



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GERVÁSIO HITOSHI SAITO

**DESOXINIVALENOL E NIVALENOL EM TRIGO (GRÃO &  
FARINHA) VISANDO PROCESSO AGROINDUSTRIAL,  
ESTADO DO PARANÁ-BRASIL**

---

Londrina  
2018

**GERVÁSIO HITOSHI SAITO**

**DESOXINIVALENOL E NIVALENOL EM TRIGO (GRÃO &  
FARINHA) VISANDO PROCESSO AGROINDUSTRIAL,  
ESTADO DO PARANÁ-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Ciência e Tecnologia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito parcial a obtenção do Título de Mestre  
em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Elisa Yoko Hirooka

Co-orientador: Dr. Osamu Kawamura

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Saito, Gervásio Hitoshi.

DESOXINIVALENOL E NIVALENOL EM TRIGO (GRÃO & FARINHA) VISANDO PROCESSO AGROINDUSTRIAL, ESTADO DO PARANÁ-BRASIL / Gervásio Hitoshi Saito. - Londrina, 2018.  
56 f.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Coorientador: Osamu Kawamura.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Desoxinivalenol - Tese. 2. Nivalenol - Tese. 3. CLAE-UV - Tese. 4. Trigo - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Kawamura, Osamu. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

GERVÁSIO HITOSHI SAITO

**DESOXINIVALENOL E NIVALENOL EM TRIGO (GRÃO &  
FARINHA) VISANDO PROCESSO AGROINDUSTRIAL, ESTADO DO  
PARANÁ-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Ciência e Tecnologia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito parcial a obtenção do Título de Mestre  
em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

---

Dr. Thiago Montagner de Souza  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Claudemir Zucareli  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Angélica Tiemi Ishikawa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de Julho de 2018

*À minha esposa, Erica Tiemy do Nascimento,  
por todo amor, companheirismo e apoio nos  
momentos mais difíceis;  
Aos meus pais, Kenichi e Setuko, pelo  
incentivo, carinho e dedicação;  
Aos meus irmãos, Leonardo, Érika e Ernesto,  
pelo companheirismo e incentivo .*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, dedicação, conhecimento transmitido e incentivo à pesquisa;

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos, atenção e colaboração durante o desenvolvimento do Curso de Mestrado;

À Chefia e Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela colaboração;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa - CNPq, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

À Japan International Cooperation Agency (JICA) pela oportunidade em participar do Programa de Treinamento para Nikkeis no Japão e pelo apoio financeiro;

Ao Professor Dr. Osamu Kawamura, de Kagawa University, Japão, pelo todo apoio e orientação durante a estadia na Universidade, sem os quais o trabalho não seria possível;

À Professora Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto pela orientação, incentivo e fornecimento de amostras de trigo (grão e farinha).

Ao Professor Dr. Claudemir Zucareli pelo suporte e fornecimento de amostra de grão de trigo.

À Professora Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela orientação, apoio e importantes ensinamentos.

À Professora Dra. Joice Sifuentes dos Santos e Dra. Cássia Takabayashi Yamashita pelos ensinamentos transmitidos, participação e sugestão no exame de qualificação;

À comissão examinadora pela disponibilidade e contribuição.

À Dra. Angélica Tiemi Ishikawa e Doutorandas Lívia Montanheiro Médice Zanin e Renata Pinheiro Sobottka pela amizade e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de laboratório Cleverson Ferreira Shimizu, Fernando de Godoi Silva, Thaís Marques Amorim, André Ribeiro da Silva, Felipe Pedote Fracalossi, Arum Baasithu, Dao Nhat Quang, Xolani Nkosikhona Mhlongo, Lucia Sinta Triosanti, Makiko Kohso, Asuka Hotta, Miku Kataya, pela amizade, suporte, companheirismo e momentos de descontração.

Aos meus amigos Estela Okabayaski Fuzii, Stella Cristina Okabayaski Fuzii, Paulo Masaharu Tsuchiya, Hidefumi Baba, Alex Takeshi Inagati, Elisa Honda, Henrique Pelegrini Reis, Luíz Felipe, Fernando Mazetti, Saiko Yamamoto, Tomoko Iwasa, Norito Yasuda,

Akane Mitsubishi, Nobuhito Suzuki pelo companheirismo e momentos de descontração e alegria;

Aos colegas e companheiros do Programa de Mestrado e Doutorado, pelos momentos compartilhados e pela amizade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SAITO, Gervásio Hitoshi. **Desoxinivalenol e nivalenol em trigo (grão & farinha) visando processo agroindustrial, estado do Paraná-Brasil**. 2018. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um cereal de importância econômica relevante, capaz de alimentar aproximadamente metade da população mundial. Desoxinivalenol (DON) e Nivalenol (NIV), tricotecenos do tipo B - TCTB, são produzidos principalmente por *Fusarium graminearum* em condição favorável de temperatura e umidade pós-estabelecimento de infecção na fase de floração, cuja subsequente contaminação em grão pode desencadear intoxicação em homem e animais. O contínuo monitoramento se faz necessário para garantir a segurança de trigo e produtos derivados destinados ao consumo brasileiro, já que o país ainda depende de 50% de importação. O trabalho visa avaliar os níveis de DON e NIV, assim como a co-ocorrência em grão e farinha produzidos / destinados à industrialização na Região Norte e Sul do Estado do Paraná por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV). A amostragem, num total de 29 amostras de grão e 7 amostras de farinha de trigo (safra 2014, 2015 e 2016), foi realizada em cooperativas, indústrias de alimento e fazenda escola localizadas no Estado do Paraná - Brasil. Os parâmetros de desempenho analítico analisados foram exatidão, precisão (repetibilidade), linearidade, limite de detecção e quantificação. A análise por CLAE-UV apresentou a linearidade de 0,99971 e 0,99977 para DON e NIV, respectivamente; ambos os TCTB apresentaram o limite de detecção e quantificação de 7 e 21  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente; em relação a repetibilidade, o coeficiente de variação variou de 0,59 a 2,98%. A recuperação para DON e NIV foi de 114 e 95%, respectivamente. Os parâmetros analisados apresentaram resultados satisfatórios e, atenderam a exigência normativa de ANVISA - Ministério de Saúde do Brasil. DON ocorreu em 75% das amostras de trigo (grão + farinha), com os níveis variando de 26 a 2044  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (média, 471,4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). NIV ocorreu em 66,6%, com níveis variando de 30 a 1348  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (média, 116,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Apenas 4 amostras apresentaram níveis de DON acima do limite máximo estabelecido pela Comunidade Europeia; em relação a legislação brasileira, 2 amostras de farinha apresentaram níveis de DON acima do limite máximo estabelecido. A co-ocorrência de DON e NIV nas amostras de trigo (grão + farinha) foi de 52,7%. Em suma, o trigo grão regional produzido na região Norte do Paraná apresentou contaminação abaixo do limite máximo exigido seja pela Comunidade Europeia com Brasileira; o mesmo não ocorreu em relação ao trigo destinado à industrialização na Região Sul. Nesta Região deve-se salientar a origem de matéria prima para o processamento, considerando a aquisição de diferentes locais, inclusive dependência de importação. A ocorrência de DON deve receber preocupação adicional perante co-ocorrência com NIV em trigo, com os resultados apontando para necessidade das medidas de controle seja no âmbito nacional como internacional.

**Palavras-chave:** Trigo. Farinha. Desoxinivalenol. Nivalenol. Coocorrência. CLAE-UV.

SAITO, Gervásio Hitoshi. **Deoxynivalenol and nivalenol in wheat (grain & flour), aiming at agroindustrial process, Paraná state-Brazil**. 2018. Dissertation (Master in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## ABSTRACT

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a cereal of relevant economic importance, capable of feeding approximately half the world population. Deoxynivalenol (DON) and Nivalenol (NIV), trichothecenes type B - TCTB, are produced mainly by *Fusarium graminearum* in favorable conditions of temperature and moisture post-establishment of infection in the flowering stage, whose subsequent contamination in grain can trigger intoxication in humans and animals. Continuous monitoring is necessary to guarantee the safety of wheat and derived products destined for Brazilian consumption, since the country still depends on 50% of imports. The objective of this work is to evaluate the levels of DON and NIV, as well as the co-occurrence in grain and flour produced / destined for industrialization in the Northern and Southern Region of the State of Paraná by High Efficiency Liquid Chromatography with ultraviolet detector (HPLC). Sampling, in a total of 29 grain samples and 7 samples of wheat flour (harvest 2014, 2015 and 2016), was carried out in cooperatives, food industries and school farm located in the State of Paraná - Brazil. The analyzed analytical performance parameters were accuracy, precision (repeatability), linearity, limit of detection and quantification. The analysis by HPLC-UV showed linearity of 0.99971 and 0.999977 for DON and NIV, respectively; both TCTB had the limit of detection and quantification of 7 and 21  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectively; in relation to repeatability, the coefficient of variation ranged from 0.59 to 2.98%. The recovery for DON and NIV was 114 and 95%, respectively. The analyzed parameters presented satisfactory results and, according to the normative requirement of ANVISA - Brazilian Ministry of Health. DON occurred in 75% of the wheat (grain + flour) samples, with levels varying from 26 to 2044  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (mean, 471.4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). NIV occurred in 66.6%, with levels varying from 30 to 1348  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (mean, 116.7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Only 4 samples showed DON levels above the maximum limit established by the European Community; in relation to the Brazilian legislation, 2 flour samples showed DON levels above the established maximum limit. The co-occurrence of DON and NIV in the wheat (grain + flour) samples was 52.7%. In short, the regional grain wheat produced in the Northern Paraná showed contamination below the maximum limit required by the European Community and Brazilian; the same did not occur in relation to the wheat destined to the industrialization in the South Region. In this Region, the origin of the raw material for processing must be emphasized, considering the acquisition of different locations, including import dependency. The occurrence of DON should receive additional concern regarding co-occurrence with NIV in wheat, with the results pointing to the need for control measures at the national and international levels.

