscoito deriva do latim “*Bis-Coctus*” que significa “duas vezes cozido” e foi utilizado para se referir ao pão endurecido com dimensões reduzidas (WADE, 1988). A ANVISA (1978) definiu o biscoito ou bolacha como produto obtido pelo amassamento e cocção conveniente de massa preparada com farinhas, amidos, féculas fermentadas ou não, e outras substâncias alimentícias.

Os biscoitos são classificados de acordo com o ingrediente da formulação ou pela forma de apresentação (SIMABESP, 2012). A Figura 1 demonstra o percentual de consumo de vários tipos de biscoitos no Brasil.

Figura 1- Tipos de biscoitos consumidos no Brasil



Fonte: SIMABESP (2012)

Os biscoitos tipo *Cracker* são classificados como biscoitos ou bolachas salgadas. De acordo com dados do Sindicato de Massas e Biscoitos, o mercado de biscoitos e massas no

Brasil é responsável pela produção de 2.060 toneladas destes produtos, sendo, portanto o segundo maior produtor mundial de biscoitos, com registros de 1.250 milhões de toneladas em 2012 (SIMABESP, 2012).

Segundo Gutkoski, Nodari e Neto (2003) a farinha utilizada na fabricação de biscoitos deve apresentar taxa de extração entre 70 e 75%, teor de proteínas entre 8 e 11% e glúten extensível. Os biscoitos tipo *Cracker* são quadrados (50 x 50 mm) e possuem 4 mm de espessura, totalizando de 3 a 3,5g e umidade em torno de 2,5% (MACIEL, 2006).

A farinha de trigo ao qual são adicionados os demais ingredientes, a água é utilizada para dissolver os ingredientes solúveis e hidratar o glúten (LIMA, 1998); a gordura melhora a expansão e lubrificação da massa contribuindo com aroma e sabor (MORETTO, 1999); o fermento biológico, composto pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é responsável pela fermentação da massa em álcool e gás carbônico, tendo como principal função o condicionamento das proteínas do glúten (MACIEL, 2006); o sal, fixador de água no glúten e influenciador de aroma (ARAÚJO, 1993); o bicarbonato de sódio, com função de neutralizar os ácidos formados na fermentação, definido o pH e coloração final (LAJOI e THOMAZ, 1994).

Na fabricação dos biscoitos tipo *Cracker*, os ingredientes são misturados em dois estágios. Inicialmente, a mistura é feita em tempo suficientemente curto para homogeneização dos ingredientes, e a “esponja” fermentará por 18 horas. Na sequência são adicionados os demais ingredientes na esponja, deixando fermentar por mais 6 horas. A laminação é realizada através de rolos laminadores, reduzindo a massa de forma gradual e uniforme, posteriormente cortada em rolos estampadores. Por fim, a cocção é realizado em fornos contínuos durante 3-5 min (MELLO, LIMA e PINHEIRO 2004).

Podemos observar que a fabricação de biscoitos *Cracker* está estruturada em uma formulação básica e condições de processamento tais como tempo, umidade e temperatura, que influenciam na qualidade do produto final.

3.2 Micotoxinas

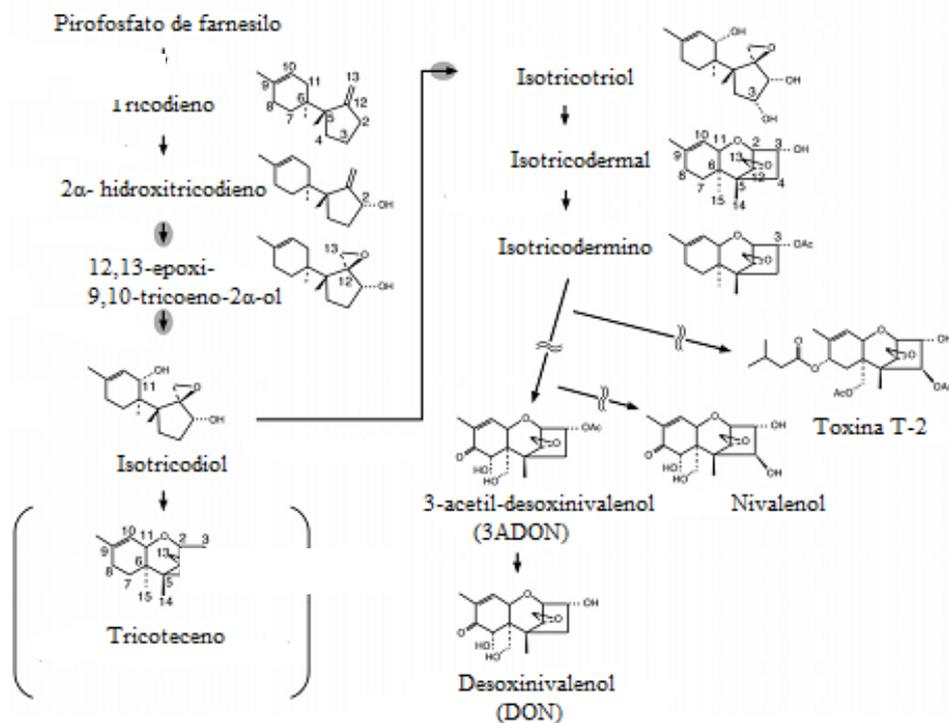
Os fungos são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos em condições naturais e laboratoriais através de um conjunto de vias metabólicas, mas que não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo (BETINA, 1989). A produção de

metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos ocorrem nos micélios de fungos filamentosos, normalmente em condições de estresse compreendendo uma grande variedade de estruturas (D'MELLO e MACDONALD, 1997).

A presença de fungos no alimento não implica obrigatoriamente em produção de micotoxinas, por outro lado, a ausência destes fungos não garante que o alimento esteja livre destes compostos, pois estas toxinas permanecem mesmo após o fungo ter perdido sua viabilidade (DINIZ, 2002).

Os tricotecenos são micotoxinas produzidas, principalmente, por linhagens de fungos do gênero *Fusarium*, predominante do campo, contaminante principal de trigo em todo mundo (RICHARD, 2007). A biossíntese dos tricotecenos por fungos do gênero *Fusarium*, demonstrada na Figura 2, inicia-se pela ciclização do pirofosfato de farnesilo isoprenóide para tricodieno (HOHN e VAN MIDDLESWORTH, 1986). Posteriormente, diversas reações de oxigenação, isomeração, ciclização e esterificação que se conduz de tricodieno à diacetoxiscirpenol, toxina T-2 e 3-acetil-desoxinivalenol (HEIDTMANN-BEMVENUTI et al., 2011).

Figura 2- Biossíntese do tricotecenos por *Fusarium* sp..



Fonte: Kimura et al. (2006)

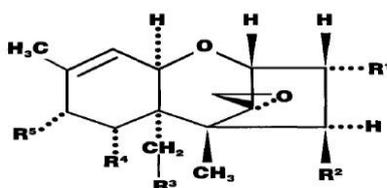
A principal via de exposição dos animais a micotoxinas é através da ingestão de alimentos contaminados, apesar de existirem casos esporádicos de inalação de micotoxinas e contacto dermal (UENO, 1985). Elas constituem um dos principais problemas para segurança de alimentos por serem extremamente estáveis, resistindo ao calor, luz ultravioleta e processos de desidratação (KUSHIRO, 2008).

3.2.1 Característica química dos tricotecenos

Os tricotecenos são anéis tricotecanos que apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 12-13, além de substituintes como grupamentos hidroxilas ou cetônicos, classificados na estrutura básica (SNYDER, 1986).

Os tricotecenos do grupo A possuem radicais acilados ou hidroxilas no carbono 8 como as toxinas T-2 e HT-2. Os do grupo B, possuem um grupamento cetônico no carbono 8, assim como DON e NIV. Os tricotecenos do grupo C, apresentam dois grupamentos epóxidos entre o carbono 7 e 8, ou entre 9 e 10, como a crotocina. Por fim, o grupo D é constituído pelos tricotecenos macrocíclicos como roridina, verrucicarina e a satratoxina (UENO, 1985). A Figura 3 apresenta a estrutura básica dos tricotecenos.

Figura 3- Estrutura básica dos tricotecenos



3.2.2 Condições para produção de micotoxinas

Os fungos do gênero *Fusarium* infectam lavouras e podem permanecer viáveis durante a estocagem, produzindo micotoxinas após a colheita, quando ocorre desbalanço de nutrientes ou condições ambientais propícias. As temperaturas ótimas para infecção deste gênero variam entre 0 e 35°C e a umidade relativa ótima entre 60 e 90% (SWEENEY e DOBSON, 1998). A aplicação de fungicidas para controle de doenças fúngicas nas lavouras

responde de maneira positiva nesta questão, porém quando aplicado em concentrações em que não ocorre a inibição completa do fungo a produção de micotoxinas pode aumentar (GARIES e CEYNOWA, 1994).

Nem sempre existe relação entre o teor de micotoxinas e a população fúngica, sendo o conteúdo de micotoxinas dependente, principalmente, da temperatura, da umidade e grau infestação de insetos ou outros micro-organismos (SAVARD, 1991). Por isso, condições impróprias de estocagem favorecem a produção de micotoxinas, reduzindo a qualidade do grão e por consequência do produto final (LLORENS et al., 2004).

3.2.3 Efeitos tóxicos

A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde humana e animal (SHEPHARD, 2008). Tais efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, o grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo (BAHTNAGAR et al., 2002). Além disso, os efeitos tóxicos podem ser potencializados pelo sinergismo que pode haver entre elas ou com doenças pré-existentes (HUSSEIN e BRASSEL, 2001).

O anel epóxido dos tricotecenos é bastante estável e confere toxicidade aos diferentes compostos da família. Sendo assim, visa-se sua abertura com condições drásticas, tais como meio fortemente ácido e presença de hidrocarbonetos de alumínio ou lítio (UENO, 1985). No entanto, há evidências que mostram o efeito da toxicidade dos grupamentos R e da ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 (SYNDER, 1986).

Os tricotecenos são conhecidos como inibidores da síntese de proteínas, DNA e RNA, com efeito imunossupressor e hemorrágico (CORRIER, 1991). Eles atuam inibindo a enzima peptil transferase, afetando principalmente células em divisão ativa, como as do trato gastrointestinal, pele e células linfóides, enitróides e órgãos vitais (TANAKA, 2001).

De maneira geral, o grupo A de tricotecenos (como toxina T-2 e HT-2) são os mais tóxicos aos humanos, enquanto que os do grupo B (DON, NIV) implicam em toxicoses crônicas, pois ocorrem frequentemente em níveis subagudos (PRELUSKY, ROTTER e ROTTER, 1994).

Tem sido demonstrado que, por meio da desacetilação da toxina T-2, é obtido o principal metabólito, a toxina HT-2. Acredita-se na ação de carboesterases como responsáveis

pela desacetilação da toxina T-2 e conversão em toxina HT-2 (ERIKSEN e ALEXANDER, 1998; VISCONTI, 2001).

Contudo, os tricotecenos durante o metabolismo do indivíduo afetado podem sofrer reações de hidrólise, hidroxilação, abertura do anel epóxido e conjugação, resultando em compostos de toxicidade pouco conhecidas.

3.2.4 Ocorrência de tricotecenos em produtos de panificação

Abouzied et al (1991) relataram presença de DON em amostras de biscoitos nos EUA, em níveis variáveis entre 1200 e 19000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Pacin et al (1997) determinaram DON em pão e produtos de padarias (à base de farinha de trigo) na Argentina e DON foi detectado em 92,8% das amostras, com níveis que variaram entre 200 a 2800 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Scott (1997) analisou produtos de panificação no Canadá, encontrando 43% das amostras positivas para DON em níveis médios de contaminação de 4060 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Ocorrência de DON, toxinas T-2 e HT-2 foi amplamente divulgado em alimentos à base de trigo, na União Européia (JECFA, 2001). O projeto SCOOP (*Scientific Co-operation on Questions relating to Food*), encontrou contaminação em 20% (3490 amostras) e 14% (3032 amostras) com as toxinas T-2 e HT-2, respectivamente (SCHOTHORST e VAN EGMOND, 2004).

Cano-Sancho et al (2011) avaliaram a ocorrência de DON, toxinas T-2 e HT-2 em cereais matinais, lanches e amostras de massas presentes mercado catalão. DON foi o principal tricoteceno presente com percentuais de amostras positivas variando de 1,4 a 100,0%, sendo que 1% das amostras estavam acima dos limites da União Européia. A toxina HT-2 apresentou baixo percentual de contaminação em pão de forma (15,3%), flocos de trigo (14,8%), massa (10,0%), snacks de milho (8,5%), milho (6,9%) e flocos de milho (6,2%), enquanto que a toxina T-2 foi quantificada em 1% do total de amostras. de 479 do total.

Montes, Segarra e Castillo (2012) verificaram a presença de DON, NIV, 3-AcDON, 15 AcDON e fusarenone X (Fus-X) em vários produtos à base de cereais mais consumidos pela população espanhola, sendo DON a micotoxina mais frequentemente detectada e geralmente em maior concentração. NIV e Fus-X foram detectadas em 4 e 2 amostras, respectivamente, 3 e 15-AcDON não foram detectados.

Estes dados apontam para a necessidade de reduzir o nível contaminação por tricotecenos em produtos de panificação, tornando-se uma questão de interesse mundial para proteger a saúde do consumidor a diminuição da ingestão deles através da dieta.

3.2.5 Métodos para determinação simultânea

Métodos de análise devem ser sensíveis e confiáveis o suficiente para serem utilizados no controle dos limites permitidos, e também permitir a detecção de substâncias proibidas presentes por contaminação natural ou intencional, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos ou cancerígenos (RIDGWAY, LALLJIE e SMITH, 2007).

A maioria dos procedimentos analíticos para determinação de micotoxinas engloba as etapas de amostragem, extração, limpeza e concentração. Para análise de tricotecenos têm sido relatadas várias combinações de solventes, normalmente acetone nitrila e água, ou metanol e água. A limpeza do extrato, normalmente é realizada com colunas multifuncionais que contenha carvão ativo e alumina, ou com a utilização de sais específicos (LANGSETH e RUNDBERGET, 1998). Também se verifica a tendência de extrações usando métodos miniaturizados, tipo QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), MPSD (*Matrix solid phase dispersion*) e outros.

Testes de imunoenaios, especialmente de sistemas imunoabsorvente (ELISA), vêm sendo utilizados para determinação de tricotecenos (KRSKA, BAUMGARTNER e JOSEPHS., 2001). Um problema associado ao uso de ensaios imunoquímicos é a possibilidade de resultados subestimados ou superestimados devido ao efeito de interferência da matriz. Isto ocorre porque os ensaios imunoquímicos utilizam anticorpos não específicos para o analito de interesse, podendo ocasionar uma interação com algum componente da matriz, diferente do analito que se procura (ROSI et al., 2007).

Os primeiros métodos para quantificação múltipla de tricotecenos foram utilizando HPLC-UV (FRISVAD, 1987), desde então o poder de separação das colunas têm aumentado consideravelmente com novos materiais da fase estacionária e diminuição do tamanho das partículas (TANAKA, 2000). No entanto, existem algumas variações de tempo de retenção, combinação da fase móvel, instrumentos e acessórios usados de um método para outro que podem vir a dificultar a análise (KASSIM et al., 2011).

O LC-MS tornou-se o instrumento mais emergente, em que os compostos como as micotoxinas, são rapidamente detectados sem necessidade de derivatização, como em GC-MS. Além disso, incluem baixos limites de detecção, a capacidade de gerar informações estruturais dos analitos, tratamento mínimo da amostra e possibilidade de abranger uma ampla variedade de analitos diferentes (SPANJER, RENSEN e SCHOLTEN, 2006).

Em especial, co-ocorrência de tricotecenos dos grupos A e B num mesmo alimento sugere a necessidade de desenvolver métodos analíticos de análise simultânea, sendo esta questão um desafio devido a heterogeneidade das matrizes alimentares e característica físico-química das toxinas, ainda que pertencentes à mesma família química (KOPPEN et al., 2010).

A Tabela 1 apresenta diferentes métodos de extração, limpeza e quantificação de várias micotoxinas em produtos de panificação que vem sendo descritos nos últimos anos.

Tabela 1- Métodos para determinação de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares.

