

Área: Ciência dos Alimentos

DESOXINIVALENOL EM TRIGO: EFEITO DOS PROCESSOS DE LIMPEZA E MOAGEM NA DISTRIBUIÇÃO DA MICOTOXINA NAS RESPECTIVAS FRAÇÕES OBTIDAS

Darlina Mello Souza*, **Jaqueline Fabiane Reichert**, **Rudinei Boss**, **Vanessa Klein**,
Cesar Augusto Pierozan, **Fábio Garske da Fonseca**, **Cassiano Vasconcelos dos Santos**,
Ionara Regina Pizzutti

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química, Santa Maria, RS

**E-mail: darliana.ms@gmail.com*

RESUMO – A giberela é uma doença fúngica que representa grande preocupação por causar perda de produtividade em lavouras de trigo e por expor os grãos a contaminações por micotoxinas, com a prevalência da Desoxinivalenol (DON). O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição da micotoxina DON em grãos de trigo em suas frações obtidas pelo processo de moagem. A primeira etapa foi a avaliação do processo de limpeza dos grãos. Posteriormente, os grãos foram processados (moagem), avaliando-se suas respectivas frações. As amostras avaliadas foram oriundas de distintos lotes de trigo contaminados naturalmente (80 amostras). O procedimento de amostragem consistiu na coletadas em um período ao longo de 10 meses, em intervalos de 15 dias e analisadas por LC-MS/MS, empregando-se extração por QuEChERS modificado. Os resultados obtidos mostraram que a etapa de limpeza contribuiu para média de redução da micotoxina DON em aproximadamente 27,3%. Nos subprodutos derivados da moagem foi verificada redistribuição de DON, com redução das concentrações na farinha branca e incremento na fração farelo, quando comparados a concentração inicial no grão, evidenciando que tal processo não é eficaz para eliminação de micotoxinas.

Palavras-chave: Grãos de Trigo; Farelo; Farinha; Micotoxinas; Desoxinivalenol.

1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Fusarium* estão entre os patógenos mais destrutivos de cereais em todo o mundo, sendo que mais de uma espécie é frequentemente encontrada. Várias espécies deste gênero são agentes infecciosos, conhecidos por causar uma série de doenças em cereais (IMATHIU et al., 2013; SHOLTEN et al., 2002), sendo a giberela, uma das doenças mais importantes em trigo (RAN et al., 2013).

Na última década, a giberela se tornou uma das mais graves doenças fúngicas devido as mudanças climáticas e adoção de práticas agrícolas modernas (plantio direto), causando perdas econômicas enormes em todo o mundo (RAN et al., 2013). Isto resulta na diminuição da produtividade e redução da qualidade de grãos

(EDWARDS; GODLEY, 2010). Pelo efeito da doença, os grãos passam a ter tamanho reduzido, cor normalmente rosada, aspecto danificado e chocho (GUTERRES, 2013). No entanto, o principal problema envolvendo a giberela está nos danos indiretos, oriundos do acúmulo de micotoxinas, que não só desvalorizam o grão junto ao mercado, mas os tornam impróprios para o consumo, por colocarem em risco a saúde humana e animal (CALVO, 2005; GUTERRES, 2013; KLAHR et al., 2006). Dentre as micotoxinas produzidas, a desoxinivalenol (DON) é a de maior relevância, por ser amplamente distribuída e encontrada em altos níveis (GUTERRES, 2013).

A presença de micotoxinas nos alimentos tem uma enorme importância para a saúde pública, devido aos efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos, teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos. Também podem estar associadas a disfunções hormonais graves, além do aumento da suscetibilidade a doenças e a redução da expectativa de vida. São capazes de provocar efeitos tanto agudos, quanto crônicos no homem e nos animais, assim como desordem dos sistemas nervoso central, cardiovascular, pulmonar e trato intestinal, podendo levar a óbito (RAI; VARMA, 2010; VRIES, 1997).