**Key words:** Wheat. Flour. Deoxynivalenol. Nivalenol. Co-occurrence. HPLC-UV.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Ciclo de <i>Fusarium</i> spp. em trigo.....	19
<b>Figura 2.</b>	Estrutura química de tricotecenos A e B.....	20
<b>Figura 3.</b>	Distribuição dos limites regulatórios de DON em trigo por diferentes países.....	22
<b>Figura 4.</b>	Fluxograma geral da amostragem e análise de DON e NIV em trigo. ....	28
<b>Figura 5.</b>	Preparo das amostras de trigo para análise de DON e NIV (grão). ....	29
<b>Figura 6.</b>	Extração de DON e NIV nas amostras de grão e farinha de trigo. ....	30
<b>Figura 7.</b>	Verificação do Método de Análise de DON e NIV em amostra de trigo e farinha .....	30

### CAPÍTULO

<b>Figura 1.</b>	Curva Padrão de DON e NIV por CLAE-UV. ....	45
<b>Figura 2.</b>	Perfil cromatográfico de trigo grão integral analisado por CLAE-UV.....	46
<b>Figura 3.</b>	Média e Mediana de DON (A) e NIV (B) em trigo (grão e farinha) e boxplot correspondente, considerando diferentes procedências.....	47

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b>	Estrutura química e as características físico-químicas das moléculas de DON e NIV .....	21
<b>Tabela 2.</b>	Níveis máximos de DON presentes nos gêneros alimentícios, , EC nº1881, 2006 .....	23
<b>Tabela 3.</b>	Limite máximo tolerado (LMT) para DON em alimentos, RDC nº 138 de 08 de fevereiro de 2017.....	24

## CAPÍTULO

<b>Tabela 1.</b>	Amostras de Grão Integral e Farinha de Trigo.....	37
<b>Tabela 2.</b>	Avaliação do método para determinação dos níveis de DON e NIV por CLAE-UV.....	45
<b>Tabela 3.</b>	Ocorrência natural de DON e NIV em trigo e farinha destinadas ao processamento, avaliada por CLAE-UV, Estado do Paraná.....	46
<b>Tabela 4.</b>	Perfil da contaminação natural de DON e NIV em trigo (grão e farinha para processamento) por CLAE-UV, Estado do Paraná.....	48
<b>Tabela 5.</b>	Diferença de níveis de DON e NIV após o processamento de grão de trigo em farinha.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists International</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COOP	Cooperativa
CV	Coeficiente de Variação
DON	Desoxinivalenol, <i>Deoxynivalenol</i>
DP	Desvio Padrão
EC	Europe Commission
FAO	Food Agriculture and Organization of the United Nation
IARC	International Agency for Research on Cancer
ic-ELISA	ELISA ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> ) <i>Indirect competitive</i>
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants
LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LMT	Limite Máximo Tolerado
MS	Ministério da Saúde
NIV	Nivalenol
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TCTA	Tricotecenos do tipo A
TCTB	Tricotecenos do tipo B
USDA	<i>United States Department Of Agriculture</i>
UV	Radiação ultravioleta
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1.	Trigo .....	17
2.2.	<i>Fusarium</i> spp. em trigo.....	17
2.3.	Desoxinivalenol e Nivalenol em trigo .....	19
2.4.	Legislação .....	22
2.5.	Determinação de Desoxinivalenol e Nivalenol.....	25
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	26
3.1.	Objetivo Geral .....	26
3.2.	Objetivos Específicos .....	26
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
	<b>CAPÍTULO</b> .....	32
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	35
2.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
2.1.	Amostragem de trigo - grão integral e farinha .....	36
2.2.	Padrão de micotoxinas .....	37
2.3.	Determinação de DON e NIV .....	37
2.3.1.	Extração de DON e NIV .....	37
2.4.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta (CLAE-UV) .....	38
2.5.	Linearidade .....	38
2.6.	Precisão .....	38
2.7.	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) .....	39
2.8.	Teste de Recuperação.....	39
2.9.	Análise Estatística .....	39
3.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
3.1.	Avaliação do Método.....	40
3.2.	Contaminação natural de DON e NIV em grão e farinha de trigo .....	41

4.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	44
5.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O trigo se destaca na economia mundial por ser um dos três cereais mais cultivados, juntamente com o milho e arroz, cuja produção anual estimada em 752 milhões de toneladas é capaz de alimentar metade da população mundial.

O trigo é cultivado de Região Sul a Cerrado no Brasil Central, abrangendo uma área superior a 2 milhões de hectares. A produção nacional de 6,72 milhões de toneladas em 2016, com o Estado do Paraná e Rio Grande do Sul garantindo 51% e 37%, respectivamente; a soma não supre a demanda anual de 10,3 milhões de toneladas, devendo-se importar principalmente de Argentina e Paraguai.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de espécimes fúngicas em produtos agrícolas desde o campo, armazenamento de cereais, bem como em alimentos processados e rações animais. As perdas econômicas relevantes decorrem da redução na produtividade vegetal e animal, além de causar intoxicação em humano e animais.

Alta umidade do ar, clima temperado e precipitação pluvial em dias consecutivos durante crescimento de trigo causam a giberela (*Scab* ou *Fusarium Head Blight*) por *Fusarium graminearum* e, subsequente produção de tricotecenos com ênfase a Desoxinivalenol (DON) e Nivalenol (NIV) em grãos.

Dentro dos tricotecenos, DON é encontrado com mais frequência em grão de cereais (Bando et al., 2007; Freire et al., 2007). Em animais, a ingestão desta micotoxina pode causar deficiência nutricional, vômito, perda de peso e anorexia (Rotter, Prelusky, & Pestka, 1996; Smith, McMillan, & Castillo, 1997).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o valor máximo permitido de DON de 3000  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  para grão de trigo e 1000  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  para farinha. Segundo a Comissão Europeia, o limite máximo permitido de DON é de 1750  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  para trigo duro não processado e 750  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  para farinha de trigo.

NIV trata-se de uma das poucas micotoxinas sem regulamentação específica pelas Agências Nacionais e Internacionais, embora exista relato sobre inibição da proliferação de linfócito humano *in vitro*. DON e NIV são frequentemente detectados na mesma amostra e a concentração de DON é, geralmente, superior à NIV. No entanto, casos em que a concentração de NIV ser superior ao DON tem sido frequentemente reportado na Europa e Ásia.

Relatos frequentes de contaminação de grãos por DON e NIV, associada à dependência da importação brasileira de trigo, requer monitoramento mais rigoroso com métodos de análise que apresenta sensibilidade, confiáveis e de fácil manuseio. Assim, O objetivo desta dissertação é avaliar contaminação natural e a co-ocorrência de DON e NIV por CLAE-UV nas amostras de grãos e farinha de trigo destinadas ao consumo humano, coletadas de diferentes locais do sul do Brasil.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) tem sido cultivado há mais de 8000 anos na Europa, Oeste da Ásia e Norte da África como principal alimento à civilização humana. A importância na atual economia global é relevante, sendo um dos três cereais mais cultivados no mundo, juntamente com milho e arroz. A produção mundial de trigo de 752,0 milhões de toneladas em 2016/17 apresenta estimativa de 757,9 milhões em 2017/18, cuja cifra alimenta mais da metade da população mundial, estando o consumo médio de 698 milhões de toneladas entre 2012 e 2016 (USDA, 2018; FAO, 2017).

O território brasileiro com área cultivada aproximada de 59 milhões de hectares apresenta 2 milhões de hectares destinadas ao trigo. A produção nacional na safra de 2015/16 e 2016/17 foi de 5,53 e 6,72 milhões de toneladas, respectivamente, indicou aumento na produção de 21%, mas sempre com oscilações e, requer importação para suprir o consumo nacional anual de 10,3 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

Em 2017/18, países como União Europeia, Japão, Brasil, Argélia, Indonésia e Egito representaram os principais importadores de trigo, com participação de 5,6; 6,0; 6,7; 8,2; 10,5; 12,0 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2018). A principal fonte de importação brasileira de trigo advém de Argentina (83,8%), Paraguai (6,9%), Estados Unidos (5,5%) e Canadá (3,1%) (ABITRIGO, 2017).