Alimento	Micotoxinas	Extração	Limpeza	Quantificação	Autor
Biscoitos	NIV, DON, T-2, HT-2, entre outras	ACN:água	Multisep 226	LC-MS	Tanaka et al. (2010)
Pão e farinha de trigo	DON e OTA	ACN:água	Mycosep 216, 225 e 227	GC-MS	Pacin et al. (2010)
Pão e macarrão	DON e T-2	ACN:água	Mycosep 225	GC-MS	González et al. (2010)
Farinha de trigo	DAS, T-2, HT-2, DON e NIV	Metanol:água	QuEChERS	LC-MS	Sospedra et al. (2010)
Milho, trigo e cevada	DON, NIV, T-2, HT2, ZEA e outras	ACN: água acidificada	QuEChERS	UPLC-TOF-MS	Zachariosova et al. (2010)
Pão	DON, T-2 e HT-2	ACN:água	Mycoseo 227 e QuEChERS	LC-MS	Monanci et al. (2011)
Macarrão, pão, flocos de trigo, entre outros	DON, T-2 e HT-2	ACN:água	Mycosep 225, 216 3 colunas imunoafinidade	GC-ECD LC-DAD GC-MS	Cano-Sancho et al. (2011)
Farinha de trigo entre outros	T-2 e HT-2	Metanol: água	Colunas imunoafinidade	HPLC	Kassim et al. (2011)
Trigo e aveia	T-2 e HT-2	Metanol: água	Colunas imunoafinidade	HPLC-FLD	Pascale et al. (2012)
Arroz	DON e ZEA	Água: ACN	QuEChERS	HPLC-UV	Heidtmann et al. (2012)
Trigo, farinha de trigo e pão	NIV, DON DAS, T-2, HT-2 entre outras	ACN:água	Filtração em celulose	LC-MS/MS	Juan et al. (2012)
Pão, biscoitos, bolachas e minicakes	DON	Metanol:água	Colunas imunoafinidade	LC-MS/MS	Suman et al. (2012)

3.2.6 Legislação para tricotecenos

No Brasil, a legislação com relação aos limites máximos de micotoxinas em alimentos foi atualizada em fevereiro de 2011, até então, apenas concentrações para aflatoxinas eram previstas (ANVISA, 2002).

A RDC n°7 (ANVISA, 2011), abrange grupos maiores e mais específicos de alimentos, bem como níveis de concentrações que deveriam ser reduzidos até 2016. No entanto, em 30 de dezembro de 2013 o prazo de adequação aos níveis propostos foi prorrogado até 2017 (RDC n°59). Dessa forma, o limite máximo para DON em biscoitos tipo *Cracker* e farinha de trigo permanece em 1750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ com redução para 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em 2017. A Tabela 2 dispõe dos atuais níveis de contaminação permitidos no Brasil em trigo, farinha de trigo e produtos de panificação.

Tabela 2- Limites máximos tolerados de micotoxinas disposto na RDC n°7/11 com o aditivo RDC n°59/13.

Micotoxina	Alimento	Limite máximo tolerado ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	
		2014	2017
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750	750

Fonte: ANVISA (2011).

A União Européia, desde 2006, tem dedicado atenção especial para toxinas produzidas por *Fusarium*, e em vista disto o Comitê Científico da Alimentação Humana fixou a ingestão diária tolerável para os tricotecenos, sendo para DON de 1 $\mu\text{g/kg}$ massa corporal. Embora hajam poucas informações disponíveis sobre efeito da toxina HT-2, tem-se que o

efeitos tóxicos das toxinas T-2 e HT-2 não puderam ser distinguidos, definindo a toxicidade *in vitro* da toxina T-2 como parte dos efeitos tóxicos da toxina HT-2. Sendo assim, a ITD temporária combinada é de 0,06 µg/kg massa corporal para as toxinas T-2 e HT-2 (EC n°1881/2006).

3.2.7 Descontaminação de produtos de panificação

A contaminação por fungos em alimentos, mais precisamente, grãos de cereais, é inevitável. A falta de eficácia de pesticidas e fungicidas e conseqüentemente contaminação por micotoxinas vem sendo demonstrada (DORS et al., 2013). As operações unitárias de processamento de alimentos que envolvem tratamento físico ou químico muitas vezes podem ser eficazes para destruição ou redistribuição das micotoxinas do *Fusarium* em matrizes alimentares (VISCONTI e DE GIROLAMO, 2002).

Por exemplo, no processo de moagem do grão de trigo é possível verificar o fracionamento dos tricotecenos, resultando em maior concentração da toxina no farelo e uma concentração inferior com a diminuição da granulometria da farinha (CHARMLEY e PRELUSKY, 1994). Também, Visconti (2004) determinou DON em diferentes frações da moagem do trigo contaminado com níveis de 300 a 1310 µg/kg e espaguete (feito com o mesmo trigo) antes e depois da cocção. Foi constatada a redução de DON com o aumento do grau de moagem e cocção do espaguete, correspondendo a 23%, 63%, 67% e 80% no trigo limpo, sêmola, espaguete e espaguete cozido, respectivamente. Além disso, houve a repartição de DON entre o espaguete cozido seco e na água da cocção.

Samar et al (2001) verificaram redução de 56% da contaminação de DON pela decomposição térmica quando a massa de pão foi fermentada a 50°C. Estes mesmos autores (SAMAR et al., 2007) estudaram o efeito de diferentes temperaturas (169, 205 e 243°C) para a fritura de produtos elaborados com farinha de trigo, verificando redução de 66% de DON a 169°C.

Paccin et al (2010) demonstraram redução média de DON entre a farinha e seus produtos panificados na ordem de 33% para o pão francês 33% e de 58,5% para o pão de Viena.

Estes relatos mostram que os processos para fabricação de alimentos à base de trigo que apresentam resultados satisfatórios para redução da contaminação inicial são

importantes. Em vista disto a Comunidade Européia é a favor do uso de processos de descontaminação física, mas não permite a utilização de processos de descontaminação química, nem a mistura de lotes com o objetivo de diminuir o nível de contaminação abaixo do nível máximo legislado (PACIN et al., 2010; VISCONTI et al, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (FURG), além de contar com o apoio do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos (LACOM-FURG), do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA-FURG) e do Laboratório de Cereais (UPF) para diferentes etapas experimentais.

4.1 Material

4.1.1 Instrumentos

- ✓ Alveo-consistógrafo Chopin;
- ✓ Aparelho falling number 1500;
- ✓ Balança analítica de precisão (FA2104N- BioPrecisa);
- ✓ Banho Ultrasônico Unique - Ultra Cleaner 1600;
- ✓ Bloco digestor (Oxylab);
- ✓ Bomba à vácuo;
- ✓ Centrífuga (Cientec – CT-5000R);
- ✓ Colorímetro manual (Hunterlab User's versão 1.7);
- ✓ Colorímetro Minolta (Croma Meter CR400);
- ✓ Coluna de analítica C₁₈ Gemini 110 Å , 5µm, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, USA);
- ✓ Cromatógrafo líquido Waters (Milford, MA, USA), equipado com bomba quaternária modelo 600, detector por Arranjo de Diodos 2996 e sistema de aquisição de dados software Empower PDA;
- ✓ Destilador (Tecnal – TE-036/1);
- ✓ Determinador de glúten Glutomatic,
- ✓ Digestor (Gerhardt Kjeldatherm);
- ✓ Estufa de secagem com circulação de ar (Quimis® - Q314M222);
- ✓ Farinograma Max Egger;
- ✓ Forno (Malta®);
- ✓ Mesa agitadora orbital (Tecnal TE-420);
- ✓ Micropipetadores automáticos de capacidade variável (20-1000 µL);
- ✓ Mufla (Quimis® – D24);

- ✓ Peneiras - Bertel Indústria Metalúrgica Ltda;
- ✓ pHmetro Quimis® – Hanna Instruments pH200
- ✓ Rolos para laminar (Malta®);
- ✓ Sistema de filtração em membranas acoplado em bomba à vácuo;
- ✓ Sistema de purificação de água Mili-Q Direct-Q UV3® Milipore;
- ✓ Software LC Solution – Shimadzu.

4.1.2 Reagentes, solventes e padrões

- ✓ Acetonitrila (ACN) grau HPLC (Baker® e Vetec);
- ✓ Ácido fórmico P.A (Merck);
- ✓ Água destilada;
- ✓ Água ultra pura purificada em sistema Direct-Q UV3® Milipore (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Benzeno P.A. (Vetec);
- ✓ Éter de petróleo P.A (Vetec);
- ✓ Fenoltaleína P.A. (LabSynth®);
- ✓ Hidróxido de sódio P.A. (Vetec);
- ✓ Membrama filtrante de nylon 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Milipore);
- ✓ Metanol (MeOH) grau HPLC (Baker®);
- ✓ Nitrogênio comprimido (White Martins®);
- ✓ Padrões de DON, toxinas HT-2 e T-2 com pureza $\geq 98\%$ (Sigma Chemical Company);
- ✓ Pancreatina (Sigma®);
- ✓ Pepsina (Sigma®);
- ✓ Peróxido de hidrogênio P.A. (LabSynth®).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo dos padrões de DON, toxinas HT-2 e T-2

Os padrões de DON e toxina T-2 foram provenientes de embalagens de 5 mg de micotoxina (seco) e foram dissolvidos em 100 mL de ACN: Benzeno (95:5), para constituir a

solução estoque que foi distribuída em 10 frascos âmbar, secas sob fluxo de N₂ e armazenados em refrigerador à 5 °C para DON e -5°C para toxina T-2. No momento da determinação, as soluções secas foram ressuspensas em 10 mL de ACN: Benzeno (95:5), para resultar em solução trabalho na concentração de 50 µg.mL⁻¹.

O frasco de padrão de toxina HT-2 continha 1 mg e para sua diluição foram adicionados 50 mL ACN: Benzeno (95:5), distribuídos volumetricamente em 5 frascos âmbar, armazenados à -5°C. Cada frasco seco contendo 200 µg de toxina HT-2 foi ressuspensão em 10 mL para resultar em solução trabalho (20 µg.mL⁻¹).

4.2.2. Estabelecimento das condições cromatográficas para a determinação simultânea de DON, toxinas HT-2 e T-2 por cromatografia líquida de alta eficiência

Foi utilizado um cromatógrafo líquido (Waters, Milford, MA, USA) equipado com detector DAD, coluna C₁₈, sendo o volume de injeção do *loop* de 20 µL e os dados tratados com auxílio do software do equipamento. Os solventes (ACN, MeOH) e a água ultra pura, utilizados na fase móvel, foram preparados separadamente, filtrados à vácuo com filtro de nylon 0,45 µm e desgaseificados em ultrassom por 30 min, à temperatura ambiente.

Foram realizados testes com 5 diferentes composições de fase móvel (Tabela 3). Os padrões de micotoxinas, primeiramente foram injetados individualmente (5 µg.mL⁻¹), observando o tempo de retenção e o espectro de absorção molecular (190 a 400 nm) de cada composto, e posteriormente, em solução, na mesma concentração, para que ocorresse a determinação simultânea dos tricotecenos.

Tabela 3- Composições das fases móvel para separação cromatográfica de DON e toxinas HT-2 e T-2.

	Solventes	Proporção*	Acidificação	Equipamento	Referência
FM₁	MeOH: H ₂ O	25:75	--	HPLC-UV	Thammawong et al. (2010)
FM₂	H ₂ O: MeOH	40:60; 90:10	Ácido fórmico	LC-MS	Sospedra et al. (2010)
FM₃	H ₂ O: ACN	6:94; 30:70; 50:50	--	LC-DAD	Cano-Sancho et al. (2011)
FM₄	H ₂ O: ACN	80:20; 30:70; 10:90	--	UPLC-DAD	Pascale, Panzarini e Visconti (2012)
FM₅	ACN: H ₂ O	70:30	Ácido fórmico	HPLC-DAD	Autor

*(v/v); FM=fase móvel.

Para verificar a eficiência da corrida cromatográfica da fase móvel que originou a melhor separação foram calculados os fatores de retenção (k), fatores de separação (α) e resolução (R_s), conforme demonstrado nas Equações 1, 2 e 3:

$$k = \frac{T_r - T_m}{T_m} \quad (1)$$

Em que:

k = fator de retenção;

T_r = tempo de retenção de um analito, transcorrido desde a injeção até o ponto máximo do pico;

T_m = tempo de retenção de um analito não retido.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Em que:

α = fator de separação;

k_1 e k_2 = são os tempos de retenção ajustados.

$$R_s = 2. \left(\frac{T_{r2} - T_{r1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) \quad (3)$$

Em que:

R_s = resolução

T_{r1} e T_{r2} = tempo de retenção de dois picos adjacentes;

W_{b1} e W_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo.

As curvas analíticas foram construídas injetando a mistura das soluções dos padrões, diluídas em ACN, em concentrações crescentes. Foram utilizados 9 concentrações para DON (0,5; 0,7; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 7 concentrações para toxina HT-2 (1,0; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 6 concentrações para toxina T-2 (3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Todas injetadas três vezes para obtenção dos gráficos área

dos picos *versus* concentrações, equações das curvas analíticas, dadas pelos coeficientes de coeficiente de correlação e determinação, além da linearidade.

Para determinar o limite de detecção (LOD) foram injetadas soluções da mistura dos padrões de DON, toxinas HT-2 e T-2, diluídas em ACN, em concentrações decrescentes até obtenção de uma relação de 3:1 entre o pico do analito e o ruído da linha de base nas proximidades do tempo de retenção das micotoxinas. Para determinar o limite de quantificação (LOQ) foram injetadas as soluções analíticas até que se obtivesse uma relação 10:1 entre o pico do analito e o ruído da linha de base (RIBANI et al., 2004).

4.2.3 Padronização do método para extração de DON e toxinas HT-2 e T-2 de biscoito tipo *Cracker*

As amostras de biscoito tipo *Cracker* comerciais foram previamente moídas, em partículas menores que 0,56 mm e fortificadas com os padrões das micotoxinas, mantidas em repouso, à temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$), por aproximadamente 24 h, para a evaporação completa do solvente. Foram testados 4 métodos de extração diferentes, descritos na literatura, cujos dados estão na Tabela 4.

Tabela 4- Métodos para extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoito tipo *Cracker*

Método	Massa amostra	Solvente	Limpeza	Referência
1	5 g	MeOH: ACN (85:15, v/v)	MgSO ₄ , NaCl e PSA*	Sospedra et al. (2010)
2	5 g	H ₂ O: ACN (3,33:1, v/v)	MgSO ₄ e C ₁₈	Rodriguez-Carrasco et al. (2012)
3	4 g	ACN acidificada 0,1% Ácido fórmico	NaCl e MgSO ₄	Zachariova et al. (2010)
4	5 g	ACN: H ₂ O (84:16, v/v)	Filtração em celulose	Juan, Ritieni e Mañes (2012)

*amina primária secundária

Os métodos foram avaliados pelo ensaio de recuperação, em triplicata, calculado conforme Equação 4, estimando-se também o coeficiente de variação (%CV) dos ensaios de recuperação (Equação 5).

$$R = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

Em que:

R = percentual de recuperação (%)

C₁ = concentração determinada na amostra fortificada;

C₂ = concentração determinada na amostra não fortificada;

C₃ = concentração do padrão utilizado para a fortificação.

$$CV = \left(\frac{s}{x} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Em que:

CV = coeficiente de variação (%);

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

x = média dos resultados.

Também foi realizado um experimento sob planejamento fatorial completo 2³ (Delineamento Composto Central - DCC) com triplicata dos pontos centrais, totalizando 11 experimentos, onde foram avaliadas as variáveis descritas no método de Juan, Ritieni e Mañes (2012) (Tabela 5), tendo como respostas os percentuais de recuperação (Equação 4). Em cada experimento do planejamento, os biscoitos tipo *Cracker* foram previamente fortificados e deixados em repouso por, aproximadamente, 24 h para evaporação do solvente.

Tabela 5- Valores reais e codificados das variáveis do DCC 2³ para recuperação de DON, toxinas HT-2 e T-2

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Volume do solvente (mL)	20	30	40
Proporção de solvente (v/v)	84:16	90:10	96:4
Tempo de extração (min)	30	60	90

4.2.4 Estudo do efeito de matriz

O efeito matriz foi avaliado no biscoito tipo *Cracker*, previamente moídas (< 0,56 mm) e fortificado, em 3 níveis de concentração para cada micotoxina. O efeito determinado utilizando a Equação 6, conforme descrito por KRUYE et al. (2008).

$$EM = \left(\frac{\text{Área do pico 1}}{\text{Área do pico 2}} \right) \cdot 100$$

(6)

Em que:

EM= efeito de matriz (%);

Área do pico 1= sem a matriz (solvente);

Área do pico 2= com a matriz.

Também foram construídas curvas na matriz, em que as amostras foram fortificadas, em triplicata, com 7 níveis para DON (54; 103; 213; 303; 729; 827 e 1600 $\mu\text{g. kg}^{-1}$) e toxina T-2 (606; 1214; 2485; 3540; 5967; 8531 e 9694 $\mu\text{g. kg}^{-1}$) e para toxina HT-2 (378; 726; 1114,76; 1765; 2500; 2917 e 3500 $\mu\text{g. kg}^{-1}$). Com isso, foi possível determinar a faixa de linearidade, os coeficientes de determinação e correlação e os limites de detecção e quantificação do método para cada micotoxina.

O método de extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 também foram testados para farinha de trigo seguindo o mesmo tratamento quando realizada para o biscoito. A curva analítica na matriz foi construída em 7 níveis de concentração para DON (46; 78; 154; 462; 772; 1544 e 3858 $\mu\text{g. kg}^{-1}$).