A preocupação com a segurança na produção de alimentos tem aumentado (BINDER et al., 2007). Minimizar a contaminação por micotoxinas começa com a qualidade da matéria-prima (SHOLTEN et al., 2002). O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição de micotoxinas produzidas por *Fusarium* em grãos de trigo. A primeira etapa foi a avaliação do processo de limpeza dos grãos e após a moagem dos grãos foram avaliadas as suas respectivas frações de moagem, oriundos de distintos lotes de trigo contaminados naturalmente (80 amostras), as quais a concentração inicial foi também determinada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) acoplado ao Espectrômetro de Massa (Xevo TQS, Waters), com ionização por eletronebulização no modo positivo (ESI⁺). A separação analítica foi realizada utilizando coluna cromatográfica C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm), mantida a temperatura constante de 60 °C. A fase móvel foi composta de acetonitrila (contendo ácido fórmico a 0,1%) e água (contendo ácido fórmico a 0,1%). Com modo de gradiente de eluição, e vazão constante de 0,45 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 2 µL e o tempo de retenção do DON foi de 1,38 minutos.

Em colaboração com um moinho de beneficiamento de farinha de trigo, localizado na região noroeste do Rio Grande do Sul, efetuaram-se coletas quinzenais, no período de 10 meses, de amostras de grãos de trigo antes da limpeza prévia dos grãos, após a etapa de limpeza, e após o processamento dos grãos nas frações farinha e farelo obtidos através da moagem destes grãos, totalizando 80 amostras. Foram coletados 2 kg de cada amostra, representativa de lote inferior a uma tonelada.

As amostras foram homogeneizadas com água, a fim de obter uma suspensão homogênea (*slurry*). A proporção entre a amostra e a água para a preparação da suspensão foi, respectivamente, de 1:1,5. Pesaram-se 12,5 g de *slurry*, seguida da adição de 10 mL de acetonitrila (contendo 1% de ácido acético) e do padrão interno do procedimento (P.I.P.) (quinalfós), na concentração de 12,5 µg L⁻¹. Após fechar os tubos, os mesmos foram colocados na mesa agitadora por cerca de 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se 5 g de MgSO₄ anidro e repetiu-se a agitação novamente por um minuto. Posteriormente, efetuou-se uma etapa de centrifugação por 3 minutos, a 4000 rpm. Por fim, transferiu-se 500 µL deste extrato para o vial e adicionou-se 500 µL de metanol contendo o

padrão interno do instrumento (P.I.I.) (propoxur), na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Seguiu-se diretamente para análise por UPLC-MS/MS. O método empregado foi previamente desenvolvido e validado, estando em conformidade com os parâmetros estabelecidos de confiabilidade metrológica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A micotoxina DON foi determinada em todas as amostras de grãos de trigo antes de qualquer tipo de procedimento (limpeza ou processo de moagem). As concentrações determinadas variaram de 165 a 990 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Concentração da micotoxina DON em grãos de trigo não processados, após etapa de limpeza e em suas respectivas frações obtidas pelo processo de moagem (farinha de trigo e farelo).

Amostra	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	Grãos de trigo sem etapa de limpeza	Grãos de trigo após etapa de limpeza	Farelo de trigo	Farinha de trigo
1	990	783	1832	388
2	722	599	1186	421
3	838	881	1441	523
4	709	714	935	300
5	381	333	1097	214
6	434	487	769	201
7	388	314	1442	217
8	376	273	573	185
9	509	311	963	219
10	314	166	637	135
11	712	518	831	182
12	366	357	923	210
13	394	235	664	147
14	384	281	732	169
15	815	414	863	251
16	418	208	659	<LOQ
17	165	128	258	45
18	167	87	289	45
19	360	425	576	95
20	308	352	431	<LOQ

A etapa de limpeza contribuiu para redução da micotoxina DON em aproximadamente 27,3%. A maior porcentagem de redução foi evidenciada na amostra 16, onde o conteúdo médio de DON diminuiu em mais de 50%. Cheli et al. (CHELI et al., 2013) revisaram o efeito de processos físicos e mecânicos e relataram que a redução de micotoxinas em trigo limpo, comparado a grãos que não passaram por nenhum processo de limpeza, podem variar de 7 a 63% para DON.