O trigo brasileiro, *Triticum aestivum* L., atinge entre 0,5 a 1,5 m de altura, com semeadura em maio – julho e, colheita em setembro – novembro. A região Sul é o maior produtor com mais de 90%, devido ao clima frio propício ao desenvolvimento de cultivares (CUNHA, 2009). O estado do Paraná é o maior produtor nacional de trigo com cerca de 2,21 milhões de toneladas em 2017, seguido de Rio Grande do Sul com 1,27 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

### 2.2 *Fusarium* spp. em trigo

A giberela ou fusariosose é uma das principais doenças na cultura do trigo. No Brasil, o principal fitopatógeno é o fungo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (anamorfo = *Fusarium graminearum* Schwabe). Outras espécies como *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc. e *G.*

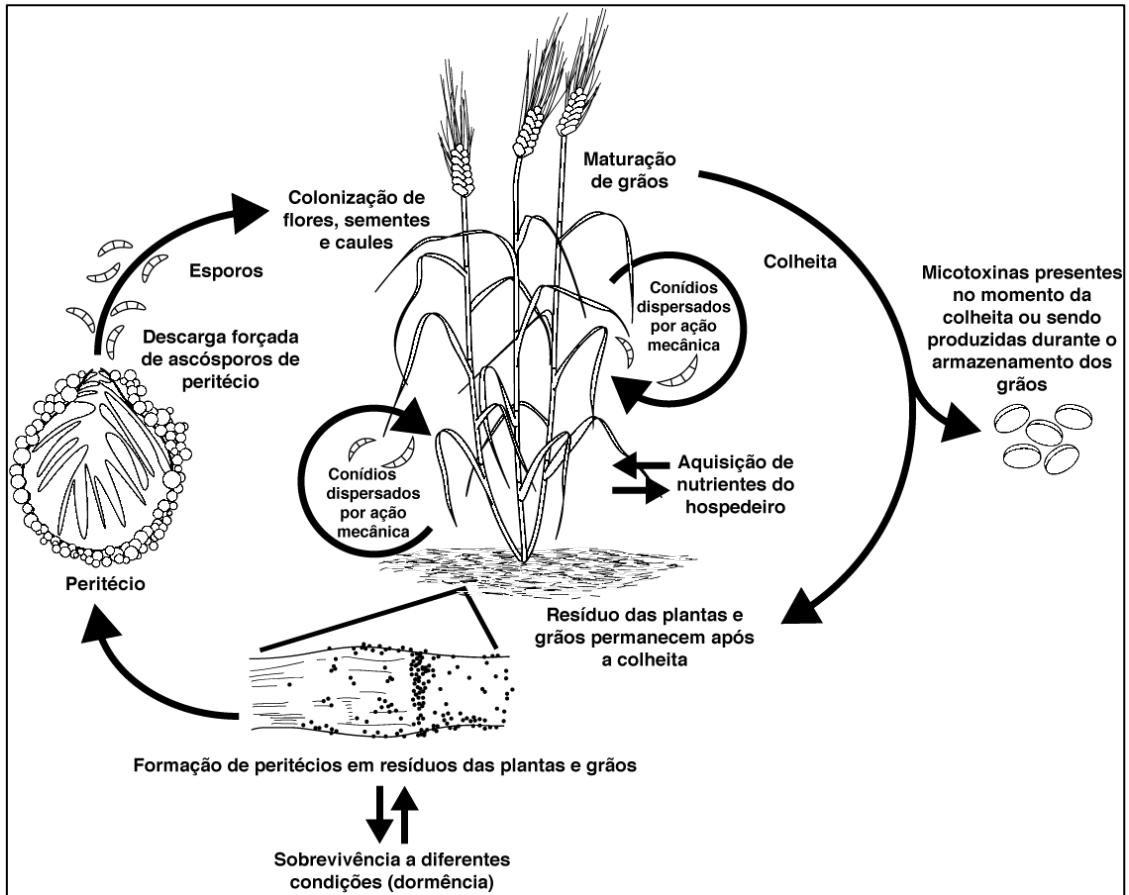
*avenacea* Cook [anamorfo = *F. avenaceum* (Corda ex Fries)] também infectam em certas regiões brasileiras (DEL PONTE et al., 2004).

O dano devido a fusariose na produtividade de grãos atingiram a média de 5,4% entre 1984 a 1994 na Região Sul do Brasil (REIS et al., 1996). A redução da produtividade nacional correspondeu a 17,5%, 13,4% e 11,6% nas safras de 2000, 2001 e 2002, respectivamente (CASA et al., 2004).

A giberela é uma doença monocíclica, sendo que macroconídios assexuais de *G. zae* sobrevive como saprófita no período entressafra em resíduos vegetais dispostos na superfície do solo (Figura 1).

A intensidade de fusariose depende de condição climática no estabelecimento da doença, principalmente de temperatura e chuva, sendo que epidemia varia de ano para ano. Todavia, em determinado ano, campos vizinhos podem desenvolver diferentes níveis de contaminação influenciada pelo sistema de plantio (REIS; CASA, 1998; CHAMPEIL et al., 2004). Chuva e vento liberam e dispersam os macroconídios, podendo ser elevados ao dossel da cultura. O molhamento de resíduos desencadeia o ciclo sexual produzindo peritécios com ascósporos, liberando também ao ambiente acima do dossel. Os macroconídios como ascósporos, em contato com espiga de trigo infetam no período da extrusão de anteras (sítio primário da infecção) até o estágio de grão em massa sob alta umidade entre 20 - 30°C. *G. zae* propaga-se através de ráquis com sintomas após alguns dias, observando-se senescência prematura de espiguetas, expandindo-se para toda a espiga. Uma massa rosada de esporos na espiga pode ser observada sob umidade contínua e prolongada, com produção de micotoxinas (SUTTON, 1982; OSÓRIO, 1992; PARRY, 1995; WANG, 1997; PAULITZ, 1999).

**Figura 1.** Ciclo de *Fusarium* spp. em trigo.



**Fonte:** <https://www.impextraco.com/pt/produtos/proteção-animal/power-protexion-power-eliminadores-de-micotoxinas>.

A fusariose é uma doença de difícil controle (CASA et al, 2004). O tratamento efetivo não se consegue com uma única estratégia, sendo o fungicida aplicado na parte aérea na fase de floração, integrado com cultivar resistente (REIS, CASA e MEDEIRA, 2001). A resistência cultural, biológica, química de planta hospedeira tem sido ferramenta poderosa, com destaque ao melhoramento genético associado a outros métodos constituindo potencial promissor visando controle sustentável (DWEBBA et al., 2017). Determinadas características morfológicas contribuem na proteção, a exemplo de planta alta sem barba com espiga frouxa tendendo para menor taxa de infecção natural (SNIJDERS, 2004).

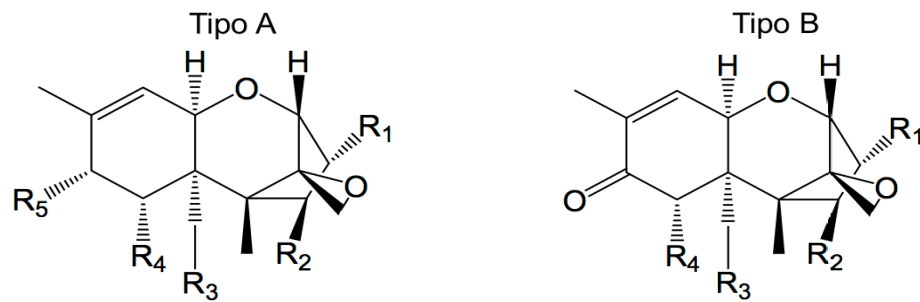
### 2.3 Desoxinivalenol e Nivalenol em trigo

Além de dano de *F. graminearum* à cultura de trigo com impacto econômico ao setor agropecuário pela redução na produtividade vegetal e animal, o perigo à saúde consiste na

contaminação com micotoxinas. A produção depende de substrato alimentar associado ao crescimento fúngico em qualquer época de cultivo, colheita ou estocagem e, permanecem mesmo pós-eliminação fúngica. Nem sempre as melhores condições de crescimento coincidem com a síntese de toxinas (TANIWAKI; SILVA, 2001).

O tricoteceno apresenta uma ligação olefínica no C-9, 10 e um anel epóxido em C-12, 13, conferindo a denominação de “12, 13 epoxitricotecenos”. O carbono em posição 3,4,7,8,14 e 15 são geralmente ligados ao hidrogênio, hidroxila, grupamento acila, epóxido adicional ou ligação éster macrocíclica, sendo classificado em não-macrocíclico ou macrocíclico. O primeiro subdivide em tricoteceno do tipo A - TCTA e tipo B - TCTB (Figura 2).

**Figura 2.** Estrutura química de tricotecenos A e B.

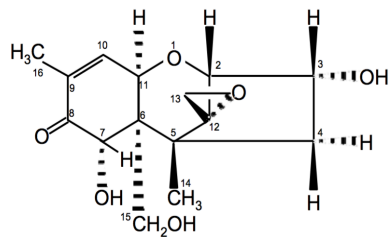
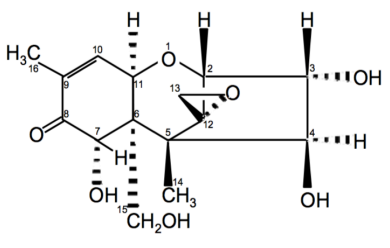


**Fonte:** Food Safety Commission of Japan, 2010.

TCTA apresenta um hidrogênio ou grupo éster na posição C-8 (toxina T-2, toxina HT-2, Neosolaniol e Diacetoxiscierpenol). TCTB contém um grupo cetona nesta posição como Desoxinivalenol -DON, Nivalenol (NIV), 3-Acetildesoxinivalenol e Fusarenona-X (BENNETT e KLICH, 2003). Na Tabela 1, estão representados as estruturas e características físico-químicas de DON e NIV.