4.2.5 Levantamento de ocorrência de tricotecenos dos grupos A e B

O levantamento de ocorrência foi realizado em biscoitos tipo *Cracker* amostrados em supermercados da cidade de Rio Grande- RS. Foram selecionadas 3 marcas de diferentes preços (baixo, médio e alto), considerando os lotes disponíveis. A amostragem foi realizada entre os meses de junho e outubro de 2013, totalizando 23 amostras, sendo 6 lotes da marca de menor preço, 8 lotes da marca de preço intermediário e 9 lotes da marca de preço mais elevado. As amostras foram moídas em partículas menores que 0,56 mm e armazenadas à -4°C até o momento da extração das micotoxinas.

O levantamento de ocorrência também foi realizado em farinhas de trigo, composto pela amostragem de marcas de 8 moinhos diferentes, sendo coletado um lote de cada. As amostras laboratoriais foram transferidas para recipientes de plástico e armazenadas à -4°C até o momento da análise conforme a padronização anterior.

4.2.6 Caracterização química de farinha de trigo

A umidade foi determinada em estufa com temperatura de 105° C até peso constante, conforme método n° 925.10 da AOAC (2000). A proteína bruta foi determinada pelo método de micro-kjeldahl n° 920.87 da AOAC (2000), utilizando 6,25 como fator de conversão. A determinação de cinzas foi realizada por método gravimétrico através de incineração das amostras em forno mufla a 560 °C, conforme método n° 923.03 da AOAC (2000).

4.2.7 Avaliação tecnológica da farinha de trigo

A caracterização das farinhas foi realizada no Laboratório de Cereais da Universidade de Passo Fundo (UPF). O número de queda foi determinado em aparelho *Falling Number*, de acordo com o método n°56-81B da AACC (2000), em triplicata e os resultados expressos em segundos. As características viscoelásticas das amostras de farinha foram determinadas em alveógrafo utilizando o método n° 54-30 da AACC (2000), obtendo os parâmetros de tenacidade (P), extensibilidade (L) e energia de deformação da massa ou força geral do glúten (W). A absorção de água das farinhas de trigo e as propriedades de

mistura do sistema farinha/água como tempo de desenvolvimento (TD), estabilidade (E) e índice de tolerância à mistura foram determinadas em farinógrafo, conforme o método n° 54-21, AACC (2000). Os teores quantitativos de glúten (seco, úmido e índice) das farinhas de trigo foram determinados segundo o método n° 38-12 da AACC (2000). As análises de cor pelos parâmetros de cor L, a* e b* utilizou o método de espectrofotometria visível em equipamento Hunterlab User's, com duas repetições para cada amostra.

4.2.8 Elaboração de biscoitos tipo *Cracker*

Os biscoitos foram elaborados no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, conforme formulação da Tabela 6.

Tabela 6- Formulação para elaboração de biscoito tipo *Cracker*.

INGREDIENTES	Esponja (%)	Massa (%)
Farinha de trigo	65	35
Gordura hidrogenada vegetal	7	7
Fermento biológico (<i>S. cerevisiae</i>)	0,4	--
Água	25	--
Sal	--	2
Açúcar	--	4
Bicarbonato de sódio	--	0,6

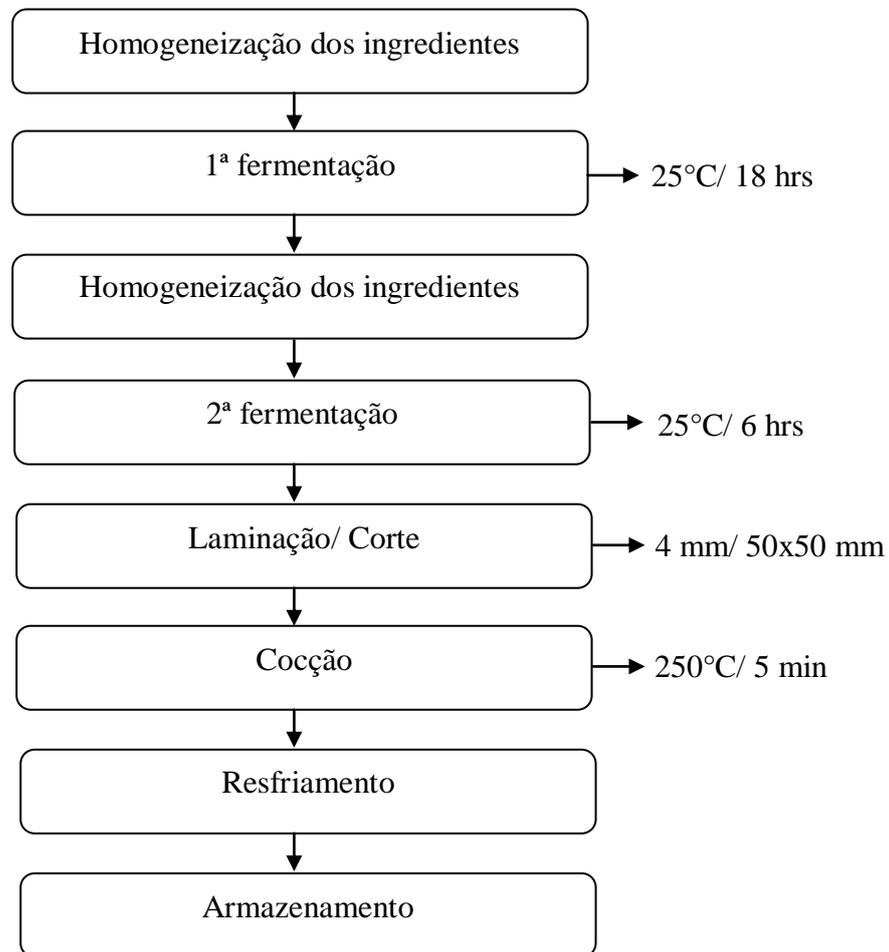
*Baseado na massa total da farinha. Fonte: Maciel, 2006.

Os ingredientes utilizados na elaboração dos biscoitos tipo *Cracker* foram adquiridos no comércio local da cidade de Rio Grande-RS e foram misturados em dois estágios. O primeiro estágio consistiu na elaboração da esponja, com a mistura e homogeneização manual dos ingredientes, seguido de fermentação por 18 horas à 25°C. Em seguida foram acrescentados os ingredientes remanescentes, fermentando-se por mais 6 horas à 25°C.

A massa fermentada foi laminada à 4 mm em rolos laminadores e cortada em moldes característicos do biscoito tipo *Cracker* (50 mm x 50 mm). A cocção foi realizada em forno com ajuste de temperatura de 250°C por 5 minutos, seguido de resfriamento à temperatura ambiente e armazenamento em recipiente plástico.

Na Figura 4 esta um esquema das etapas de elaboração de biscoitos tipo *Cracker*.

Figura 4- Esquema das etapas de elaboração de biscoitos tipo *Cracker*



Fonte: Maciel (2006)

Influência da temperatura e tempo na cor durante a cocção dos biscoitos tipo Cracker

A cor é um dos fatores de grande influência no consumo dos biscoitos tipo *Cracker* e como pode haver variações entre o tempo de cocção e o forno utilizado, foram tomados como padrão a cor de biscoitos comerciais. Assim, os biscoitos foram elaborados (item 4.2.7) e submetidos à temperatura de 150, 200 e 250 °C com amostras retiradas a cada minuto, até que o biscoito apresentasse visivelmente com coloração superior ao padrão ($L= 63,27$; $b^*= 33,29$).

As medições de cor foram realizadas em colorímetro Minolta, onde foram usados 3 biscoitos de cada tratamento, com 5 leituras para cada amostra. Foram determinados o parâmetro L (luminosidade) entre zero (preto) e 100 (branco) e valores de b* (coordenada de cromatocidade) que variam -b (azul) até +b (amarelo).

4.2.9 Redução dos níveis de DON pelo processamento de biscoitos tipo Cracker

Com base nos resultados obtidos do levantamento de ocorrência, que demonstraram apenas contaminação de DON nos biscoitos tipo *Crackers* comerciais, os procedimentos visando à redução dos níveis de contaminação foram aplicados apenas para esta micotoxina.

Redução dos níveis de DON durante a cocção

A farinha utilizada na elaboração dos biscoitos foi previamente contaminada com os padrões das micotoxinas em, aproximadamente, 1500 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de DON, considerando a massa final dos biscoitos.

Os biscoitos foram elaborados conforme descrito no item 4.2.7 e submetidos à temperatura de cocção de 250°C. Amostras de biscoitos foram retiradas a cada minuto, moídas em partícula menores que 0,56 mm e submetidas à extração das micotoxinas usando método padronizado (item 4.2.3).

Redução dos níveis de DON durante a fermentação

Para verificar possível redução dos níveis de DON no processamento do biscoito tipo *Cracker* foram analisadas duas variáveis de elaboração, o tempo da 1ª fermentação e a quantidade de fermento biológico (*S. cerevisae*) utilizados, sob um planejamento fatorial completo DCC 2² com triplicata dos pontos centrais, totalizando 7 experimentos (Tabela 7).

As amostras foram previamente contaminadas com os padrões de DON com 1650 $\mu\text{g. kg}^{-1}$, considerando a massa total após a mistura dos ingredientes. A massa foi fermentada conforme estabelecido no planejamento e após cada ensaio os biscoitos foram laminados, cortados e submetidos à cocção (item 4.2.7).

A extração de DON procedeu conforme metodologia padronizada no item 4.2.3. O percentual de redução dos níveis iniciais de DON foram estimados pela diferença entre os

valores de contaminação e os valores restantes após o processo de elaboração dos biscoitos tipo *Cracker*.

Tabela 7- Valores reais e codificados das variáveis do planejamento DCC 2² referentes ao efeito da fermentação.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Fermento biológico (%)	0,35	0,40	0,45
Tempo de fermentação (h)	16	18	20

Para verificar o efeito da fermentação sem a cocção, os experimentos em que ocorreram maiores reduções de DON foram novamente conduzidos, no entanto, a extração de DON (item 4.2.3) foi realizada na massa fermentada sem a posterior cocção.

4.2.10 Risco da exposição humana à contaminação de DON

Digestibilidade in vitro dos biscoitos tipo Cracker contaminado com DON

As amostras de biscoitos moídas (< 0,56 mm) foram contaminadas com o padrão de DON em 2580 µg. kg⁻¹ com 24 h de antecedência para a evaporação completa do solvente.

A determinação da digestibilidade *in vitro* do biscoito tipo *Cracker* contaminado com DON foi realizada em duas etapas, segundo as adaptações do método descrito por Sgarbieri, (1996) realizadas no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos. Na primeira etapa o biscoito foi submetido a ação hidrolítica da pepsina (1,5 mg.mL⁻¹ em HCl 0,1M) sob agitação em mesa orbital (150 rpm) por 3 h à 37°C, sendo posteriormente centrifugado à 15°C em 5000 rpm por 15 min. O material não digerido (precipitado) foi seco em estufa à 70°C por 3 h e submetido a extração e quantificação de DON remanescente.

Na segunda etapa foi realizada a hidrólise da amostras pela pepsina seguindo-se da adição de pancreatina (22,5 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato pH 7,0) e submetido a agitação orbital (37°C e 150 rpm) por mais 24 h. A mistura foi centrifugada (15°C, 5000 rpm e 15 min), o precipitado seco em estufa à 70°C por 3 h e submetida a determinação de DON.

A extração de DON dos precipitados foi realizada conforme procedimento padronizado descrito no item 5.2.3.

Ingestão diária tolerável

A ingestão diária tolerável (IDT) representa permissão da exposição humana como resultado da ocorrência natural em alimentos, sem que haja danos a saúde do indivíduo. Com os dados de levantamento de ocorrência realizado foi possível estimar quantidade ingerida diariamente de DON pelo consumo de biscoitos do tipo *Cracker*. Para isso, foram levados em consideração os dados fornecidos pelos órgãos governamentais sobre o consumo e produção deste alimento (ANIB, 2013). A estimativa da ingestão diária de DON tendo como fonte de exposição os biscoitos do tipo *Cracker* está descrita na Equação 7 (IBÁÑEZ-VEA, LIZARRAGA e GONZÁLEZ-PEÑAS, 2011; PACIN et al., 2010).

$$ID = \frac{[DON]. \text{Consumo}}{\text{Massa corporal}}$$

(7)

Onde:

ID= ingestão diária

[DON]= concentração média da micotoxina encontrada no levantamento ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)

[Consumo]= consumo diário do alimento (kg.dia^{-1})

Massa corporal= estimado da população (kg)

4.2.11 Tratamento de dados

Os resultados dos planejamentos experimentais foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e as análises reológicas das farinhas de trigo foram submetidas ao teste de Tukey ($n=3$), ambos com 95 % de confiança, utilizando o software *Statistica 5.0*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Condições para determinação simultânea de DON, toxinas HT-2 e T-2 em HPLC-DAD

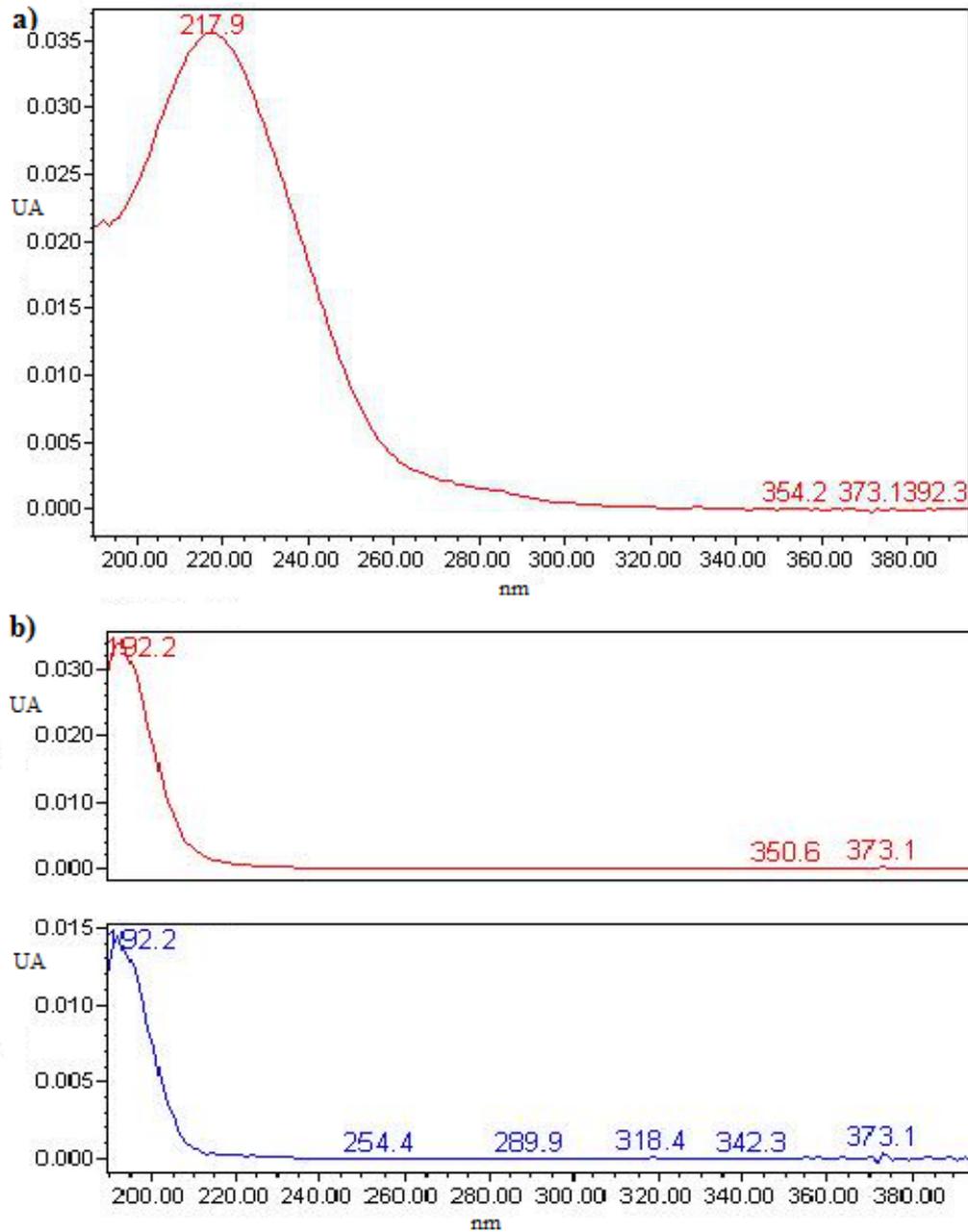
Visando a melhor separação dos tricotecenos em sistema cromatográfico e a obtenção de um tempo de corrida não muito longo para evitar alargamento de bandas dos componentes da mistura, foram testadas diferentes proporções e composições de fase móvel.