Em 4 amostras, a etapa de limpeza não teve efeito na redução de DON, com concentrações finais muito semelhantes ou ligeiramente superiores às concentrações iniciais. O que pode explicar tal fato, é que tais amostras poderiam ser compostas de grãos com maior uniformidade na distribuição de micotoxinas entre os grãos, enquanto, naqueles em que houve maior redução, as concentrações de maior incidência da micotoxina estariam relacionadas ao grãos de menor massa (giberelados, quebrados e chochos), os quais são separados e retirados na etapa de limpeza resultando na redução da concentração de DON. Os resultados obtidos por Thammawong et al. (THAMMAWONG et al., 2010) indicam que a distribuição de desoxinivalenol e nivalenol em trigo e seus subprodutos da moagem pode ser influenciada pelo nível de contaminação do grão original, sendo que este processo nem sempre é eficaz para a remoção de micotoxinas a partir de grãos de trigo.

As amostras da fração de moagem destinada ao consumo humano (farinha branca), apresentaram níveis de contaminação por DON menores, em comparação com as outras frações em todas as amostras (grãos não limpos, após a limpeza e farelo. Nesta fração, foi percebido uma redução nas concentrações de DON de 18,4% a 90,1%, com redução média de 48,5% com relação a concentração inicial da micotoxina no grão limpo antes da moagem. Consequentemente, na fração farelo as concentrações de DON foram superiores àquelas determinadas no grão, com porcentagens de 122,5% a 458,7% em comparação à concentração inicial (no grão).

Estudos relacionados (LANCOVA et al., 2008; RÍOS et al., 2009; TIBOLA et al., 2015; TIBOLA; FERNANDES; GUARIENTI, 2016) relataram resultados semelhantes e sugeriram 2 hipóteses para estes achados: Uma seria devido a friabilidade mais elevada das camadas exteriores das amostras mais contaminadas ou então, devido a uma quantidade mais elevada de toxina no endosperma dos grãos. No entanto, os fatores que causam a variabilidade na redução das concentrações de micotoxinas não foram completamente determinados (PINSON-GADAIS et al., 2007). Tecidos periféricos, tais como o pericarpo, são as partes do grão primeiramente colonizadas pelos fungos e, muitas vezes contaminadas por micro-organismos (BRERA et al., 2006). Nowicki e colaboradores (NOWICKI et al., 1988) afirmaram que a distribuição de DON nas frações de grãos de trigo moído é dependente do grau de penetração fúngica no endosperma do grão e que esta suscetibilidade é dependente da variedade da planta. Os autores verificaram que quando a penetração era baixa, maiores níveis de infecção e DON eram encontrados na superfície do grão e consequentemente baixas concentrações de DON na farinha.

Houve redução das concentrações de DON em até 90,1% no grão limpo, dependendo da concentração inicial da micotoxina. Nosso estudo obteve maiores concentrações de DON no farelo, com aumento de até 458,7%. Tibola et al. (TIBOLA, FERNANDES & GUARIENTI, 2016; TIBOLA et al., 2015), Lancova et al. (LANCOVA et al., 2008) e RÍOS et al. (Ríos et al., 2009) relataram resultados semelhantes e sugeriram 2 hipóteses para estes achados: maior friabilidade das camadas externas das amostras contaminadas ou maior quantidade de micotoxinas no endosperma dos grãos. Como é de se esperar, se a colonização fúngica for limitada a camadas externas, isso resultará em maiores concentrações de micotoxinas na superfície do grão (BRERA et al., 2006).