Entre TCTB, o DON tem sido o mais importante e estudado, seguido de derivados acetilados (15-ADON e 3-ADON) e Nivalenol (NIV), detectados em maior frequência (McMULLEN; JONES; GALLENBERG, 1997). Os países asiáticos como Japão classificam o NIV na categoria de perigo potencial pela co-ocorrência frequente com DON (YOSHIDA; KANAJIMA, 2010).

**Tabela 1.** Estrutura química e as características físico-químicas das moléculas de DON e NIV.

	DON	NIV
Fórmula Estrutural		
IUPAC	Trichothec-9-en-8-one, 12, 13-epoxy-3, 7, 15-trihydroxy-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ )-I	Trichothec-9-en-8-one, 12, 13-epoxy-3, 4, 7, 15-tetrahydroxy-(3 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-
Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>
Peso molecular	296,32	312,32
Ponto de Fusão	151 - 153°C	222 - 223°C
Solubilidade	etanol, metanol, acetato de etila, água e clorofórmio	Levemente solúvel em água, solúvel em solvente orgânico polar
Dados Espectroscópicos	IR, UV, MS e NMR	IR, UV, MS e NMR

**Fonte:** Food Safety Commission of Japan (FSCJ), 2010.

A vigilância molecular tem empregado a reação em cadeia da polimerase (PCR) na genotipagem das cepas de *F. graminearum* para rastrear a distribuição dos genótipos de DON e NIV no mundo. O genótipo *F. graminearum* prevalente na América do Sul é o produtor de DON e 15-ADON, embora o genótipo NIV e 3-ADON também tenha sido detectado. O genótipo NIV prevalece na Ásia, inclusive com eventual maior prevalência do que DON (DEL PONTE; GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2012).

Os tricotecenos são citotoxinas capazes de desencadear sintoma gastrintestinal, dermatotoxina, imunotoxina, hermatotoxina e apoptose (CONKOVÁ et al., 2003). O sintoma agudo em cão, gato e ave consistiu de inflamação dérmica, taquicardia, diarreia, edema, necrose dérmica, hemorragia na mucosa estomacal e intestinal, distúrbio no sistema hematopoético incluindo leucopenia, trombocitopenia, sangramento no cérebro, dano a nervos e rejeição de alimento. O efeito crônico observado inclui atrofia ou hiperplasia do sistema hematopoético, hiperqueratose inflamatória do estômago, bem como papiloma e efeito imunossupressor (PESTKA; SMOLINSKI, 2005).

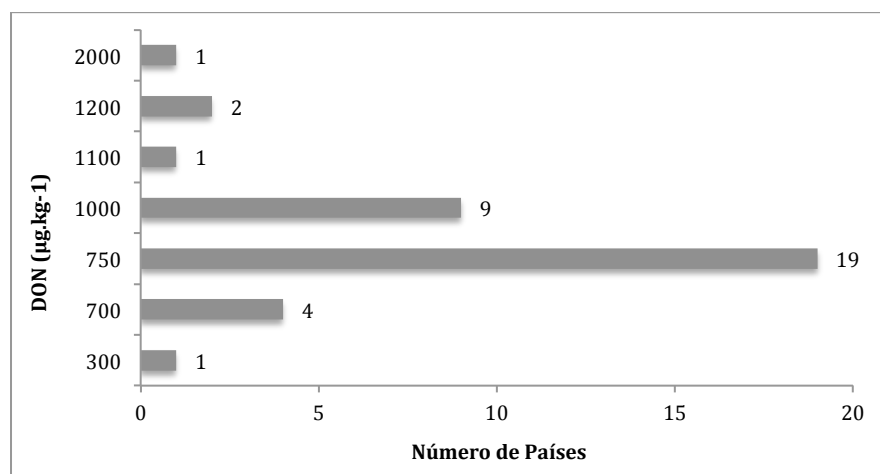
A contaminação de DON em alimentação humana causa particularmente anorexia e vômito (PESTKA; SMOLINSKI, 2005). Embora *International Agency for Research on Cancer* classifica DON em Grupo 3, i.e. não carcinogênico para humano (IARC, 2002), Huang et al. (2004) sugeriram que a administração oral em camundongo causou a incidência de adenocarcinoma em pulmão. NIV causou erosão gastrointestinal, nefropatia, anorexia e citotoxicidade em animais, enquanto pode reduzir a proliferação de linfócito em humano (KONGKAPAN et al., 2016).

## 2.4 Legislação

As entidades governamentais internacionais, através de respectivos ministérios e organizações sejam da Saúde ou da Agricultura, tem estabelecido / recomendado os limites máximos permitidos, visando o controle de micotoxinas. Aliado a isso, o setor produtivo agroindustrial (cooperativas, indústria de alimentos e ração) de países em desenvolvimento, produtores de matérias-primas, devem ser qualificados e incentivados através de políticas públicas para prevenir a contaminação por micotoxinas (ATANDA et al., 2012).

Os tricotecenos representa uma grande preocupação desde o final da década de 1990 quando países da Europa detectaram concentrações em  $\text{mg.kg}^{-1}$  em cereais e produtos derivados. Os limites regulatórios para DON em alimentos foram estabelecidos por diferentes países como demonstrado na Figura 3 (FAO, 2003).

**Figura 3.** Distribuição dos limites regulatórios de DON em trigo por diferentes países.



Fonte: FAO, 2003.

Em 2006, o limite máximo permitido de 750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 1750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (Tabela 2) foram adotados pelos países da União Europeia que atualmente aplicam este limite de DON para farinha de trigo, utilizada como matéria-prima, e grão de trigo, respectivamente (EC n°1881, 2006). Já o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) definiu que os níveis de DON não ultrapassem de 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para alimentos destinados a seres humanos e, no Japão, DON foi estabelecido através do Department of Food Safety Notification n° 0521001, o limite regulamentar provisório de 1100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  em trigo.

**Tabela 2.** Níveis máximos de DON presentes nos gêneros alimentícios, EC n°1881, 2006.

<b>Gêneros Alimentícios</b>	<b>Níveis Máximos de DON (<math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math>)</b>
Trigo duro e aveia não processados	1750
Cereais destinados ao consumo humano direto, farinha de cereais (incluindo farinha de milho, sêmola de milho e grits)	750
Massas alimentícias (secas)	750
Pão (incluindo pequenos produtos de panificação), produtos de pastelarias, bolachas, refeição leves à base de cereais e cereais para pequeno-almoço,	500
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebês destinados a lactantes e crianças jovens.	200

**Fonte:** Commission Regulation (EC) No 1881/2006.

No Brasil, a Resolução – RDC n° 7 de 18 de fevereiro de 2011 estabeleceu o limite máximo tolerado (LMT) para DON a partir do ano de 2012, com redução gradativa de LMT em 2014 e 2016, cujo valor é de 750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para farinha de trigo, e 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para trigo integral (Tabela 3). A atual Resolução (RDC n° 138 de 08 de fevereiro de 2017) vigente no Brasil alterou a RDC n° 7/2011 sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. De acordo com a resolução vigente, o nível máximo de DON tolerado em grãos de trigo para posterior processamento é de 3000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Para trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral e farelo de trigo o limite é de 1250  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Já, para farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação o máximo permitido é de 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

**Tabela 3.** Limite máximo tolerado (LMT) para DON em alimentos, segundo a resolução – RDC N° 7 de 18 de fevereiro de 2011 e a atual resolução vigente RDC n° 138 de 08 de fevereiro de 2017.

ANVISA	ALIMENTO	LMT ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
2012	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	2000
	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
2014	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	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.	1250
2016	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	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.	750
2017	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1250
	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.	1000
2019	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	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.	750

**Fonte:** Resolução – RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. (Adaptado RDC no 138, de 08 de fevereiro de 2017).

A Comunidade Europeia, ANVISA e Comissão Japonesa não estabeleceram ainda uma legislação que regula os níveis máximo de NIV em alimentos destinados a humanos e animais.

## ***2.5 Determinação de Desoxinivalenol e Nivalenol***

O instrumento analítico mais utilizado para determinação da concentração de tricotecenos tem sido a Cromatografia Gasosa (CG) acoplado ao detector de captura de elétrons ou Massa (MS). No entanto, o processo de derivatização realizado neste método aumenta o tempo de análise e diminui a taxa de recuperação (AOYAMA, 2011)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o método padrão de escolha na micotoxicologia atual, estando acoplado a diversas estratégias de detecção (EDINBORO; KARNES, 2005). CLAE acoplado ao detector de Ultravioleta (UV) e arranjo de fotodiodo tem sido o método de escolha na determinação de tricotecenos, incluindo DON e NIV em matrizes alimentares (KRSKA; WELZIG; BOUDRA, 2007). CLAE proporciona boa sensibilidade e requer procedimentos de purificação mais simples que os necessários para CG (MATEO et al., 2002; KRSKA, 1998; NURYONO et al., 2005). A separação ocorre em coluna C-18 de fase reversa, tendo em fase móvel a mistura metanol – água ultrapura, ou acetonitrila.