Para FM₁ foi possível a identificação de toxina T-2 (3,2 min) e DON (7,2 min), toxina HT-2 não foi visualizada durante a corrida cromatográfica, além disso, toxina T-2 apresentou um tempo de retenção próximo ao tempo morto, o que dificultaria a determinação da toxina nas amostras. Nas FM₂ e FM₃ não foi possível a identificação de nenhuma das micotoxinas em estudos, pois não foram verificados seus picos característicos. Na FM₄, DON (5,3 min) e toxina HT-2 (6,7 min) foram identificados, mas não foi possível visualizar a toxina T-2, além de ocorrer queda na linha de base entre 8-10 min. A FM₅ forneceu melhor separação dos analitos em estudo, DON (5,3 min), toxina HT-2 (6,9 min) e toxina T-2 (9,4 min) com os parâmetros de separação indicados na literatura.

Atribuiu-se a melhor separação nesta última condição à utilização do meio ácido na fase móvel que propiciou rearranjo da polaridade dos analitos e permitiu a diferenciação entre a interação dos componentes da mistura entre a fase estacionária (apolar) e a fase móvel (KUSTER, ALDA e BARCELÓ, 2006). Assim, o DON, a micotoxina mais polar, interage mais com a fase móvel e se distanciou das outras duas micotoxinas menos polares.

Os detectores DAD permitem a coleta de dados de um espectro inteiro, na região do ultravioleta e do visível (90 a 800 nm), em aproximadamente 1 segundo. Assim, dados espectrais para cada pico cromatográfico podem ser coletados e armazenados a medida que aparecem na saída da coluna propiciando identificação mais confiável dos analitos (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2002). Neste caso esta característica é muito importante dada a baixa absorvidade dos tricotecenos na região do UV o que gera a possibilidade de determinar falsos positivos quando se usa os tempos de retenção deles para determiná-los na amostras. Assim, a avaliação do perfil dos espectros de absorção molecular dos tricotecenos (Figura 5) permitiu a definição dos comprimentos de onda mais adequados para a quantificação de DON (217,9 nm) e para as toxinas HT-2 e T-2 (192,2 nm).

Figura 5- Espectros de absorção obtidos no HPLC-DAD para (a) DON, (b) toxina HT-2 e toxina T-2, respectivamente, na faixa de 190 a 400 nm.



UA= unidade de absorvância

Os espectros mostram que as absorções máximas das toxinas HT-2 e T-2 ocorrem no mesmo comprimento de onda e próximos da região do final de emissão da fonte. Portanto, os riscos de detecção de falsos positivos e superestimação de uma toxina sobre a outra são possíveis sempre que a resolução (R_s) entre elas não seja adequada ($R_s < 1,5$).

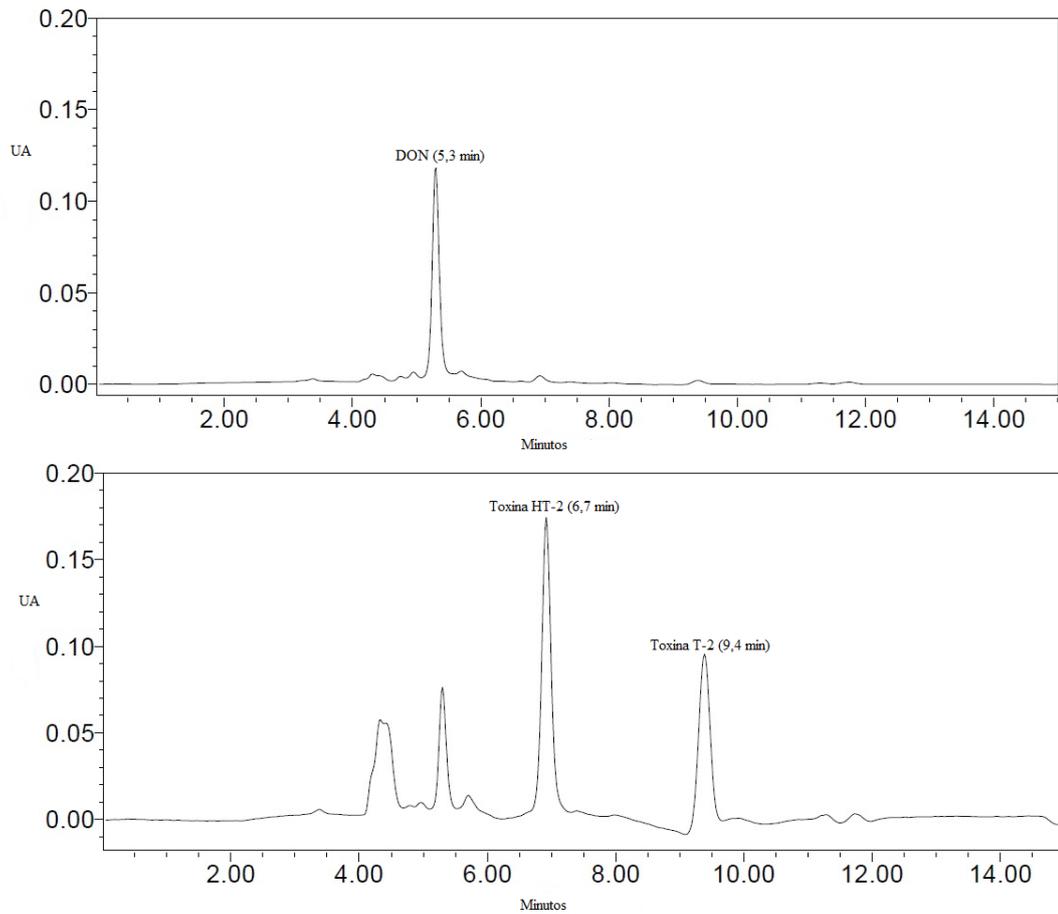
As melhores condições cromatográficas para determinação de DON e toxinas HT-2 e T-2 estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8- Condições cromatográficas para determinação cromatográfica simultânea de DON, toxinas HT-2 e T-2 em HPLC-DAD.

Coluna analítica	Gemini C18 5 μ m 110A (250 x 4,6 mm)
Equipamento	HPLC
Detector	DAD
Fase móvel	70% ACN e 30% H ₂ O acidificada com ácido fórmico pH 3,0
Vazão fase móvel	0.5 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	20 μ L
Comprimento de onda	192,2 nm (HT-2 e T-2) e 217,9 nm (DON)

Nestas condições, o perfil de um cromatograma de separação dos compostos em estudo pode ser observado na Figura 6, para injeção de 5 μ g.mL⁻¹ da mistura dos compostos e comprimento de onda específico para cada micotoxina, num intervalo de corrida cromatográfica de 15 minutos, o que torna promissor para a aplicação em rotina de grande número de determinações.

Figura 6- Cromatograma dos padrões de DON (217,9 nm), toxinas HT-2 e T-2 (192,2 nm)



UA= unidade de absorvância

Os parâmetros T_R , k , α e R_s foram estimados para confirmar a eficiência da separação cromatográfica (Tabela 9).

Tabela 9- Parâmetros cromatográficos obtidos da separação de tricotecenos

Micotoxinas	T_R	k	α	R_s
DON	5,3	0,61		
			1,79	6,40
Toxina HT-2	6,9	1,09		
			1,70	8,33
Toxina T-2	9,4	1,85		

T_R = tempo de retenção; k = fator de retenção; α = fator de separação; R_s = resolução

Quanto mais um componente é retido pela coluna, maior é o seu fator de retenção, neste caso os valores encontrados para o parâmetro k de cada micotoxina são aceitáveis para múltiplos componentes, uma vez que os intervalos recomendáveis entre elas variam entre 0,5 e 20 (HARRIS, 2003).

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico, quanto maior o valor de α , maior é a separação entre os dois componentes, neste caso os valores foram maiores que 1, para todos os pares de compostos, o que é recomendado para separação entre 2 picos adjacentes (COLLINS et al., 2006).

A resolução traduz a eficiência da coluna e da fase móvel, que também se relaciona com o tempo de retenção suficiente para separação, sem contudo promover o alargamento da banda (HARRIS, 2003). Os valores de R_s superiores a 1,5, confirmam a separação completa para picos gaussianos (COLLINS et al., 2006).

Com a separação das micotoxinas concluída, foram construídas as curvas analíticas dos padrões e a estimativa dos indicadores de eficiência da relação quantitativa concentração *versus* sinal (Tabela 10).

Tabela 10- Parâmetros analíticos de DON, toxinas HT-2 e T-2 em HPLC-DAD

	DON	HT-2	T-2
Curva analítica	$y = 34470x - 6794$	$y = 69080x - 32350$	$y = 54925x - 10804$
Linearidade (mg.L⁻¹)	0,5 à 25	1 à 25	3 à 25
Coefficiente de correlação	0,9995	0,9995	0,9975
Coefficiente de determinação	0,9999	0,9999	0,9950
LOD (mg.L⁻¹)	0,1	0,3	0,9
LOQ (mg.L⁻¹)	0,5	1,0	3,0

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação

Os resultados mostram que o procedimento cromatográfico foi adequado para a quantificação das micotoxinas, uma vez que seus indicadores cumprem as recomendações de análise de confiabilidade, conforme a ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. Além disso, as linearidades das curvas mostram a ampla faixa de aplicação (SANCO, 2011).

5.2 Padronização de método de extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoito tipo *Cracker* e farinha de trigo

A recuperação de compostos depende da matriz analisada, do procedimento de extração e da concentração do analito (KURZ, 2007). Os métodos de extração de tricotecenos em biscoitos, encontrados na literatura, utilizam para etapa de “clean up” colunas de C₁₈ ou imunoafinidade, com teores de recuperação aceitáveis, porém a utilização destes materiais eleva o custo da análise, tornando-o inviável em alguns casos.

Por este motivo, os métodos testados para extração das micotoxinas neste estudo foram baseados em publicações atuais que utilizaram matriz à base de trigo com seus respectivos procedimentos para limpeza dos extratos. O método 1 foi proposto por Sospedra et al. (2010), o método 2 por Rodriguez-Carrasco et al. (2012), o método 3 por Zachariova et al. (2010) e o método 4 por Juan, Ritieni e Mañes (2012) (item 4.2.3).

Estes métodos se assemelham, principalmente, na etapa de limpeza da amostra com a utilização de sais e adsorventes, mas se diferenciam na proporção e solvente extrator. As recuperações obtidas empregando-os estão na Tabela 11.

Tabela 11- Recuperações das extrações de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoitos tipo *Cracker* sob diferentes condições

	% RECUPERAÇÃO (± %CV)		
	DON	Toxina HT-2	Toxina T-2
Método 1	71,6 (13,7) ^a	21,3 (2,8) ^b	20,4 (6,9) ^b
Método 2	nd	Nd	nd
Método 3	68,6 (12,9) ^a	52,7 (13,6) ^a	65,3 (12,0) ^a
Método 4	69,9 (11,7) ^a	59,9 (11,0) ^a	48,0 (6,3) ^a

CV= coeficiente de variação; nd: não detectado; Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os métodos 3 e 4 apresentaram as maiores recuperações para todas as micotoxinas e não demonstraram diferença significativa entre si, porém comparativamente, o método 3 envolve mais etapas durante a extração e utiliza um maior número de sais para limpeza, o que não acontece no método 4. Cabe salientar que quanto menor o número de etapas em um método analítico menores são as variabilidades das respostas e teores de resíduos gerados

(RIBANI et al., 2004). Por isso, foi escolhido o método 4 para adequação das condições para a obtenção de maiores recuperações das toxinas na matriz.

A seleção de um solvente de extração adequado é o grande desafio para desenvolvimento de métodos, dada a diversidade química dos tricotecenos, é necessário a combinação de solventes que garantam a recuperação simultânea de tricotecenos com polaridades distintas, como os do grupo A e B (JUAN, RITIENI e MAÑES, 2012). Neste caso, foram escolhidos para adequar o volume e a proporção do solvente extrator e o tempo de extração, em experimentos do planejamento experimental DCC 2³. Os percentuais de recuperação para cada micotoxina e os níveis codificados e valores reais do planejamento, estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12- Valores codificados e reais (em parênteses) do planejamento experimental DCC 2³ para recuperação de DON, toxinas HT-2 e T-2

Ensaio	% Recuperação					
	X ₁	X ₂	X ₃	DON	HT-2	T-2
1	-1 (20)	-1 (84:16)	-1 (30)	48,7	82,5	65,1
2	1 (40)	-1 (84:16)	-1 (30)	nd	56,5	71,9
3	-1 (20)	1 (96:4)	-1 (30)	107,9	65,9	67,6
4	1 (40)	1 (96:4)	-1 (30)	nd	106,9	87,7
5	-1 (20)	-1 (84:16)	1 (90)	69,6	66,2	70,8
6	1 (40)	-1 (84:16)	1 (90)	19	53,2	51,3
7	-1 (20)	1 (96:4)	1 (90)	60,6	102,7	93,0
8	1 (40)	1 (96:4)	1 (90)	nd	65,4	74,7
PC1	0 (30)	0 (90:10)	0 (60)	58,6	110,8	102,5
PC2	0 (30)	0 (90:10)	0 (60)	64,6	118,1	109,3
PC3	0 (30)	0 (90:10)	0 (60)	60	113,9	101,0

X₁: volume do solvente de extração (mL); X₂: proporção de solvente (ACN: H₂O, v/v); X₃: tempo de extração (min).

Considerando os resultados quantificados, podemos observar que para recuperação de DON apenas o ensaio 3 foi eficiente ($\approx 100\%$). Na Tabela 13 estão os efeitos estimados para as três variáveis estudadas, onde os valores em destaque representam os efeitos com nível de significância (p) inferior a 5 % para a recuperação dos tricotecenos.

Ficou demonstrado que a recuperação de DON está altamente relacionada com o volume do solvente extrator. Quando aumentamos o volume de 20 para 40 mL, este afeta negativamente a recuperação em 66%. Para as toxinas HT-2 e T-2, o efeito foi significativo quando a proporção de H₂O foi alterada, sendo as melhores recuperações encontradas quando se tem um aumento na proporção de ACN e redução de água, fato que esta relacionado a menor polaridade delas.

Tabela 13- Efeitos sobre as recuperações de DON, toxina HT-2 e T-2

Micotoxina	Fatores	Efeito (%)	Erro Padrão	<i>p</i>
DON	Média	44,4536	0,943051	0,000450
	X ₁	-66,9525	2,211651	0,001089
	X ₂	7,8025	2,211651	0,071800
	X ₃	-1,8375	2,211651	0,493461
	X ₁ e X ₂	-17,3025	2,211651	0,015949
	X ₁ e X ₃	11,3375	2,211651	0,036011
	X ₂ e X ₃	-21,7775	2,211651	0,010157
Toxina HT-2	Média	85,6809	1,210921	0,000200
	X ₁	-8,8475	2,839862	0,089424
	X ₂	20,6675	2,839862	0,0183362
	X ₃	-6,0875	2,839862	0,165291
	X ₁ e X ₂	10,6625	2,839862	0,064184
	X ₁ e X ₃	-16,3125	2,839862	0,028996
	X ₂ e X ₃	3,7225	2,839862	-8,4964
Toxina T-2	Média	81,3555	1,331981	0,000268
	X ₁	-2,6900	3,123772	0,479915
	X ₂	15,9850	3,123772	0,036132
	X ₃	-0,64	3,123772	0,856624
	X ₁ e X ₂	3,6150	3,123772	0,366706
	X ₁ e X ₃	-16,1500	3,123772	0,035436
	X ₂ e X ₃	6,7950	3,123772	0,161609

X₁: volume do solvente de extração (mL); X₂: proporção do solventes (ACN: H₂O, v/v); X₃: tempo de extração (min)

Dessa forma optamos pelo ensaio 3 que apresentou valores de recuperação aceitáveis para todas as micotoxinas. Este ensaio foi realizado utilizando para extração 20 mL de ACN:H₂O (96:4, v/v) por 30 min. O tempo de extração não foi uma variáveis com efeito significativo neste trabalho, no entanto, alguns autores relatam que a extração de tricotecenos por solvente variam no período de 30 min a 60min (FAZEKAS e TAR, 2001; TANAKA et al., 2000). Visando melhorar os níveis de recuperação dos tricotecenos do grupo A foi conduzido um experimento aumentando o tempo de interação mistura extratora-amostra para 60 min.

Nestas condições houve um acréscimo na recuperação de aproximadamente 16% para toxina HT-2 e de 13% para toxina T-2, e DON manteve-se valores próximos a 100% como anteriormente. Medina et al. (2010) também obtiveram um aumento na recuperação dos tricotecenos do grupo A com o aumento do tempo de extração, chegando a 26% para toxina HT-2. Os resultados de recuperação em três níveis de concentração para DON, toxinas HT-2 e T-2 usando maior tempo de extração estão na Tabela 14.

Tabela 14 - Recuperações de DON, toxina HT-2 e T-2 em biscoitos tipo *Cracker*

Micotoxina	Concentração ($\mu\text{g.k g}^{-1}$)	% Recuperação (\pm % CV)
DON	108	93 (4,8)
	216	101 (2,5)
	1084	103 (5,7)
Toxina HT-2	760	86 (2,5)
	1140	82 (1,4)
	3496	84 (2,8)
Toxina T-2	1268	74 (7,6)
	6350	80 (2,4)
	9500	89 (2,3)

CV= coeficiente de variação

De acordo com a literatura para a confiabilidade de métodos cromatográficos, as recuperações precisam estar entre 70 e 120%, valores encontrados para recuperações destes tricotecenos em biscoito tipo *Cracker* (RIBANI et al., 2004). Além disso, os dados de

recuperação também estão dentro dos critérios aprovados pelo Comité Europeu de Regulamentação, para a aceitação de métodos analíticos e tricotecenos, estabeleceu que acima de $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ as recuperações podem variar entre 70-120% para DON e 60-130% para toxinas HT-2 e T-2 (EC n° 401/2006).