Além disto, micotoxinas como fumonisinas e zearalenona também foram investigadas, porém, estas não haviam sido detectadas nas amostras de grãos, mas foram detectadas e determinadas somente no farelo. Este fato pode ser explicado, devido as baixas concentrações destas micotoxinas no grão, na qual, após o processo de moagem, foram concentradas na porção farelo, as quais passaram então a ser detectadas. A alta concentração de micotoxinas no farelo pode indicar a presença de toxinas na parte externa do grão (LANCOVA et al., 2008). Tal como na limpeza, no processo de moagem não existe etapa que degrade as micotoxinas. No entanto, estas toxinas podem ser redistribuídas e concentradas em determinadas frações de moagem.

4 CONCLUSÃO

O método de limpeza inicial contribuiu para a redução da concentração da micotoxina DON, assim como a moagem reduziu as concentrações da micotoxina na fração farinha, a qual é utilizada para consumo humano. Porém é notório que tal micotoxina não é degradada por tal processo, mas concentra-se na outra fração, o farelo, a qual é tida como resíduo e seu principal uso tem sido na ração animal. No entanto, estas frações podem representar promissores ingredientes alimentares como fonte de fibras, comumente utilizados em dietas e desta forma podem fazer parte da alimentação humana.

5 REFERÊNCIAS

- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3–4, p. 265–282, 2007.
- BRERA, Carlo et al. Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenone in Corn-Milling Fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 14, p. 5014–5019, 2006.
- CALVO, Ana M. Mycotoxins. In: DABROWSKI, Waldemar M.; SIKORSKI, Zdzislaw E. (Eds.). **Toxins in food**. Boca Raton, Florida - USA: CRC Press, 2005. p. 220–240.
- CHELI, Federica et al. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 307–314, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813002041>>. Acesso em: 8 nov. 2013.
- EDWARDS, Simon G.; GODLEY, Nigel P. Reduction of Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, p. 629–635, 2010.
- GUTERRES, Caroline Wesp. Giberela do trigo, inimigo nem sempre perceptível. **CCGL Info**, Cruz Alta, v. Ano IV, n. 23, Cruz Alta-RS, p. 22, 2013.
- IMATHIU, Samuel M. et al. Fusarium langsethiae - a HT-2 and T-2 toxins producer that needs more attention. **Journal of Phytopathology**, v. 161, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jph.12036>>. Acesso em: 16 nov. 2013.
- KLAHR, Anja et al. Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of

QTLs for resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat cross. **Euphytica**, v. 154, p. 17–28, 2006.

LANCOVA, K. et al. Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 5, p. 650–659, 2008.

NOWICKI, T. W. et al. Retention of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. **Journal of Cereal Science**, v. 8, p. 189–202, 1988.

PINSON-GADAIS, L. et al. Distribution of toxigenic Fusarium spp. and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 1, p. 53–62, 2007.

RAI, Maheendra; VARMA, Ajit. **Mycotoxins in food, feed and bioweapons**. 1^a ed. Heidelberg, Germany: Springer, 2010.

RAN, Ran et al. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. **Food Control**, v. 34, p. 138–148, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513002107>>. Acesso em: 3 nov. 2013.

RÍOS, Gisella et al. Impact of durum wheat milling on the deoxynivalenol distribution in the outcoming fractions. **Food additives and contaminants**, v. 4, p. 487–495, 2009.

SHOLTEN, O. E. et al. **Food safety of cereals: A chain-wide approach to reduce Fusarium Mycotoxins**. European Union.

THAMMAWONG, Manasikan et al. Distribution of Deoxynivalenol and Nivalenol in Milling Fractions from Fusarium-Infected Japanese Wheat Cultivars. **Journal of Food Protection**, n. 10, p. 1780–1955, 2010.

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

TIBOLA, Casiane Salete; FERNANDES, José Mauricio Cunha; GUARIENTI, Eliana Maria. Effect of cleaning, sorting and milling processes in wheat mycotoxin content. **Food Control**, v. 60, p. 174–179, 2016.

VRIES, John De. **Food safety and toxicity**. Heerlen, Netherlands: CRC Press, 1997.