O avanço na metodologia vem introduzindo UPLC acoplado à espectrometria de massas, cuja vantagem consiste em associar a técnica ao caráter confirmatório (CAVALIERE et al., 2005). Na análise de DON, a fonte de ionização pode ser APCI (*atmospheric pressure ionization*) ou ESI (*electrospray ionization*), nos modos negativo e positivo (ROSENBERG et al., 1998; ZÖLLNER; JODLBAUER; LIDNER, 1999; ZÖLLNER; MAYER-HELM, 2006).

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os níveis e a co-ocorrência de DON e NIV em amostras de grão de trigo armazenados em silos e farinha de trigo destinados ao consumo humano.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

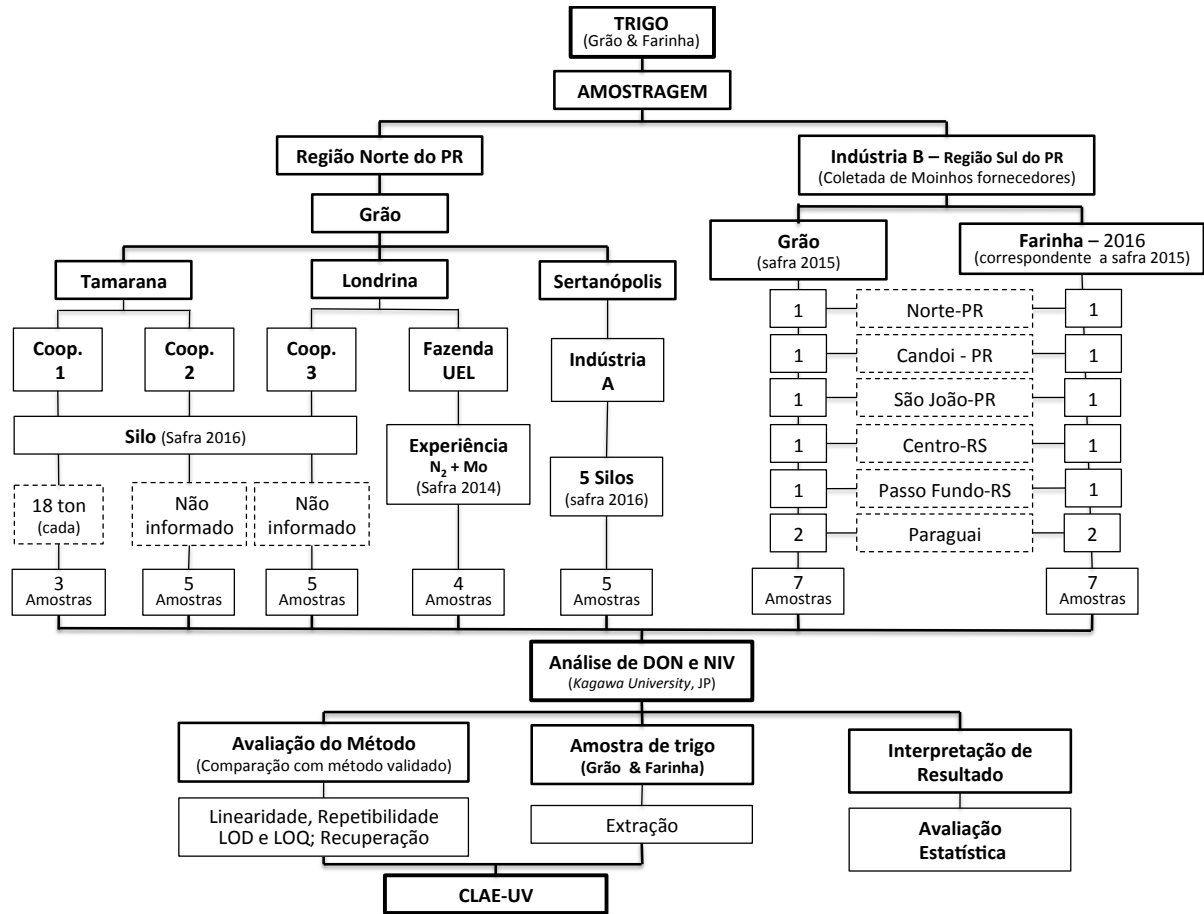
- Padronizar/validar método CLAE-UV para detecção simultânea de DON e NIV
- Avaliar a ocorrência natural de DON e NIV no grão de trigo de Cooperativas, Industrias e Fazenda aplicando CLAE-UV;
- Avaliar o efeito da moagem sob a concentração de DON e NIV nas amostras de trigo (grão e farinha);
- Avaliar co-ocorrência de DON e NIV nas amostras de grão e farinha de trigo;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

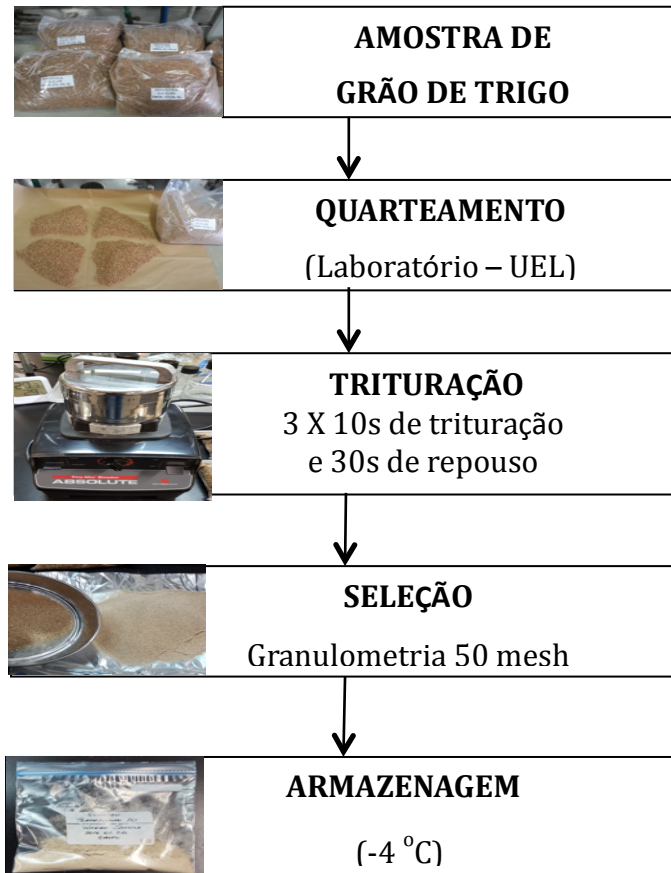
### **Fluxograma Experimental**

As metodologias adotadas neste trabalho estão apresentadas de forma detalhada no artigo científico, visando posterior publicação. A seguir, serão apresentados fluxogramas dos principais procedimentos executados.

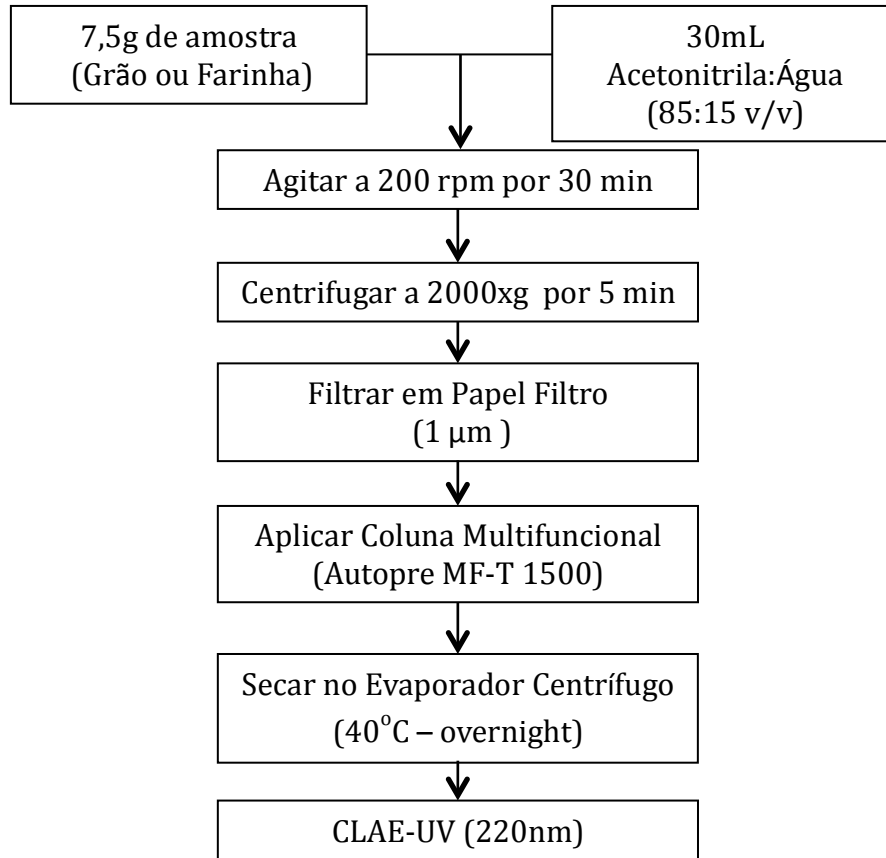
**Figura 4.** Fluxograma geral da amostragem e análise de DON e NIV em trigo.