Alguns autores também encontraram recuperações semelhante a este estudo, por exemplo, Pascale, Panzarini e Visconti (2012) obtiveram recuperações de 102 % ($\pm 1,7$) e 96 ($\pm 4,6$) para as toxinas HT-2 e T-2 em trigo, respectivamente. Kassim et al (2011) encontraram valores de 84 % ($\pm 1,6$) para toxina HT-2 e de 79 % ($\pm 3,7$) para T-2 em cevada. Para o grupo B, DON foi avaliado em amostras de farinha de trigo, pão francês e pão Vienna por Pacin et al. (2010) e foram obtidas médias de recuperações de 95%, 90% e 96%, respectivamente.

Alguns autores que realizaram a extração simultânea destes dois grupos de tricotecenos encontraram resultados semelhantes, por exemplo, Juan, Ratieni e Mañes estudaram micotoxinas em trigo, farinha de trigo de pão e obtiveram recuperações entre 90-100% para DON, toxinas HT-2 e T-2. Tanaka et al. (2010) estudaram a extração de diversas micotoxinas em biscoitos, no entanto, sua análise estava baseada na utilização de colunas comerciais para limpeza da amostra e quantificação em LC-MS, com recuperação de 104% para DON, 115% para toxina HT-2 e 113% para toxina T-2. Também com a utilização de colunas comerciais González-Osnaya et al. (2011) obtiveram recuperações de 90% de DON e 94% de T-2 em pão e de 94% de DON e 91% e T-2 em macarrão.

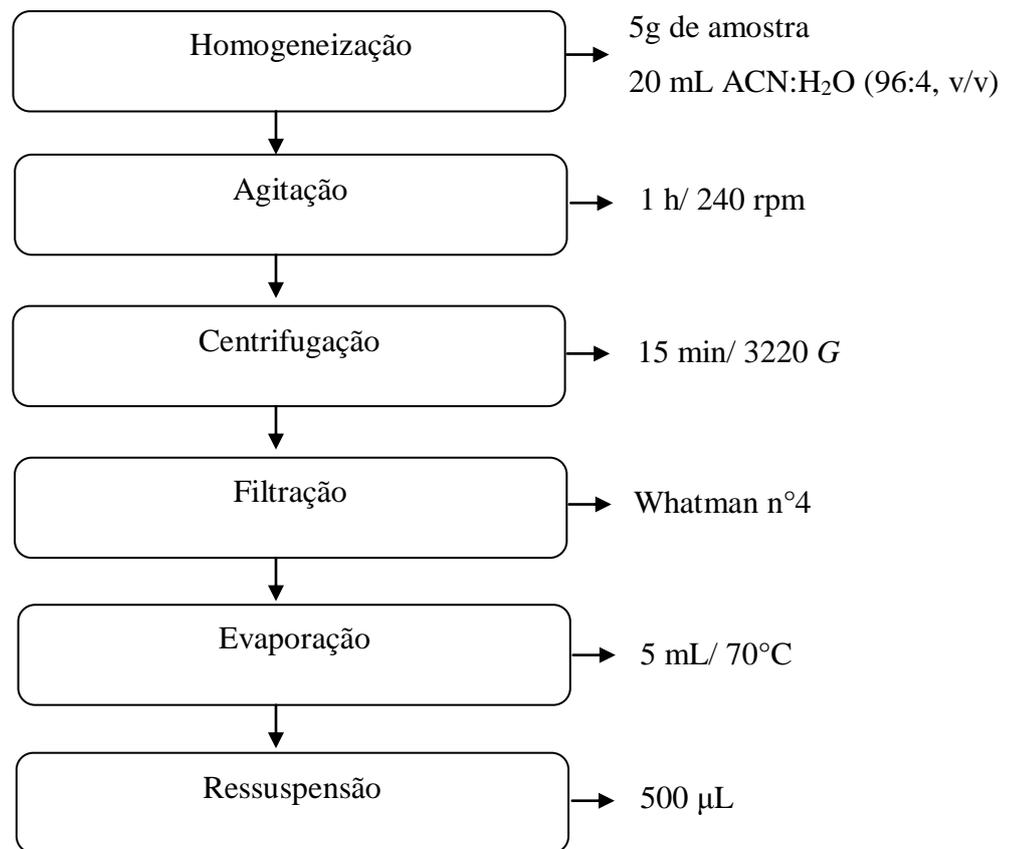
Neste trabalho, as recuperações dos tricotecenos também foram avaliadas em farinha de trigo, utilizando o método modificado, porém foi possível apenas a determinação de DON, devido ao grande número de interferentes nos tempos de retenção das toxinas HT-2 e T-2. Acredita-se que possam ter ocorrido interações entre as micotoxinas e as macromoléculas presente na farinha de trigo como açúcares, proteínas ou lipídios. Conforme Sheuer et al. (2011) a farinha de trigo é composta principalmente de amido (70 a 75%) e proteínas (8 a 16%), e as toxinas HT-2 e T-2 poderiam ter se ligado a estes compostos. Segundo Devegowda e Raju (1998) *apud* Shetty e Jespersen (2006) os oligossacarídeos podem se ligar as micotoxinas, como a ocratoxina A e toxina T-2, o que pode ser o caso deste estudo.

Assim, as recuperações de DON em farinha de trigo para concentrações de 80; 772 e $3858 \mu\text{g.kg}^{-1}$ foram de 97% (15,1); 99% (7,2) e 95% (2,4), respectivamente, valores

aceitáveis para critérios de diferentes convenções analíticas, conforme descrito anteriormente para o mesmo procedimento aplicado a biscoitos.

O método modificado de Juan, Ritieni e Mañes (2012) para extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoitos tipo *Cracker* e de DON em farinha de trigo esta esquematizado na Figura 7.

Figura 7- Etapas do método de extração de DON, toxinas HT-2 e T-2 de biscoitos tipo *Cracker* e farinha de trigo



5.3 Efeito da matriz na separação cromatográfica

O estudo do efeito de matriz (EM) foi necessário porque não é possível garantir que as matrizes utilizadas sejam isentas dos contaminantes (ANVISA, 2003). Os resultados deste efeito para DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoito tipo *Cracker*, calculado conforme descrito no item 5.2.4, estão demonstrados na Tabela 15. Cabe salientar que um valor de EM

de 100 % indica que não há nenhum efeito de matriz absoluto. Se o valor de EM for maior que 100 % indica que ocorre um aumento do sinal do composto, e supressão de sinal se o valor for menor que 100 % (KRUIVE et al., 2008)

Tabela 15- Efeito matriz para biscoitos tipo *Cracker* na determinação de DON, toxinas HT-2 e T-2.

Micotoxina	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Área solvente	Área matriz	%EM
DON	95,62	7768	9128	118
	371,71	29407	33212	113
	964,81	172389	193793	112
Toxina HT-2	378	52984	55188	104
	977,86	311596	315361	101
	1486,99	504267	520099	103
Toxina T-2	191,23	96959	108461	112
	956,02	139004	150035	108
	3820,08	647105	539453	83

EM= efeito matriz

O efeito de matriz foi semelhante em todos os níveis de contaminação da matriz com as micotoxinas, ou seja, promovia um aumento do sinal na ordem de 14% para DON e de 3% e 10% para toxinas HT-2 e T-2. A supressão do sinal ocorreu apenas na concentração mais elevada para toxina T-2, sugerindo possível saturação do detector.

Em estudo com grão de trigo, farinha de trigo e pão, Juan, Ritieni e Mañes (2012) avaliaram um efeito matriz de 89%, 102% e 110% para DON, toxinas HT-2 e T-2, respectivamente. Monaci, De Angelis e Visconti (2011) avaliaram o efeito matriz em pão para DON, toxinas HT-2 e T-2, encontrando valores de 120% para DON quando extraído pelo método de QuEChERS, e quando utilizava colunas comerciais este efeito era insignificante, com pequena supressão dos sinais para toxinas HT-2 e T-2. O efeito de matriz para DON na farinha de trigo suprimiu o sinal do pico, em (1,3%), conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16- Efeito matriz para farinha de trigo na determinação de DON

Concentração ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Área solvente	Área matriz	%EM
76	29407	29378	100
720	90562	88518	98
3858	347986	340253	98

EM= efeito de matriz

Como foi verificado o efeito de matriz, as quantificações dos tricotecenos foram realizadas utilizando as curvas analíticas e os parâmetros analíticos obtidos nos extratos (Tabela 17).

Tabela 17- Parâmetros analíticos para o efeito matriz de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoitos tipo *Cracker*.

	DON	Toxina HT-2	Toxina T-2
Curva matriz	$y = 35126x - 41759$	$y = 69132x - 32249$	$y = 55621x - 22909$
Linearidade ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	54 à 1600	378 à 3500	606 à 9694
Coefficiente de correlação	0,9989	0,9999	0,9999
Coefficiente de determinação	0,9980	0,9990	0,9998
LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	17	126	212
LOQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	54	378	606

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação

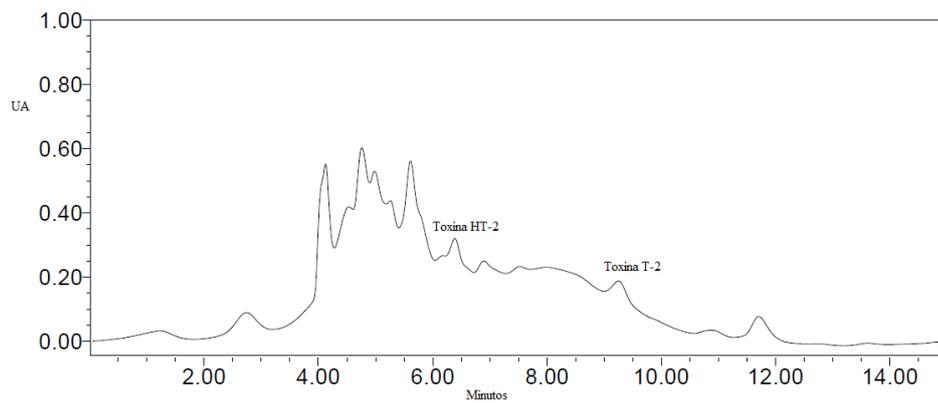
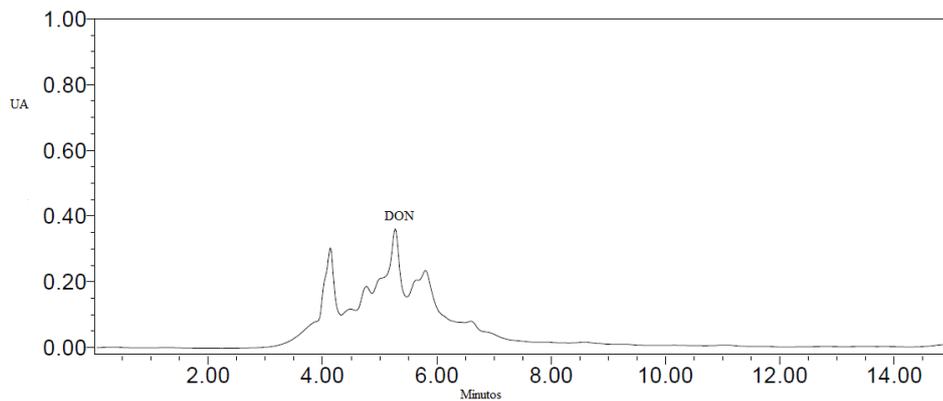
Tabela 18- Parâmetros analíticos para o efeito matriz de DON em farinha trigo

	DON
Curva matriz	$y = 34490x - 7841$
Linearidade ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	46 à 3858
Coefficiente de correlação	0,9998
Coefficiente de determinação	0,9997
LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	15
LOQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	46

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação

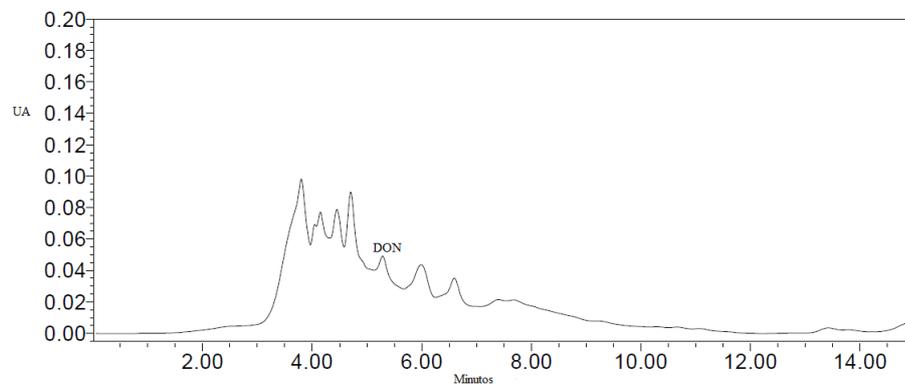
Na Figura 8 estão os cromatogramas de DON, toxinas HT-2 e T-2 na matriz de biscoito tipo *Cracker* e na Figura 9 de DON para farinha de trigo, nos seus respectivos comprimentos de onda.

Figura 8- Cromatograma do efeito matriz em biscoitos tipo *Cracker* para DON (217,9 nm), toxinas HT-2 e T-2 (192,2 nm)



UA= unidade de absorvância

Figura 9- Cromatograma do efeito matriz em farinha de trigo para DON (217,9 nm)



UA= unidade de absorvância

5.4 Ocorrência de DON, toxinas HT-2 e T-2 em amostras de biscoitos tipo *Cracker* e farinha de trigo

Foram coletadas 31 amostras, sendo 23 amostras de biscoitos *Cracker* e 8 amostras de farinha de trigo, e em nenhuma delas foram detectadas as toxinas HT-2 e T-2. No entanto, o DON foi positivo para 18 amostras de biscoitos (23/18) e em 3 amostras de farinha de trigo (8/3). A contaminação de DON detectada na farinha de trigo atendia os limites permitidos na legislação brasileira (Tabela 19).

A legislação brasileira através da RDC nº 11, com o adendo de 2013, prevê níveis de contaminação para DON em biscoitos *Cracker* e farinha de trigo, atualmente de 1750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo que este limite deve ser reduzido para 750 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a partir do ano de 2017. Diante dos resultados podemos verificar que das amostras de biscoito *Cracker* contaminadas, aproximadamente, 22% estariam com níveis de contaminação superiores ao legislado. Fato que se torna ainda mais preocupante, pois a ser considerado os níveis a serem adotados pela legislação de 2017, seriam 83 % das amostras contaminadas acima do valor legislado.

São vários os relatos de ocorrência de tricotecenos em cereais publicados. Pleadin et al. (2013) estudaram a ocorrência de micotoxinas produzidas por *Fusarium* em cereais da Croácia e verificaram que dentre as 51 amostras de trigo, 31 estavam contaminados com DON e 13 com toxina T-2, representando 60% e 25%, respectivamente. Mishra et al. (2013) estudaram a ocorrência de DON em cereais, como trigo milho e cevada na Índia, DON foi detectado em 30% das amostras, sendo que 7% das excederam o limite da Segurança Alimentar e Regulamento Padrão da Índia (1mg.kg^{-1}). Ennouari et al. (2013) verificaram DON em trigo no Marrocos, os resultados mostraram que 9 de 81 amostras no total (11,1%) estavam contaminadas com DON, em níveis variando entre 65 e 1310 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Kassim et al. (2011) avaliaram a incidência de toxinas T-2 e HT-2 em cereais, como trigo, farinha de trigo, arroz, milho, cevada, entre outros, e verificaram que das 75 amostras analisadas, 13 estavam contaminadas com T-2 (35,2-431 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e 25 com HT-2 (21,1- 442,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), sendo que 4 amostras estavam contaminadas com ambas micotoxinas. Ibáñez-Vea, Lizarraga e González-Peñas (2011) verificaram a ocorrência de DON, NIV, toxinas HT-2 e T-2 em 44 amostras de cevada em Navarra, a maior ocorrência foi encontrada para DON em 89% das amostras, em concentrações abaixo do nível máximo permitido.

Também na Espanha González-Osnaya, Soriano e Mañes (2011) avaliaram a ocorrência de DON e toxina T-2 em variedades de macarrão e pão, totalizando 75 amostras, sendo DON detectado em 21 amostras e toxina T-2 em 2, para pães, e em macarrão a ocorrência foi 47 e 7 amostras para DON e toxina T-2, respectivamente.

Tabela 19- Ocorrência de DON em amostras de biscoito tipo *Cracker* e farinha de trigo

Amostras	Concentração de DON ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) (%CV)
B1	1101 (1,4)
B2	934 (0,6)
B3	942 (2,2)
B4	1146 (30,4)
B5	5296 (3,3)*
B6	1521 (8,0)
B7	3598 (4,8)*
B8	1026 (4,1)
B9	554 (2,1)
B10	814 (25,6)
B11	4435 (6,3)*
B12	2986 (6,9)*
B13	1451 (17,0)
B14	770 (16,1)
B15	378 (18,64)
B16	1346 (13,8)
B17	535 (7,6)
B18	1295 (3,5)
F1	134 (10,1)
F2	180 (0,5)
F3	207 (1,2)

*acima da legislação brasileira ($1750 \mu\text{g.kg}^{-1}$). CV= coeficiente de variação. B= biscoito; F= farinha.

O observado repete a tendência dos demais levantamentos que detectaram a maior frequência de contaminação em produtos à base de trigo contaminado com DON. No caso a não detecção de toxinas T-2 e HT-2 neste trabalho pode ser promissora, pois sugere que no trigo e seus derivados comercializados no Brasil não há problemas com este contaminante. No entanto, é importante observar que apesar da influencia da separação cromatográfica e das condições extração destas toxinas os limites de detecção podem ter dificultado a avaliação delas nas amostras de biscoitos.

Tanaka et al. (2010) avaliaram a incidência da micotoxinas produzidas por *Fusarium* em biscoitos, dentre elas, DON, toxinas HT-2 e T-2 em 201 amostras encontradas no comércio do Japão, 98% as amostras estava contaminadas com DON (0,9 a 791 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), 19% com toxina HT-2 (0,6 a 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e 11% com toxina T-2 (0,1 a 6,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

Cabe salientar que estes autores utilizavam como ferramenta de identificação e quantificação um cromatógrafo LC-TOFMS, que são mais sensíveis que HPLC-DAD, utilizado neste trabalho, indicado neste estudo pelos níveis de quantificação das toxinas HT-2 e T-2, já que o autor apresentou limites de quantificação de 2,0 e 0,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para as toxinas HT-2 e T-2, respectivamente. Este fato pode ter ocasionado a não detecção dos contaminantes nos biscoitos tipo *Cracker*.

5.5 Processamento de biscoito tipo *Cracker*

5.5.1 Caracterização química e tecnológica da farinha de trigo

A farinha de trigo, por ser um produto do beneficiamento da matéria-prima alimentar em estado bruto, é considerada um produto alimentício passível de sofrer alterações na sua qualidade nutricional e tecnológica durante a operação de transporte (COSTA et al., 2008). Algumas características químicas e tecnológicas das farinhas são necessárias para destinar seu emprego em processos de panificação. Por isto, antes de iniciar o estudo do efeito do processamento de biscoitos tipo *Cracker* nos níveis de tricotecenos, foram determinadas as características químicas e tecnológicas de dois tipos de farinha de trigo, uma indicada para produção de biscoito (Farinha 1) e outra de uso geral (Farinha 2) que alguns casos também é empregada para este fim.

As determinações mostraram que a Farinha 1 apresentava 12,5% ($\pm 1,7$; CV) de proteína, 0,6% ($\pm 6,0$) de cinzas e 13,9% ($\pm 1,1$) de umidade e a Farinha 2 apresentava teores de 8,5% ($\pm 14,5$) de proteína, 0,95% ($\pm 8,1$) de cinzas e 13,3% ($\pm 0,7$) de umidade.

A umidade de ambas as farinhas de trigo estão dentro da especificação, que sugere o máximo de 15% de umidade (MAPA, 2005). Segundo Faroni et al. (2002), o teor de umidade é o principal fator para aceleração das reações químicas que provoca alterações nas características nutricionais, organolépticas e tecnológicas da farinha. Neste caso, umidades superiores também podem promover a contaminação fúngica das farinhas (VIEIRA, BADIALE-FURLONG e OLIVEIRA, 1999).

Segundo Hamer e Hosney (1998) o conteúdo proteico para farinha panificável deve ser superior a 11,5%. De acordo com Bushuk (1985), o teor de proteína pode variar devido a fatores agrônômicos e ambientais, enquanto que a qualidade da proteína é mais dependente do genótipo do grão de trigo. Gutkoski, Filho e Trombeta (2002) estudaram a correlação entre o teor de proteína em grão em farinhas de trigo do cultivar Rubi e verificaram alta correlação entre a concentração de proteínas e a qualidade tecnológica da farinha. No caso das amostras analisadas, o teor mínimo estabelecido de 11,5% de proteína esta atendido pela Farinha 1.

As cinzas constituem um fator importante de qualidade, pois refletem o grau de extração e devem apresentar-se com baixos teores ($\approx 0,6\%$), pois quanto maior o teor destas, menor a qualidade do produto final para produtos de panificação que necessitam de incorporação de gás (IBGE, 1999; FANAN, 2006). A Farinha 2 apresentou teores de cinzas, em torno de 1,5 vezes maior que a Farinha 1. Altos teores de cinzas indicam inclusão de farelo na farinha, fator indesejável, pois o produto apresentará cor escura além de propiciar qualidade de cocção inferior (COSTA et al. 2008).

Os resultados da análise tecnológica das farinhas de trigo 1 e 2 estão apresentados na Tabela 20.

O tempo de desenvolvimento da massa (TD) indica o tempo de mistura durante a fabricação de produtos de panificação, definindo o percentual de absorção de água (AA), e o índice de tolerância da massa (ITM) fornece informações sobre a maior ou menor tolerância a mistura. A estabilidade (E) indica a resistência que a massa possui ao tratamento mecânico e ao tempo do processo fermentativo (MAPA, 2010). Podemos observar que a Farinha 1, indicada para produção de biscoitos, apresentou maiores valores de AA e E fatores de grande

influência no processo de elaboração de biscoitos tipo *Cracker*. O TD da Farinha 1 foi superior ao encontrado para Farinha 2, explicando a redução do ITM.

Segundo EMBRAPA (1996), para designar a “força da farinha” são considerados valores de TD, E e ITM entre 8,1-10; 10,1-15; maiores que 0,49, respectivamente indicam uma farinha forte, e TD maiores que 10,1 e E maiores que 15,1 indicam farinha muito forte. Assim, conforme resultados de farinografia podemos classificar a Farinha 1 como muito forte e a Farinha 2 como forte. Uma farinha forte é aquela rica em proteínas de ótima qualidade, produz massas bastante consistentes, ideais para elaboração de biscoitos tipo *Cracker*.

Tabela 20- Características tecnológicas de farinhas de trigo indicada para biscoitos (1) para uso geral (2)

PARÂMETROS		FARINHA 1 (±DP)	FARINHA 2 (±DP)
Farinografia	AA(%)	58,8 ^a (±0,25)	56,8 ^b (±0,13)
	TD (min)	11,8 ^a (±0,76)	8,78 ^b (±0,25)
	E (min)	17,2 ^a (±1,20)	11,5 ^b (±0,50)
	ITM (UF)	32,5 ^a (±2,50)	35 ^a (±5,00)
Alveografia	P (mm)	159,5 ^a (±0,50)	113,0 ^b (±2,00)
	L (mm)	49,5 ^a (±0,50)	48,0 ^a (±2,00)
	P/L	3,2 ^a (±0,02)	2,4 ^b (±0,14)
	W (10-4J)	339,5 ^a (±4,50)	216,0 ^b (±1,00)
Glúten	Úmido (%)	26,0 ^a (±0,02)	25,5 ^a (±0,02)
	Seco (%)	9,4 ^a (±0,04)	9,3 ^b (±0,01)
	Index (%)	98,1 ^a (±0,02)	96,9 ^b (±0,03)
Número de Queda		348,0 ^a (±2,00)	331,5 ^b (±2,50)
Cor	L	91,9 ^b (±0,01)	93,1 ^a (±0,02)
	A	0,4 ^b (±0,02)	0,6 ^a (±0,02)
	B	9,5 ^a (±0,10)	7,7 ^b (±0,03)

DP= desvio padrão (n=3); AA= absorção de água; TDM= tempo de desenvolvimento da massa; E= estabilidade; ITM=índice de tolerância a mistura; P=tenacidade; L=extensibilidade; W=força do glúten; IE= índice de elasticidade; Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A alveografia determina a qualidade da farinha, a pressão máxima de ruptura, ou tenacidade (P), é considerado o índice de estabilidade da massa e é positivamente

correlacionada com a capacidade de absorção de água da farinha. A extensibilidade (L) é característica dependente do valor de P e W e demonstra a força geral do glúten (EMBRAPA, 1996). Para a elaboração de um biscoito tipo *Cracker* a farinha de trigo deve apresentar extensibilidade e glúten forte, permitindo que a massa seja estirada sem ruptura conserve neste estado, e baixa tenacidade para facilitar o processo de estampagem e manter o volume adequado durante a cocção.

A Farinha 1 apresenta valores de L superiores ao encontrado para Farinha 2. O valor de P e P/L para Farinha 1 também é maior que da Farinha 2, que promove a formação de uma massa tenaz. No entanto, a força geral do glúten para Farinha está entre 301-400, sendo considerado um glúten forte, indicado para fabricação de *Crackers*, e a Farinha 2 apresenta resultado entre 201-300, considerado um glúten médio (EMBRAPA, 1996).

O glúten é uma proteína amorfa que se encontra em alguns cereais combinada com o amido. Representa 80% das proteínas do trigo e é composta de gliadina e glutenina. Quando úmido, apresenta peso 3 vezes maior que o glúten seco, pois retém grande quantidade de água (SGARBIERRI, 1966; SHEUER et al., 2011). Valores de glúten índice maiores indicam farinhas mais fortes. O glúten é responsável pela elasticidade da massa da farinha o que permite sua fermentação, sendo os valores de glúten superiores para Farinha 1, apresentando posteriormente um volume adequado após a cocção, não deixando muitos resíduos na água.

O número de queda ou Falling Number (NQ) indica a atividade de enzima α -amilase. A α -amilase hidrolisa o amido presente na farinha de trigo, transformando assim a amilose e a amilopectina em dextrinas que serão posteriormente hidrolisadas pela β -amilase, resultando em moléculas de maltose. A maltose é o açúcar utilizado pelos micro-organismos responsáveis pela fermentação (FARONI et al., 2002). A Farinha 1 apresenta valores de NQ superiores aos encontrados para Farinha 2, porém ambos considerados ideais (201-350) (EMBRAPA, 1996). Valores diferentes dos considerados ideais podem provocar a sacarificação das moléculas de amido, tornando a massa pegajosa e úmida, em caso de alta atividade (>350), e massa seca e quebradiça, para baixa atividade (< 201) (PERTEN, 1964).

A cor da farinha está diretamente relacionada com o seu grau de qualidade, quanto mais branco for a farinha de trigo, maior será a sua qualidade (SILVA, 2003). Segundo Gutkoski et al. (2007) a luminosidade da farinha é afetada pelo conteúdo de farelo ou material estranho, conseqüentemente com maiores teores de cinzas. A farinha de trigo pode apresentar

diferentes colorações, dependendo do conteúdo de pigmentos carotenóides e da atividade da enzima lipoxigenase. Os pigmentos carotenóides são responsáveis pela cor amarela da farinha, e a enzima lipoxigenase oxida os pigmentos da farinha (CIACCO e CHANG, 1992). Dessa forma, a Farinha 1 apresenta-se mais escura que a Farinha 2, no entanto, o teor de cinzas da Farinha 1 foi menor que a Farinha 2, demonstrando que a coloração mais acentuada da Farinha 1 pode ser indicativo presença de pigmentos carotenóides.

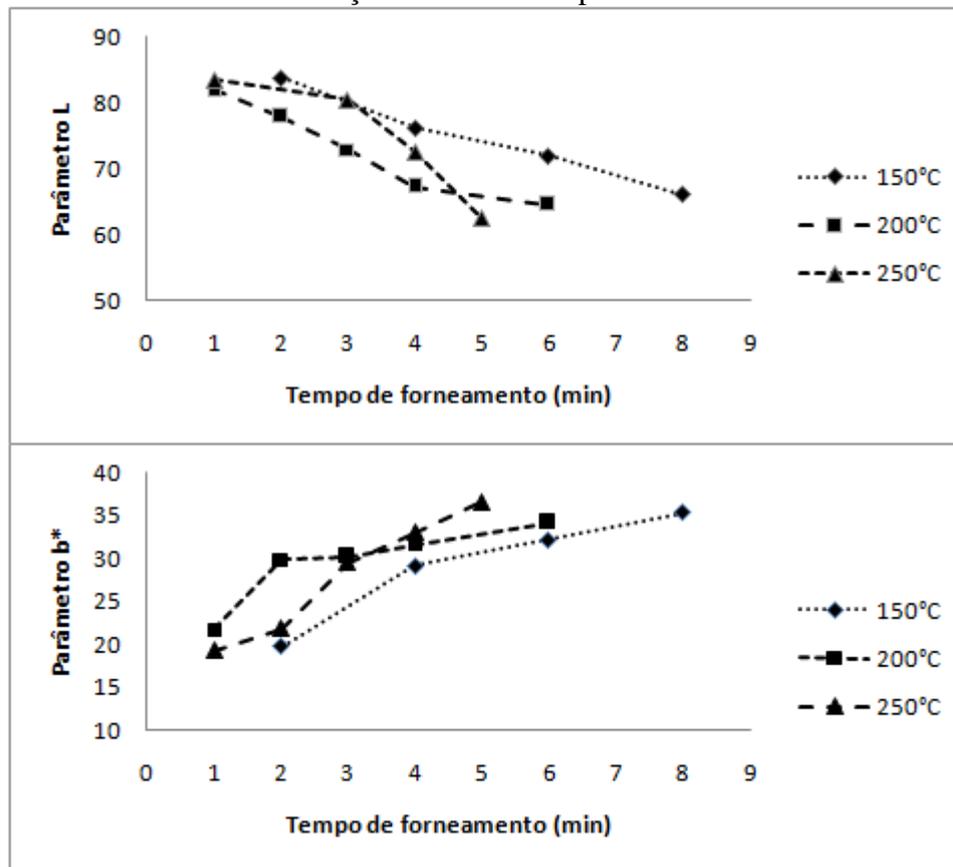
As características de qualidade tecnológica das farinhas nem sempre estão presentes em conjunto, e a este fato se deve a dificuldade na produção de biscoitos, especialmente os do tipo *Cracker*. Neste trabalho foi escolhida a Farinha 1 para elaboração dos biscoitos tipo *Cracker*, visto que suas características atendiam melhor as necessidades deste processo.

5.5.2 Temperatura ideal de cocção

Para verificar a temperatura e os tempos ideais, nas condições de produção neste trabalho, e a cor dos biscoitos tipo *Cracker* ficassem o mais próximo do produto comercializado foram realizadas medições de cor em biscoito comercial, para o controle, e medições no biscoito *Cracker* elaborado em diferentes temperaturas e tempos de cocção.

A amostra controle apresentou valores de $L = 63,27 (\pm 1,03; DP)$ e $b^* = 33,29 (\pm 0,30; DP)$. A Figura 10 apresenta o comportamento dos parâmetros L e b^* na cocção em temperaturas de 150, 200 e 250°C. Foi possível concluir que para se obter uma coloração dos biscoitos semelhante à encontrada nos biscoitos comerciais, poderiam ser empregados para a cocção 250 °C por 5min, 200 °C por 6 min ou 150 °C por 8 min, no forno Malta®.

Figura 10- Parâmetros de cor L e b* durante a cocção em diferentes temperaturas na elaboração de biscoitos tipo *Cracker*



5.6 Efeito das operações de processamento nos níveis iniciais de DON

Como DON foi detectado nas amostras de biscoitos tipo *Cracker* do levantamento em níveis maiores que os permitidos em legislação, realizou-se o estudo de seu processamento visando a identificação e recomendação de parâmetros operacionais que promovessem a redução da contaminação. Para isto, foram avaliadas as operações de fermentação e cocção.

5.6.1 Efeito da fermentação

A redução de DON durante a operação de fermentação dos biscoitos tipo *Cracker* foi estudada segundo um planejamento experimental, DCC 2², tendo como variáveis, o percentual de fermento adicionado e tempo de fermentação da esponja, a partir da

contaminação inicial de 1650 $\mu\text{g. kg}^{-1}$. A Tabela 21 apresenta o percentual de redução de DON, os níveis codificados e valores reais do planejamento.

Tabela 21- Valores codificados e reais (em parênteses) do planejamento experimental DCC 2² para redução de DON

Ensaio	X ₁	X ₂	% Redução
1	-1 (0,35)	-1 (16)	24,1
2	1 (0,45)	-1 (16)	25,6
3	-1 (0,35)	1 (20)	43,4
4	1 (0,45)	1 (20)	39,0
PC1	0 (0,40)	0 (18)	26,8
PC2	0 (0,40)	0 (18)	28,1
PC3	0 (0,40)	0 (18)	28,8

X₁= quantidade de fermento biológico (%); X₂= tempo de fermentação (h).