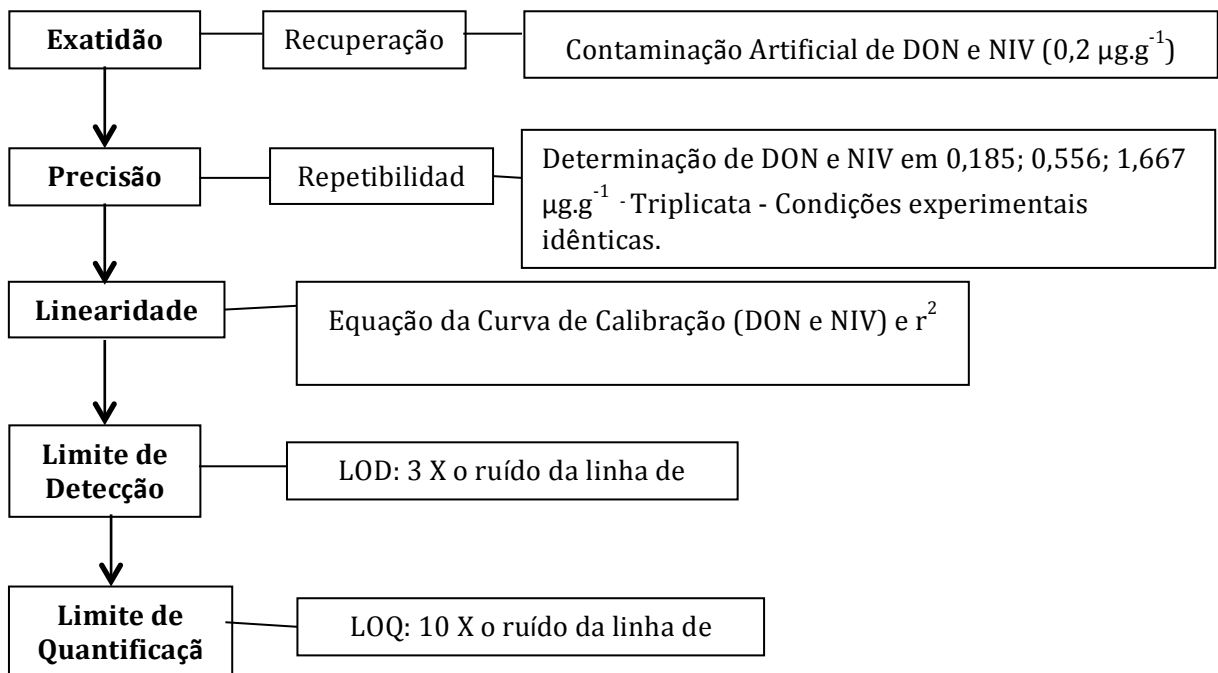
**Figura 5.** Preparo das amostras de trigo para análise de DON e NIV (grão).



**Figura 6.** Extração de DON e NIV nas amostras de grão e farinha de trigo.



**Figura 7.** Verificação do Método de Análise de DON e NIV em amostra de trigo e farinha.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão foram redigidos em forma de capítulo intitulado:  
ANÁLISE SIMULTÂNEA DE DESOXINIVALENOL E NIVALENOL EM TRIGO  
VISANDO PROCESSO AGROINDUSTRIAL.

## CAPÍTULO

ANÁLISE SIMULTÂNEA DE DESOXINIVALENOL E NIVALENOL EM TRIGO  
VISANDO PROCESSO AGROINDUSTRIAL

## RESUMO

A contaminação por tricotecenos em trigos (grão e farinha) gera grande impacto econômico e pode causar efeitos tóxicos em humanos e animais. Dentro dos tricotecenos, o Desoxinivalenol (DON) e Nivalenol (NIV) são comumente detectados quando ocorre a contaminação por *Fusarium graminearum*. Este trabalho teve como objetivo analisar por CLAE-UV simultaneamente a contaminação por DON e NIV em grãos de trigo (n=29) e farinha (n=7) da região sul do Brasil e Paraguai. Os parâmetros para verificação do desempenho analítico foram exatidão, precisão (repetibilidade), linearidade, limite de detecção e de quantificação, que por sua vez, apresentaram resultados satisfatórios e atenderam as exigências normativas. O teste de recuperação para DON e NIV foi de 114 e 95%, com repetibilidade variando entre 0,59 e 2,98%, e linearidade de análise de 0,9997 e 0,9998, respectivamente. O limite de detecção e quantificação para ambas as micotoxinas foi de 7 e 21  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente. A contaminação natural de DON e NIV foi de 75 e 66,6%, respectivamente, e co-ocorrência de 52,7%. Em média, a concentração de DON e NIV foi de 117 e 471  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente. Quatro (2 grãos / 2 farinhas) amostras apresentaram níveis de DON acima do limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia (1750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para grão e 750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para farinha) e duas amostras de farinha, acima da legislação Brasileira (1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Neste trabalho, a ocorrência de DON e NIV nas amostras de grão e farinha de trigo apontam a importância de medidas de controle na produção destes tricotecenos seja em trigo de âmbito nacional como internacional.

Palavra-chave: *Triticum aestivum* L., Micotoxinas, Tricotecenos, CLAE-UV.

## ABSTRACT

The contamination by trichothecenes in wheat (grain and flour) generates large economic impacts and it can cause toxic effects in humans and animals. Within trichothecenes, Deoxynivalenol (DON) and Nivalenol (NIV) are commonly detected when the contamination by *Fusarium graminearum* occurs. The objective of this study was to analyze DON and NIV simultaneously in grain (n = 29) and flour (n = 7) samples from southern Brazil and Paraguay by HPLC-UV. The parameters for verification of the analytical performance were accuracy, precision (repeatability), linearity, limit of detection and quantification, which in turn presented satisfactory results and met the normative requirement. The recovery test for DON and NIV was 114 and 95%, with repeatability test varying between 0.59 and 2.98%, and linearity of the analysis test of 0.9997 and 0.9998, respectively. The limit of detection and quantification for both mycotoxins was 7 and 21  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectively. The natural contamination of DON and NIV was 75 and 66.6%, respectively, and co-occurrence of 52.7%. On average, the concentration of DON and NIV was 117 and 471  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectively. Four (2 grains / 2 flours) samples presented levels of DON above the maximum limit established by the European Community (1750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  for grain and 750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  for flour) and two samples of flour, above the Brazilian legislation (1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). In this work, the occurrence of DON and NIV contamination in wheat grain and flour samples indicates the importance of control measures in the production of these trichothecenes in national and international wheat.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., Mycotoxins, Tricotececes, HPLC-UV.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido como um dos maiores produtores de alimento do mundo, exceto a produção de trigo. Nos últimos anos a produção nacional de trigo houve um crescimento significativo principalmente nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul. No entanto, na safra de 2017, a produção nacional foi de apenas 4,2 milhões de toneladas, uma redução de 36,6% em relação a safra anterior devido ao excesso de chuva, estiagem e geadas (CONAB, 2018).

A contaminação fúngica, comumente conhecida como giberela, pode causar perdas significativas no campo e diminuir a qualidade do grão de trigo (PARRY; JENKINSON; MCLEOD, 1995). Além disso, algumas espécies de fungos como *Fusarium graminearum* e *F. culmorum* são capazes de produzir tricotecenos, metabólitos secundários tóxicos, que contaminam os grãos de trigo, causando risco à saúde humana e animal (BECHER; MIEDANER; WIRSEL, 2013; NIELSEN et al., 2014). Desoxinivalenol (DON) e Nivalenol (NIV), pertencentes ao tricotecenos do tipo B, são frequentemente detectados simultaneamente nas mesmas amostras, sendo que os níveis de ocorrência de DON é geralmente maior que a de NIV (EDWARDS et al., 2011).

Desoxinivalenol apresenta estabilidade durante a estocagem, processamento de alimento e resistência em altas temperaturas (WOLF-HALL; HANNA; BULLERMAN, 1999). Em animais, a ingestão de DON pode causar vômito, deficiência nutricional, perda de peso, anorexia e imunossupressão (ROTTER; PRELUSKY; PESTKA, 1996; SMITH; MCMILLAN; CASTILLO, 1997; FAO/WHO, 2011). Nivalenol apresenta maior toxicidade em humanos e animais doméstico em relação à DON, a ingestão diária máxima aceitável de NIV é de  $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  por peso corpóreo (Food Safety Commission of Japan, 2010). Segundo EDWARDS et al., 2011, DON e NIV são frequentemente detectados na mesma amostra e a concentração de DON é, geralmente, superior à NIV. No entanto, casos em que a concentração de NIV foi superior ao DON tem sido frequentemente reportado na Europa e Ásia (LEE et al., 1986; OSBORNE & STEIN, 2007).

A Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são utilizados como método analítico confirmatório para DON e NIV. O uso de CLAE acoplado com detector de ultravioleta (UV) tem sido utilizado como método de detecção simultânea de DON e NIV em amostra de alimento e ração, utilizando coluna multifuncional para limpeza (RODRIGUES; HANDL; BINDER, 2011). Recentemente, métodos mais modernos como a Cromatografia Líquida acoplado a Espectrometria de Massa (LC-MS) também tem sido utilizado para análise de DON e NIV. No entanto, a LCMS requer um

analista altamente qualificado, equipamentos de alto custo e cuidado no processo da limpeza devido ao efeito da matriz.