A Tabela 22 apresenta os efeitos estimados das duas variáveis estudadas, os valores em destaque representam os efeitos com nível de significância (*p*) inferior a 5 % para a degradação de DON.

Tabela 22- Efeitos sobre as recuperações de DON

	Efeito (%)	Erro padrão	<i>P</i>
Média	30,83286	0,395517	0,000165
X ₁	-1,46000	1,046438	0,297693
X₂	16,37000	1,046438	0,004061
X ₁ e X ₂	-2,90000	1,046438	0,109275

X₁= concentração de fermento biológico (%); X₂= tempo de fermentação (h).

O tempo de fermentação foi a variável com resposta significativa (*p*< 0,05) para redução dos níveis de DON, com redução de aproximadamente 16% quando se aumenta o tempo de fermentação de 16 para 20 h, chegando a 43% da concentração inicial.

As modificações da matriz e as novas formas químicas derivadas de DON que são provavelmente formados podem ter afetado a estimativa do efeito da operação (Suman et al. 2013). Por exemplo, Vidal et al. (2014), verificaram aumento no conteúdo de

desoxinivalenol-3-glicosídico (DON-3-G) durante o amassamento, a fermentação e cocção do pão, fato que no caso deste estudo pode ter ocorrido.

A variável concentração pode não ter resultado em efeito significativo devido a pouca variação entre os níveis em estudo, que foram analisados com cautela, pois os biscoitos do tipo *Cracker* tendem a ser altamente sensíveis a variações nos ingredientes e não atende as características comerciais recomendáveis.

Os ensaios 3 e 4 foram novamente avaliados, porém sem que houvesse a cocção dos biscoitos. A massa fermentada apresentou redução dos níveis de contaminação inicial de, aproximadamente, 39%, demonstrando que a fermentação é a variável responsável pela redução de DON.

Neira et al. (1997) encontraram reduções nos níveis de contaminação de DON durante a fermentação da massa de pão entre 22% e 29%. Farahany e Jianp (2011) verificaram a influência do processamento de macarrão nos níveis de DON e foram observadas reduções significativas na ordem de 43% para macarrão amarelo e 67% em macarrão instantâneo. Estes autores acreditam que a presença de sal alcalino pode ter influenciado a redução da toxina nos dois tipos de macarrão ou a uma lixiviação de DON durante a cocção.

Esta redução nos níveis pode também ter ocorrido devido a possibilidade da levedura adsorver as micotoxinas (SCOTT et. al., 1992). A *S. cerevisiae*, utilizada como fermento biológico, possui capacidade adsorvente e é amplamente estudada na redução nos níveis de aflatoxinas e ocratoxinas, pois a fração glucano da parede celular da levedura é capaz de adsorver estas micotoxinas (STANLEY et al. , 1993; SMITH, CHOWDHURY e SWAMY, 2007).

Além dos polissacarídeos, a parede celular da *S. cerevisiae* é composta por proteínas e lipídios que apresentam inúmeros sítios de adsorção acessíveis, incluindo diferentes mecanismos de adsorção, por exemplo, por pontes de hidrogênio, ligação iônica ou interação hidrofóbica (HUWING, 2001).

Alguns trabalhos têm demonstrado que esta levedura é capaz de produzir uma grande variedade de enzimas oxidativas que atuam na estrutura química dos tricotecenos, modificando-os e alterando sua estrutura e, portanto sua toxicidade (PASTER et al, 1992;. MOSS e THRANE, 2004; GARDA et al., 2005). Garda-Buffon, Kupski e Badiale-Furlong (2011) verificaram a redução dos níveis de DON promovida pela fermentação utilizando

Aspergillus oryzae e *Rhizopus oryzae*, esta redução ocorreu pelo aumento da atividade de peroxidases, e Garda-Buffon, Baraj e Badiale-Furlong (2010) verificaram a redução de DON e toxina T-2 pela atividade de α -amilases.

5.6.2 Redução pela cocção

Os biscoitos tipo *Cracker*, previamente contaminados com 1500 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de DON apresentaram redução da contaminação pela temperatura de cocção, durante os 5 min, em média, 24,7%. Sendo este resultado obtido anteriormente pela fermentação.

Resultado semelhante a este estudo foi descrito por Scumadore et al. (2009) onde a concentração de DON não foi afetada pela cocção durante a elaboração dos biscoitos tipo *Cracker*, ao passo que NIV foi reduzido em torno de 28%.

Contrário a estes resultados, estudos (Meca et al.,2013; Monanci, De Angelis e Visconti, 2011) relatam que, além da fermentação, a temperatura reduz a contaminação por DON, pois DON é apenas parcialmente estável em temperaturas maiores que 210°C e intervalos de tempo de 30 min. No caso da produção dos biscoitos tipo *Cracker* o tempo necessário de cocção é de 5 min. Esta redução progressiva de DON depende do tempo de tratamento térmico também foi descrita por Neira et al. (2007), porém o intervalo para a obtenção de produtos de panificação é variável e não permite alterações de descaracterização o alimento.

Neste caso, podemos verificar que a redução de DON pela temperatura é muito dependente do produto final. Assim, a concepção de processos de produtos de panificação podem ajudar a controlar a contaminação de DON nos produtos finais, sugerindo que se encaminhe a farinha para a obtenção de determinados produtos considerando também sua contaminação inicial.

5.7 Riscos da ingestão de biscoitos tipo *Cracker* contaminados com DON

5.7.1 Digestibilidade de biscoito tipo *Cracker* contaminado com DON

A distribuição do contaminante em biscoito durante o processo digestivo foi avaliada para subsidiar a avaliação do risco de ingestão crônica do tricoteceno, para isto foram

utilizados biscoitos tipo *Cracker* previamente contaminados com 2580 $\mu\text{g. kg}^{-1}$ de DON. Os resultados demonstram que ao final da hidrólise com pepsina, 76% (1961 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) permaneceram para formar o bolo alimentar (precipitado) e assim, é possível estimar que 24% (619 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) do DON (sobrenadante), presente no biscoito, poderia ficar disponível para absorção nesta etapa.

Após a ação da pancreatina foi possível verificar que apenas 14% (274 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) do DON remanescente permaneceu no precipitado, estimando-se assim, que 86% (619 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) poderiam ser absorvidos pelo organismo, confirmando o risco real de consumo crônico em caso de contaminação.

Fato mais preocupante em comparação com outras micotoxinas, tais como as aflatoxinas, os tricotecenos não precisam de ativação metabólica para exercer sua atividade biológica (BUSBY e WOGAN, 1981). A natureza lipofílica desta micotoxinas sugere que eles são facilmente absorvidos através pele, intestino e mucosas, e muito pouco dos tricotecenos é excretado intacto (WANNEMACHER e WIENER, 1997).

Os estudos disponíveis sobre o metabolismo dos tricotecenos em gado indicam que grande parte deles são transformadas em formas de-epóxido no rúmen, antes da absorção. Em suínos, a toxina T-2, DON e NIV foram detectados no sangue em menos de meia hora após a exposição oral, sendo sua principal via de excreção a urina e as fezes. Metabólitos de-epóxido também foram detectados após a exposição oral de NIV ou DON em ratos, camundongos, bovinos e ovinos (SWANSON et al., 1988; PRELUSKY et al, 1988).

Os tricotecenos sofrem diversas reações metabólicas em animais, como hidroxilações e de-epoxidação. Toxinas acetiladas são rapidamente metabolizados para a forma de-acetilado (por exemplo, T-2 toxina a HT-2, fusarenona-X (X Fus) para NIV, 3-acetil DON para DON), essa redução do anel epóxido, provavelmente, é realizada por micro-organismos anaeróbios gastrointestinais (ERIKSEN e PETTERSSON., 2004).

Não há estudos disponíveis sobre o metabolismo exato destas toxinas em humanos, mas fica o alerta pelas possíveis formas absorção pelo organismo e os danos que podem causar a saúde.

5.7.2 Risco de exposição humana X Contaminação de DON nos biscoitos tipo Cracker

Segundo Associação Nacional da Indústria de Biscoitos (ANIB, 2013) o consumo *per capita* de biscoitos, em geral, no ano de 2012, foi de 6,2 kg. Se considerarmos que 25% do consumo de biscoitos no Brasil é do tipo *Cracker* ou água e sal (SIMABESP, 2012), podemos estimar um consumo de 1,5 kg *per capita* por ano de biscoitos *Cracker*, representando $4,3 \text{ g.dia}^{-1}$, ou seja, aproximadamente 2 biscoitos *per capita*/dia.

A exposição de DON através da ingestão de biscoitos tipo *Cracker* foi estimada conforme a Equação 7 e a contaminação média de DON em biscoitos de $1310 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ do levantamento obtido neste trabalho, mostra que podem ser ingeridos $0,08 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corporal por dia, considerando o peso corporal de um indivíduo adulto (70 kg). Em comparação com as diretrizes da segurança, este valor está de acordo com o limite sugerido pelo JECFA (2001) de $1,0 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corporal por dia. No entanto, cabe lembrar que a distribuição de consumo avaliada tendo por base dados nacionais não considera que em algumas regiões e faixas etárias da população, poderia representar um consumo diário maior. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de contaminação em níveis crônicos mesmo pelo estimado.

Valores semelhantes ao encontrados neste estudo, foram estimados por GONZÁLEZ-OSNAYA et al. (2011) para o consumo de pães e massas, $0,02$ e $0,06 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corporal por dia, respectivamente.

Se considerarmos os dados de digestibilidade podemos avaliar isto também para os biscoitos do levantamento. Dessa forma, a ingestão diária de DON pelo consumo de biscoitos tipo *Cracker* é $0,08 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de massa corporal por dia, considerando 70 kg, serão ingeridos $5,6 \text{ } \mu\text{g.dia}^{-1}$ de DON através dos biscoitos, sendo que $1,3 \text{ } \mu\text{g}$ de DON serão absorvidos no estômago e $3,7 \text{ } \mu\text{g}$ de DON no duodeno, o restante ($0,6 \text{ } \mu\text{g}$ de DON) seguiria o processo digestório.

No Brasil, ainda não há legislação quanto à dose diária tolerada para nenhuma micotoxina. No entanto, fica o alerta, visto que estes resultados representam apenas para ingestão de biscoitos tipo *Cracker* e sabe-se que a dieta a base de trigo é muito mais ampla, podendo estes valores ser significativamente mais elevados, necessitando estudos de relatos de exposição diária a estas toxinas a diferentes produtos de panificação.

6. CONCLUSÕES

A identificação dos tricotecenos dos grupos A e B foi realizada em HPLC-DAD e sua extração utilizou ACN:H₂O (96:4, v/v) como solvente extrator. As recuperações de DON, toxinas HT-2 e T-2 em biscoito *Cracker* foram, em média, de 99%; 84% e 81% com efeito de matriz com aumento de sinal em 14%; 3% e 10%, respectivamente. O mesmo método aplicado à farinha de trigo permitiu apenas a recuperação de DON (97%) e efeito de matriz de supressão de sinal de 1,3%.

O levantamento de ocorrência demonstrou que das 23 amostras de biscoito *Cracker* analisadas, 18 estavam contaminadas com DON (378-5296 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), sendo 22% acima dos limites máximos tolerados dispostos em legislação. As toxinas T-2 e HT-2 não foram detectadas nas amostras. Em farinhas de trigo, 3 das 8 amostras analisadas apresentam contaminação por DON em níveis entre 136- 207 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Através do estudo do efeito de processamento foi possível verificar que o tempo de fermentação dos biscoitos tipo *Cracker* é fator importante na redução dos níveis de DON, sendo que 20 h da fermentação da esponja são capazes de reduzir 39- 43% da contaminação. No entanto, a cocção (250°C/5 min) não influenciou na redução da contaminação.

Os riscos da ingestão de DON demonstraram que podem ser ingeridos 0,08 μg de DON.kg⁻¹ de peso corporal por dia pelo consumo de biscoitos tipo *Cracker*, sendo a maior parte absorvida no duodeno.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o efeito de processamento de biscoitos tipo *Cracker* para as toxinas HT-2 e T-2;
- Verificar a ocorrência de diferentes contaminantes e estudar diferentes procedimentos que visam à redução dos níveis de contaminação em produtos à base de trigo consumidos pela população brasileira;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. **American Association of Cereal Chemists**. Approved methods. 10 ed., v.2, Saint Paul, 2000.

ABOUZIED, M.M., AZCONA, J.I., BRASELTON, W.E., PESTKA, J.J.. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: Evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, p.672–677, 1991.

ANIB- **Associação nacional das indústrias de biscoitos**. Disponível em <http://www.anib.com.br/dados_estatisticos.asp 2013>. Acesso em 23 de dezembro de 2013.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. . Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 11 dez. 2012.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Biscoitos e bolachas. Resolução-CNNPA N°12, de 1978.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. RDC N°7, de 18 de fevereiro de 2011.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. RDC N°59, de 31 de dezembro de 2013.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. RDC N° 274, de 15 de outubro de 2002.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of analysis international, 17th, Willian Horwitz, 2000. CD-ROM.

ARAUJO, Mauro S. **Tecnologia de panificação**. São Paulo: CNI, p. 129, 1993.

BAHTNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C.; Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**, v.81, p.167-206, 2002.

BETINA, V. Structure-activity relationships among mycotoxins. **Chemico-Biological Interactions**, v. 71, p. 105-146, 1989.

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryotic Cell**, v.3, p.527-535, 2004.

BUSBY, W.F.; WOGAN, G.N.; **Trichothecenes**. In: Mycotoxins and NNitroso Compounds: Environmental Risks. Shank RC (Eds.). CRC, Florida, U.S.A., p. 29-41, 1981

BUSHUK, W. Flour proteins: structure and functionality in dough and bread. **Cereal Foods World**, v.30 (7), p. 447-451, 1985.

CANO-SANCHO, G., VALLE-ALAGRRA, F. M., JIMÉNEZ, M., BURDASPAL, P., LEGARDA, T. M., RAMOS, A. J., et al. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). **Food Control**, v. 22, p.490-495, 2011.

CANO-SANCHO, G.; MARÍN, S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; Exposure assessment of T-2 and H-T2 toxins in Catalonia (Spain). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 511–517, 2012.

CHARMLEY, L.L., PRELUSKY, D.B. Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. **Eagen Press**, St. Paul MN, p. 421-435, 1994.

CHELI, F.; PINOTTI, L.; ROSSI, L.; DELL'ORTO, V.; Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 307-314, 2013.

CIACCO, C.F.; CHANG, Y.K. **Tecnologia de massas alimentícias**. São Paulo: secretaria da industria, comercio, ciência e tecnologia, p.187, 1982.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 456, 2006.

COMMISSION REGULATION (EC) N° 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Jornal Oficial da União Européia**, 23 de fevereiro de 2006.

COMMISSION REGULATION (EC) N°1881/2006. Teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, 19 de Dezembro de 2006.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Informações da safra de trigo. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>>. Acesso em: 20 abril, 2013.

CORRIER, D. E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p.73-87, 1991.

COSTA, M.G.; SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; ANDRADE, A.C.; Qualidade tecnológica de grãos e farinhas de trigo nacionais e importado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28(1), p. 220-225, 2008.

D'MELLO, J. P. F.. Handbook of Plant and Fungal Toxicants. **CRC Press**, Boca Raton, p. 287-301, 1997.

DEVEGOWDA, G.; RAJU, M.V.L.N.; AFZALI, N.; SWAMY, H.V.L.N.; (1998) Mycotoxin picture worldwide: Novel solutions for their counteraction . In.: SHETTY, H.; JESPERSEN, L.; *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 48–55, 2006.

DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. Livraria e Editora Rural. 181p. 2002.

DORS, GINIANI CARLA ; CALDAS, SERGIANE S. ; HACKBART, HELEN C. S.; PRIMEL, Ednei G. ; FAGUNDES, CARLOS A. A. ; BADIALE-FURLONG, ELIANA . Fungicides and the Effects of Mycotoxins on Milling Fractions of Irrigated Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1985–1990, 2013.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. GARIANTINI, M.E.; Qualidade Industrial do Trigo. Passo Fundo-RS, 2ª Ed, 1996.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Sistemas de Produção. ISSN 1809-2985 Versão Eletrônica Set/2009. Disponível em:<
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/> > Acesso em: 16 de setembro de 2012.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Trigo em números. Elaboração: EMBRAPA TRIGO/Socioeconomia – setembro, 2013. Disponível em <http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/economia/2013_09_TRIGO%20em%20numeros.pdf> Acesso em 24 de novembro de 2013.

ENNOUARI, A.; SANCHIS, V.; MARIN, S.; RAHOUTI, M.; ZINEDINE, A.; Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat from Morocco. **Food Control**, v. 32, p. 115-118, 2013.

ERIKSEN, G.S., ALEXANDER, J. , **Fusarium Toxins in Cereals - a Risk Assessment**. Nordic Council of Ministers, Tema Nord, Copenhagen, v. 502, p. 7-44, 1998.

ERIKSEN, G.S.; PETTERSSON, H.; Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.114, p.205–239, 2004.