A dependência brasileira de importação de trigo para suprir a demanda interna, torna a necessidade de contínuo monitoramento de contaminação com tricotecenos, um fator primordial para garantir a segurança de produtos derivados destinadas ao consumo de população nacional. Considerando que o fato enfocaria principalmente em rastreamento de grão de trigo e produtos derivados destinados à industrialização, o estudo visou contribuir com análise de Tricotecenos do tipo B (TCTB) empregando detecção simultânea de DON e NIV por CLAE-UV em grão e farinha de trigo de procedências diversas destinadas à industrialização para consumo humano no Estado do Paraná, Região Sul do Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostragem de trigo - grão integral e farinha**

Amostras de grão de trigo, produzidos na Região Norte do Paraná e destinado à indústria de alimento, foram coletadas em Indústria de alimento A (safra 2016); Cooperativas (Coop. 1, Coop. 2 e Coop. 3, safra 2016), assim como em Campo experimental da Fazenda Escola, Universidade Estadual de Londrina (safra 2014). As cinco amostras da Indústria A foram coletadas de cinco silos com capacidade entre 2,28 e 2,85 toneladas, sendo todo procedimento executado por responsável técnico da empresa. Os grãos de trigo de cooperativas foram amostradas por técnicos sendo: Coop. 1, três amostras coletadas de três silos (18 toneladas cada); Coop. 2 e 3, 5 amostras de cada cooperativa.

As amostras de grão de da safra 2015 (n=7) e a farinha correspondente, processada no ano seguinte (2016, n=7), pertenceram à Indústria B, localizada no estado de Santa Catarina. Os moinhos fornecedores da Indústria B localizavam-se nos estados do Paraná (região Sul e Norte), Rio Grande do Sul (Centro) e em Paraguai. As amostras de grão de trigo (1,2 kg) foram coletadas em armazém à granel, enquanto a farinha correspondente de *big bags* (1200 kg) mantidos em armazém. As amostras pertencentes à Indústria B foram coletadas seguindo a Instrução Normativa 38/Nov de 2010 (BRASIL, 2010)

As amostras de grão de trigo acondicionadas em embalagem de papel individual, assim como farinha acondicionada em embalagem plástica foram encaminhadas ao laboratório da UEL (n=36) e o volume imediatamente reduzidas pelo método de

Quarteamento (redução aproximada de 250g), embalados e armazenados em câmara fria à -20°C. A Tabela 1 apresenta os dados referentes a amostragem de grão e farinha de trigo.

**Tabela 1.** Amostras de Grão Integral e Farinha de Trigo.

<b>Região</b>	<b>Local da Coleta</b>	<b>Trigo</b>	<b>Safra</b>	<b>Total (n)</b>
	Indústria A	Grão	2016	5
	Coop. 1	Grão	2016	3
PR	Coop. 2	Grão	2016	5
	Coop. 3	Grão	2016	5
	Fazenda Escola (UEL)	Grão	2014	4
PR, RS,	Industria B	Grão	2015	7
Paraguai	Industria B	Farinha	2015 (moagem em 2016)	7
<b>TOTAL</b>				<b>36</b>

## 2.2. Padrão de micotoxinas

O padrão de DON (98%) e NIV (98%) utilizado neste estudo foi adquirido da empresa Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japão).

## 2.3. Determinação de DON e NIV

A análise de DON e NIV foi realizada em *Mycotoxicology, Food Hygiene Laboratory* de *Faculty of Agriculture, Kagawa University* seguindo método preconizado por AOYAMA et al. (2011). O método, aplicado em estudo interlaboratorial para a determinação simultânea de DON e NIV em trigo por LC-UV e LC-MS envolveu 11 Laboratórios, sendo 10 japoneses e 01 coreano (AOYAMA et al., 2011).

### 2.3.1. Extração de DON e NIV

Aproximadamente 100 g de grão de trigo foi submetido à moagem por 10 segundos e 30 segundos de repouso, sendo o processo repetido por 3 vezes (Absolute, Vita-Mix Blender, Osaka Chemical, JP). Após peneiragem à granulometria de 50 *mesh*, o triturado foi embalado em saco plástico modelo *zip-lock* e armazenados a -20°C.

O grão moído foi extraído com 30 mL de acetonitrila : água (85:15 v/v), em banho ultrassom (Tocho) por 10 min e homogeneizado à 200 rpm por 30 min. O extrato foi centrifugado a 2000 xg por 5 min (Kubota, modelo Kn-70) e, o sobrenadante filtrado (papel Advantec 5C, 125 mm, porosidade de 1 µm). O filtrado foi aplicado em coluna de limpeza multifuncional hidrofílica não-iônica para tricotecemos (Autoprep MF-T 1500, Showa Denko, JP). Após o descarte de 3 mL iniciais, procedeu-se a coleta de 5 mL em tubo Falcon (15 mL), sendo 4 mL transferido para um tubo de ensaio (10 x 130 mm) e seco à 40 °C em centrífuga evaporadora (Eyela, Centrifugal Evaporator CVE-3100) acoplado ao compressor (Eyela, Uni Trap UT-1000). O resíduo seco foi re-dissolvido em 1,0 mL de Água:Metanol:Acetonitrila (90:5:5 v/v) e uma alíquota de 50 µL injetado em CLAE-UV para análise de DON e NIV.

#### **2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta (CLAE-UV)**

O sistema CLAE-UV isocrático consistiu de bomba modelo LC-10AD com sistema de injeção automático operado por programa LC *Solution* (Shimadzu, Japão). A coluna C18 Octadecylsilane - ODS (Shim-pack – 5 µm, 150 mm x 6,0 mm) acoplado ao forno CTO-10A (Shimadzu, Japão) foi mantido a 40°C. A fase móvel consistiu de Água:Metanol:Acetonitrila (90:5:5 v/v) sob fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e a leitura realizada a 220 nm (detector modelo SPD-M20A, Shimadzu, Japão).

#### **2.5. Linearidade**

No teste de Linearidade avaliou-se a regressão linear procedendo cinco níveis de padrão de DON e NIV (62, 185, 556, 1667 e 5000 µg.kg<sup>-1</sup>) em Água:Metanol:Acetonitrila (90:5:5 v/v) a 24 °C e injetadas em triplicata no sistema CLAE-UV.

#### **2.6. Precisão**

O teste de Repetibilidade foi efetuado procedendo-se injeção de DON e NIV (185; 556; 1667 µg.L<sup>-1</sup>) em triplicata, sob condição experimental idêntica perante temperatura,

mesmo operador e no mesmo dia para análise (BRASIL, 2003). O teste foi expresso em Coeficiente de Variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DRP} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Sendo DP o desvio padrão, CMD a concentração média determinada e DRP o desvio padrão relativo.

## 2.7. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O LOD foi determinado efetuando-se injeção em ordem decrescente de concentração de DON e NIV até atingir o sinal cromatográfico correspondente a área de três vezes o ruído da linha de base, no tempo de retenção do analito de interesse. Para determinação de LOQ, efetuou-se injeções até que a área do pico atingisse dez vezes acima ao ruído da linha de base no tempo de retenção do pico de interesse. As amostras que apresentaram contaminação de DON e NIV abaixo do Limite de Quantificação foram consideradas como não detectada.

## 2.8. Teste de Recuperação

A performance da coluna de limpeza multifuncional (Autoprep MF-T 1500) foi avaliada conduzindo-se a contaminação artificial com 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de DON e NIV em grão de trigo triturado negativa para estas micotoxinas. A amostra contaminada foi mantida a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  *overnight*, seguida de descongelamento, em temperatura ambiente ( $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 1 hora. A extração e quantificação de DON e NIV procedeu conforme descrito no item 2.3.1.

## 2.9 Análise Estatística

O cálculo de desvio padrão, coeficiente de variação e correlação entre DON – NIV foi realizado empregando programa Statistica versão 7.0 (Tulsa, Oklahoma, USA). O programa R Studio versão 1.0.153 foi aplicado para elaboração de *boxplot* correspondente à distribuição da contaminação natural de DON e NIV em amostras de trigo (grão e farinha) perante média e mediana.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Avaliação do Método

A Figura 1 apresenta a curva padrão inicial de DON e NIV adicionada em fase móvel e analisada por CLAE-UV, para prosseguir com o desenvolvimento / otimização visando a determinação simultânea em trigo grão integral e respectiva farinha. A calibração constituiu em cinco pontos empregando DON e NIV (0,062; 0,185; 0,556; 1,667 e 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em Água:Metanol:Acetonitrila (90:5:5 v/v). O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) obtido de 0,99971 e 0,99977 para DON e NIV, respectivamente, demonstrou a coerência da curva padrão obtida, estando o valor dentro do critério mínimo aceitável ( $r^2 = 0,99$ ), proposto pela Resolução - RE nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa (BRASIL, 2003).