FANAN, S.; MEDINA, P.F.; LIMA, T.C.; FILHO, J.M. Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerados e de frio. **Revista Brasileira de sementes**, Brasília, v.28, (2), p. 152-158, 2006.

FARAHANY, M.; JINAP, S.; Influence of noodle processing (industrial protocol) on deoxynivalenol. **Food Control**, v.22, p. 1765-1769, 2011.

FARONI, L.R.D.; BERBERT, P.A.; MARTINAZZO, A.P; COELHO, E.M. Qualidade d farinha obtida de grãos de trigo fumigados com dióxido de fosfina. **Revista brasileira engenharia agrícola ambiental**, Campina Grande, v.6 (2), p. 115-119, 2002.

FAZEKAS, B.; TAR, A.; Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 84(5), p. 1453–1459, 2001

FREIRE, F. C. O. **A deterioração fúngica de produtos de panificação no Brasil**. Comunicado técnico 174. ISSN 1679-6535 Fortaleza, CE, 2011.

GARDA, J ; MARTINS-MACEDO, R ; FARIA, R ; BERND, L ; CARLADORS, G ; BADIALE-FURLONG, E ; Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v. 16, p. 423-428, 2005.

GARDA-BUFFON, J. ; BARAJ, E. ; BADIALE-FURLONG, E. ; Effect of the trichothecenes DON and T-2 toxin in malt aminolytic enzymes activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 505-511, 2010.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E.; Degradação de deoxinivalenol (DON) e a atividade da enzima peroxidase durante fermentação submersa *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 31(1), p.198-203, jan.-mar, 2011.

GARIES, M.; CEYNOWA, J. Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. **Lebensm Unters Forsch Journal**, v. 98, p.244-248, 1994.

GONZÁLEZ-OSNAYA, L.; CORTÉS, C.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J.. Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialized in Spain. **Food Chemistry**, v. 124, p.156–161, 2011.

GUTKOSKI, L. C. ; ROSA FILHO, O.; TROMBETTA, C. . Correlação entre o teor de proteínas em grãos de trigo e a qualidade industrial das farinhas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n.1, p. 29-40, 2002.

GUTKOSKI, L. C.; KLEIN, B.; KASTER, B.; GONÇALVES, F. T.; LAMAISON, F. ; SPIER, F.; FRIEDRICH, M. T. . Armazenamento da farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico e seu efeito na produção de pão de forma. **Alimentos e Nutrição (UNESP)**, v. 18, p. 93-100, 2007.

GUTKOSKI, L.C., NODARI, M.L.; JACOBSEN-NETO, R.; Avaliação de farinhas de trigos cultivados no Rio Grande do Sul na produção de biscoitos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (6), p. 91-97, 2003.

HAMER, R.J.; HOSENEY, R. C.. **Interations: the key to cereal quality**. St. Paul, AACC, p. 173, 1998.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, p. 876, 2003.

HEIDTMANN, R.B.; MENDES, G.L., SCAGLIONI, P.T.; FURLONG, E.B.; SOAREA, L.A.S.. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. **African Journal of Food Science**, v. 5, p. 861-869, 2011.

HOHN, T.M.; VAN-MIDDLESWORTH, F.; Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 251, p. 756-761, 1986.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R;. **Princípios de análise instrumental**. 5ed. Porto Alegre: Bookman, p. 836, 2002.

HUSSEIN, S.H., BRASELL, J.M,. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

HUWING, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H.; Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, p. 179–188, 2001.

HWANG, J.H.; LEE, K.G.; Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, v.98, p. 71–75, 2006.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS.; Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC-MS. **Food Control**, v. 22, p. 1428-1434, 2011.

IBGE. **Instituto Brasileiro Geográfico e Estatístico**. Tabela da composição de alimentos. 5 ed. Rio de Janeiro, p. 137, 1999.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JECFA. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. **Deoxynivalenol, HT-2 and T-2 toxin**. WHO/FAO Food and Nutrition Paper 74, pp. 419–680, 2001.

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

KASSIM, N.; KIM, K.; MTENGA, A.B.; SONG, J.E.; LIU, Q.; SHIM, W.B.; CHUNG, D.H..A preliminary study of T-2 and HT-2 toxins in cereals sold in traditional market in South Korea. **Food Control**, v.22 p.1408-1412, 2011.

KIESSLING, K.H.. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v.59 n.2, p.327-338, 1986.

KIMURA, M.; TAKAHASHI-ANDO, N.; NISHIUCHI, T.; OHSATO, S.; TOKAI, T.; OCHIAI, H.; FIJIMURA, M.; KUDO, T.; HAMAMOTO, H.; YAMAGUCHI, I.; Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p.117–123, 2006.

KOPPEN, R., KOCH, M., SIEGEL, D., MERKEL, S., MAUL, R., NEHLS, I.. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86 (6), p.1595-1612, 2010.

KRSKA, R., MOLINELLI, A.. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 145-148, 2007.

KRSKA, R.; BAUMGARTNER, S.; JOSEPHS, R.; The state-of-the-art in the analysis of type-A and –B trichothecene mycotoxins in cereals. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 99, p.371-385, 2001.

KRUBE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I.; Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal. Chromatography A**, v.1187, p. 58–66, 2008.

KURZ, M.H.S. **Estudo de método empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para determinação de resíduos de pesticidas em água e degradação a campo.** Tese (Doutorado em Química)- UFSM, Santa Maria, RS. p.161, 2007.

KUSHIRO, M.; Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p.2127-2145, 2008.

KUSTER, M.; ALDA, M.; BARCELÓ, D.; Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry reviews**, v.25, p. 900-916, 2006.

LAJOI, M.S.; THOMAZ, M.C. Sodium bicarbonate particle size and neutralization in sponge-dough systems. **Cereal foods world**, v.42 (10), p.797-799, 1994.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T.; Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, food stuffs and cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p.103-121, 1998.

LIMA, D.P. **Estudo comparativo do efeito da adição de proteases fúngica e bacteriana nas características reológicas da massa e na qualidade do biscoito tipo Cracker.** Tese (de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p.135, 1998.

LLORENS, A.; MATEO, R.; HINOJO, M. J.; VALLE-ALGARRA, F. M.; JIMENEZ, M. Influence of environmental factor on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.43-54, 2004.

MACIEL, L. M. B.; **Utilização da farinha de linhaça (linum usitatissimum L.) no processamento de biscoitos tipo “cracker”: características físico-químicas, nutricionais e sensoriais.** Tese de mestrado, Universidade Federal do Ceará. p.114, 2006.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** . Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade da Farinha de Trigo. Instrução Normativa nº8 de 02 de junho de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2005.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico do Trigo.** Instrução Normativa Nº38 de 30 de novembro de 2010.

MECA, G.; ZHOU, T.; RITIENI, A.; MAÑES, J.; Ciclohexadepipeptide beauvericin degradation by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food and Chemical Toxicology**, v.59, p.334–338, 2013.

MEDINA, A.; VALLE-ALGARRAB, M.; JIMÉNEZ, M.; MAGANA, N.; Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media. **Journal of Chromatography B**, v. 878 p.2145–2149, 2010.

MELLO, M.P.; LIMA, D.P; PINHEIRO, P.R; Modelos em programação matemática para o processamento do biscoito tipo *Cracker*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24 (3), p. 363-368, 2004.

MELLO, M.P.; LIMA, D.P; PINHEIRO, P.R; Modelos em programação matemática para o processamento do biscoito tipo *Cracker*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24 (3), p. 363-368, 2004.

MISHRA, S.; ANSARI, K.M.; DWIVEDI, P.D.; PANDEY, H.P.; DAS, M.; Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. **Food Control**, v. 30, p. 549-555, 2013.

MONANCI, L., ANGELIS, E. D., VISCONTI, A.. Determination of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins in a bread model food by liquid chromatography–high resolution-Orbitrap-mass spectrometry equipped with a high-energy collision dissociation cell. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.8646– 8654, 2011.

MONTES, R.; SEGARRA, R.; CASTILLO, M.A.. Trichothecenes in breakfast cereals from the Spanish retail market. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, p.38–44, 2012.

MORETTO, E.; FETT, R. **Processamento e análise de biscoitos**. São Paulo: Varela, 1999.

MOSS, M. O.; THRANE, U. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 23-28, 2004.

NEIRA, M.S. PACIN, A.M., MARTINEZ, E.J., MOLTÓ, G., RESNIK, S.L. The effects bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 21-25, 1997.

NUTTONSON, M. Y. Wheat-climatic relationships and the use of phenology in ascertaining the thermal and photo-thermal requirements of wheat. Washington: **American Institute of Crop Ecology**, 1955.

of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1595-1612, 2010.

OLIVEIRA, M.S.; PRADO, G.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T.; Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista Adolfo Lutz, São Paulo**, v.61 (1), p. 1-6, 2002.

PACIN, A., BOVIER, C., CANO, G., TAGLIERI, D., PEZZANI, C.H.. Effect of the Bread making process on wheat flour contaminated by the deoxynivalenol and exposure estimate. **Food Control**, v.21, p.492–495, 2010.

PACIN, A.M., RESNICK, S.L., NEIRA, M.S., MOLTO, G., MARTINEZ, E.; Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v.14, 327–331, 1997.

PASCALE, M.; PANZARINI, G.; VISCONTI, A.. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Talanta**, v. 89, p.231-236, 2012.

- PASTER, N.; MENASHEROV, M.; LACEY, J.; FANELLI, C.; Synergism between methods for inhibiting the spoilage of damp maize during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 2(2), p. 163-170, 1992.
- PLEADIN, J.; VAHCIC, N.; PERSI, N.; SEVELJ, D.; MARKOV, K.; FRECE, J.; *Fusarium* mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian Fields. *Food Control*, v. 32, p. 49-54, 2013.
- POSSAMAI, T.N. **Elaboração do pão de mel com fibra alimentar proveniente de diferentes grãos, sua caracterização físico-química, microbiológica e sensorial.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
- PRELUSKY, D. B.; ROTTER, B. A.; ROTTER, R. G.. **Compounds other than Aflatoxin. Toxicology of Mycotoxins**, São Paulo, p.359-404, 1994.
- PRONK, M. E. J., SCHOTHORST, R. C., & VAN EGMINOND, H. P.. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: A review of six trichothecenes. **RIVM** (Report 388802024), p.75, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27 (5), p.771-780, 2004.
- RICHARD, J. J. Some major mycotoxins and their mycotoxicose :An overview. *International Journal of Food Microbiology*, v.119, p. 3-10, 2007.
- RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, n.1/2, p.36-53, 2007.
- RODRIGUEZ-CARRASCO, Y.; BERRADA, H.; FONT, G.; MAÑES, J.; Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 28– 40, 2012.
- ROSI, P.; BORSARI, A.; LASI, G.; LODI, S.; GALANTI, A.; FAVA, A.; GIROTTI, S.; FERRI, E. Aflatoxin M₁ in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. **International Dairy Journal**, v.17, p.429-435, 2007.
- SAMAR, M. M.; Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. **Food control**, v. 18, p.1295-1299, 2007.
- SAMAR, M.M.; Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) I Argentinean bread processing technology. **Food Additives and Contaminantes**, v.18 (11), p.1004-1010, 2001.
- SANCO. **European Comission: Method validation and quality control prdedures for pesticide residues analysis in food and feed**, 12495. Sweden, 2011.

SAVARD, M.E.. Deoxynivalenol fatty acid and glucoside conjugates. **Journal Agricultural**, 39, p. 570–574. 1991.

SCHEUER, P.M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M.Z.; LIMBERGER, V.M. Trigo: Características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13 (2), p.211-222, 2011.

SCHOTHORST, R. C.; VAN EGMOND, H. P. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. **Toxicology Letters**, 153, 133–143. 2004.

SCOTT, P. M. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains: Mycotoxins, Fungi and Quality in Dying and Storage. **Cereal Grain. Amsterdam**, p.529-572, 1997.

SCOTT, P.M.; Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. **Mycotoxin Research**, v.8, P. 58-66, 1992.

SCUDAMORE, K.; HAZEL, C.; 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**, v. 26 (8), p.1191-1198, 2009.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos Proteicos: Propriedades, coesadações, modificações**. São Paulo, SP: Livraria Varela, P.517, 1996.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives and Contamination**. v.25, n.2, p.146–151, 2008.

SHEUER, P.M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M.Z.; LIMBERGER, V.M.; Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13 (2) n.2, p.211-222, 2011.

SILVA, R.C.. **Qualidade tecnológica e estabilidade oxidativa de farinha de trigo e fubá irradiados**. Dissertação de mestrado em ciência e tecnologia de alimentos. Escola superior de agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, SP, 2003.

SIMABESP. **Sindicato da indústria de massas alimentícias e biscoitos no Estado de São Paulo**. Disponível em < <http://www.simabesp.org.br/site/default.asp>>. Acesso em 02 de novembro de 2012.

SMITH, T.K.; CHOWDHURY, S.R.; SWAMY, H.V.L.N.; Comparative aspects of *Fusarium* mycotoxicoses in broiler chickens, laying hens and turkeys and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent: Mycosorb (2007). Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/comparative-aspects-fusarium-mycotoxicoses-t392/p0.htm>>. Acesso em 10 de maio de 2013.

SNYDER, A.P.. Qualitative, quantitative and technological aspects of the tricothecene mycotoxins. **Journal of food Protection**, v.49 (7), p. 544-569, 1986.

SOSPEDRA, I.; BLESÁ, J.; SORIANO, J.M.; MAÑES, J.; Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1217 p.1437–1440. 2010.

SPANJER, M., RENSEN, P., SCHOLTEN, J.. **Multi-mycotoxin analysis by LC-MS/ MS in a single sample extract**. XIth International IUPAC. Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Maryland USA. p. 117–124, 2006.

STANLEY, V. G.; OJO, R.; WOLDENSENBET, S.; HUTCHINSON, D.H.; The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxins in broiler chicks. **Poultry Science**, v.72, p.1867–1872, 1993.

SUMAN, M.; BERGAMINI, E.; CATELLANI, D.; MANZITTI, A.. Development and validation of a liquid chromatography/linear ion trap mass spectrometry method for the quantitative determination of deoxynivalenol-3-glucoside in processed cereal-derived products. **Food Chemistry**, v.136, p.1568–1576, 2013.

SWANSON, S.P.; HELASZEK, C.; BUCK, W.B.; ROOD, J.H.D.; HASCHEK, W.M.; The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, p.823-829, 1988.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.141-158, 1998.

TANAKA, H.; KONISHI, Y.S.; TAKINNO, M.; TANAKA, T.; TORIBA, A.; HAYAKAWA, K.. A survey of the occurrence of *Fusarium* mycotoxins in biscuits in Japan by using LC/MS. **Journal of Health Science**, v.56 (2), p.188-194, 2010.

TANAKA, T. **Analysis of Mycotoxins**. Textbook for country focused training course: Mycotoxins Analysis for federative republic of Brazil. Hyogo International Centre Japan Interantional Cooperation Agency: F. Y, p.40, 2001

TANAKA, T., YONEDA, A., INOUE, S., SUGIURA, Y., UENO, Y.. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v.882, p. 23–28, 2000.

THAMMAWONG, M.; OKABE, M.; KAWASAKI, T.; NAKAGAWA, H.; NAGASHIMA, H.; OKADOME, H.; NAKAJIMA, T.; KUSHIRO, M. Distribution of Deoxynivalenol and Nivalenol in Milling Fractions from *Fusarium*- Infected Japanese Wheat Cultivars. **Journal of Food Protection**, v. 73 (10), p. 1817–1823, 2010.

UENO, Y.; ISHII, K. Chemical and biological properties of tricothecens. In: J. Lacey (Ed.), *Trichothecene and other Mycotosins*. **John Wiley and Sons**, p. 307-316, 1985.

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**, v.40, p. 234-242, 2014.

VIEIRA, A. P.; BARDIALE-FURLONG; OLIVEIRA, M. L. M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19 (2), p. 221-225, 1999.

VISCONTI, A.; DE GIROLAMO, A., 2002. ***Fusarium* mycotoxins in cereals: storage, processing and decontamination.** In SHOLTEN et al., (Eds), *Food Safety of Cereals: A Chain-Wide Approach to Reduce Fusarium mycotoxins.* European Commission, Brussels, pp. 29-40.

VISCONTI, A.; Problem associated with *Fusarium* mycotoxins in cereals. **Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences**, v. 9, p.39-55, 2001.

VISCONTI, A.; Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. **Toxicology Letters**, v.153, p.181-189, 2004.

VITTI, P.; GARCIA, E.E.C.; OLIVEIRA, L.M. **Tecnologia de biscoitos.** Manual Técnico nº1,86p. Campinas: ITAL, 1988.

WADE, P. *Biscuits, cookies and crackers, the principles of the craft.* Elsevier Applied Science, p.176. London, 1988.

WANNEMACHER, R.W.; WIENER, S.; Trichothecene mycotoxins. In: *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.* Sidell FR, Takafugi ET, Franz DR (Eds.). TMM Publications, Washington, U.S.A., p. 655-676, 1997.

ZACHARIOSOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKAA, M.; POUSTKA, J.; GODULAB, M.; HAJŠLOVA, J.; Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p.51–61, 2010.