A precisão do método, expresso em coeficiente de variação (CV), apresentou variação entre 0,56 a 2,72% para DON e, 1,71 e 2,98% para NIV (Tabela 2). O método analítico otimizado apresentou precisão satisfatória dentro da faixa de concentração avaliada perante repetibilidade (185; 556 e 1667  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), considerando que o valor máximo aceitável pela legislação brasileira seja de 5% (RE nº 889 de março de 2003, ANVISA -MS) e Comunidade Européia que considera <20% (EC nº 401/2006).

A Tabela 2 também mostra a recuperação de 114% para DON e 95% para NIV, procedendo a contaminação artificial com 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de DON e NIV em grão de trigo moído negativo para TCTB, sendo a limpeza realizada em coluna multifuncional (Autoprep MF-T 1500). O teste de recuperação para NIV atendeu as exigências adotadas pela legislação brasileira de 80 - 110% (INMETRO, DOQ-CGCRE-008, 2016) e legislação europeia de 60 - 110% (EC nº 401/2006). Entretanto, a recuperação de DON apresentou acima do limite máximo permitida para ambas legislações.

LOD e LOQ para DON e NIV obtido de 7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 21  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente, atendeu o limite máximo permitido pela legislação brasileira de 3000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para grão de trigo e 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para farinha (RDC N<sup>o</sup>138 de 2017), assim como a legislação europeia de 1750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para grão e farinha de trigo (EC nº 1881, 2006), respectivamente.

A Figura 2 mostra o perfil cromatográfico de extrato limpo de grão triturado (granulometria de 50 *mesh*) contaminado artificialmente com DON e NIV e mantido conforme descrito no item 2.3.1, seguida de extração / limpeza em coluna multifuncional autoprep MF-T 1500. O tempo de retenção aproximado de 7 e 13 min para DON e NIV, respectivamente, seja em análise separada como em contaminação artificial simultânea,

indicaram perfil cromatográfico com Rf adequado sob condição experimental otimizado. Cromatograma de picos interferentes não foram detectadas na proximidade dos picos de TCTBs de referência.

AOYAMA et al. (2011) desenvolveram o método de análise simultânea de DON e NIV por CLAE-UV tendo MS para confirmação. Os autores relataram melhor exatidão e precisão na análise de DON com a média de recuperação (%) e repetibilidade (CV%) variando entre 90 - 110% e 1,1 - 7,6%, respectivamente. Avaliando os mesmos parâmetros para NIV, apresentaram uma variação média de 76 - 80% (recuperação) e 3,6 - 10,7% (repetibilidade). Outrossim, a recuperação e repetibilidade de DON obidos por AOYAMA et al. (2011), apresentaram dentro das normas regidas pela Comunidade Européia (repetibilidade <20% e recuperação entre 70 -120% - EC 401/2006). Comparando os mesmos com AOAC (1998), a repetibilidade para DON e NIV apresentou-se dentro das normas (<11%), mas a recuperação de NIV não atingiu o valor recomendado (80 -110%).

De modo geral, a precisão (0,56 - 2,96%) e exatidão (95 - 114%) obtidos no presente estudo para análise simultânea de DON e NIV em trigo (Tabela 2) apresentaram desempenho satisfatório e resultados semelhantes aos outros autores como AOYAMA et al., 2011; BRYLA et al., 2018 e OK; LEE; CHUN, 2018.

### 3.2. Contaminação natural de DON e NIV em grão e farinha de trigo

A Tabela 3 representa a contaminação (%) e concentração média ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) de DON e NIV em amostras de grão e farinha de trigo. Um total de 20 (68,9%) amostras de grão de trigo apresentaram positividade para DON, com níveis variando entre 26 e 2044  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , média 586,4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Em relação à farinha de trigo (n=7), DON ocorreu em todas as amostras com a concentração variando de 101 a 2015  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e média de 749  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

NIV apresentou maior predominância em grão não processado (75,8%) à farinha de trigo (28,6%). Para amostras de grão, a concentração de NIV variou entre 36 e 347,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (média 183,7  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e para farinha, variou entre 30 e 133  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (média 81,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). A co-ocorrência de DON e NIV foi de 58,6 e 28,6% para grão e farinha de trigo, respectivamente.

Os resultados coincidem com PONTE e colaboradores (2012) reportando alta ocorrência de TCTB em grão de trigo. Os autores analisaram DON e NIV em 66 amostras de grão de trigo comercial provenientes do Rio Grande do Sul e, obtiveram positividade de DON em todas amostras (média de 540  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ); NIV ocorreu em 57 amostras (média de 337

$\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). TRALAMAZZA et al. (2016) também relataram alta ocorrência natural de DON. Em 150 amostras de grãos de trigo provenientes das regiões do PR, SP e RS, 99% foram detectadas DON, cuja média apresentou  $706 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Em relação aos trabalhos internacionais, LIU et al. (2016) reportaram também alta ocorrência de DON nas amostras de farinha de trigo ( $n=672$ ). Em 91,5% das amostras positivas para DON apresentou níveis variando entre 2,4 e  $1130 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (média  $154 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). As amostras foram coletadas no mercado da Província de Hebei - China (2011 - 2013).

A Figura 3 representa a distribuição da concentração média de DON (A) e NIV (B) de acordo com locais de coleta de cada amostra (grão e farinha). DON apresentou maior concentração em média em relação a NIV, com exceção as amostras da Coop.3. DON apresentou maior ocorrência natural nas amostras da Coop. 2 e Industrias A e B (grão e farinha). DON não foi detectado (<LOQ) nas amostras de grão de trigo da Fazenda Escola (UEL). A variação da concentração de DON e NIV nas amostras de grão de trigo coletadas de diferentes locais é atribuída aos fatores climáticos (temperatura e chuva) de cada local de produção de trigo, uma vez que o os fungos produtores de tricotecenos depende desses fatores para o desenvolvimento.

A Tabela 4 apresenta em detalhes o perfil da contaminação natural de DON e NIV em trigo (grão e farinha) por CLAE-UV. A concentração de DON nas amostras de grão de trigo apresentou abaixo do limite máximo tolerável (LMT) segundo a legislação brasileira (RDC N<sup>o</sup>138 de 2017).

Embora não seja destinado à exportação, em relação às legislações internacionais, a concentração de DON apresentou superior ao LMT em duas amostras (Indústria B - Sul do PR e RS) segundo a legislação europeia (EC n<sup>o</sup> 1881, 2006) e cinco amostras (1 da Indústria A - Norte do PR; 1 da Coop. 2 - Norte do PR; 3 da Indústria B - Sul do PR, RS e Paraguai) segundo a legislação japonesa (N<sup>o</sup> 0521001-MHLW-2002).

Em média, os níveis de DON nas amostras de grão de trigo do estado do PR apresentaram inferiores ao valores relatados por Santos et. al (2013). Os autores analisaram DON em 113 amostras de grão de trigo provenientes da região Norte ( $n=73$ ) e Centro/Sudoeste ( $n=40$ ) do estado do Paraná (2008 e 2009) por método Competitivo Indireto-ELISA. DON foi detectado em 75% das amostras da região Centro/Sudoeste com níveis variando entre 206,3 e  $4651,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (média de  $1689,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e 61,6% das amostras da região Norte com níveis variando entre 222,6 e  $4732,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (média  $2031,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

A concentração média de DON também foram inferiores ao trabalho reportado por PALACIOS et al. (2017). Segundo os autores, 30% das 84 amostras de grão de trigo argentino provenientes de três regiões de Sul de Buenos Aires (safra 2013/14), apresentaram níveis de DON acima do LMT pela Comissão Européia (EC N° 1881/2006).

Em relação as amostras de farinha de trigo, duas amostras da Indústria B (Sul do PR e RS) apresentaram níveis de DON acima da LMT pela legislação brasileira, europeia e japonesa. SILVA et al. (2018) também relataram concentração de DON acima LMT nas amostras de farinha de trigo. Entre 172 amostras adquiridas pela Vigilância Sanitária Municipal e Estadual do Paraná, envolvendo 49 municípios, DON foi detectado em 134 amostras com níveis variando entre 73,5 e 2794,6  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (média 234  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Quatro amostras apresentaram concentrações acima do LMT pela legislação brasileira e seis, da legislação européia.

Embora a ocorrência de DON é frequentemente reportada na farinha de trigo nacional, é necessário ressaltar que a contaminação de DON, assim como NIV, na farinha de trigo não deve ser assimilada com a contaminação de grão de trigo produzido no território nacional, uma vez que o país depende da importação da matéria-prima (grão de trigo) para atender o consumo interno. Segundo a CONAB (2018), no período de 2016/2017, o consumo gerado pela indústria nacional de moagem de trigo foi de 11,2 milhões toneladas, sendo que a produção interna para o mesmo período foi 6,7 milhões de toneladas. Para atender o consumo interno, o país importou cerca de 4,5 milhões de toneladas, principalmente, do MERCOSUL (Argentina, Paraguai e Uruguai), Canadá e Estados Unidos.

O processo de moagem realizada pela Indústria B promoveu a redução das concentrações de DON e NIV, com exceção as amostras de farinha da região Sul do PR e Paraguai (Tabela 5). A Comissão de Segurança Alimentar do Japão (2010) relatou a redução das concentrações de DON e NIV durante a moagem de trigo através de um estudo com 80 amostras pré-processadas (grão) e 80 amostras pós-processadas (farinha). Segundo a comissão japonesa, o efeito da moagem reduziu DON e NIV em média de 73 e 57,7%, respectivamente.

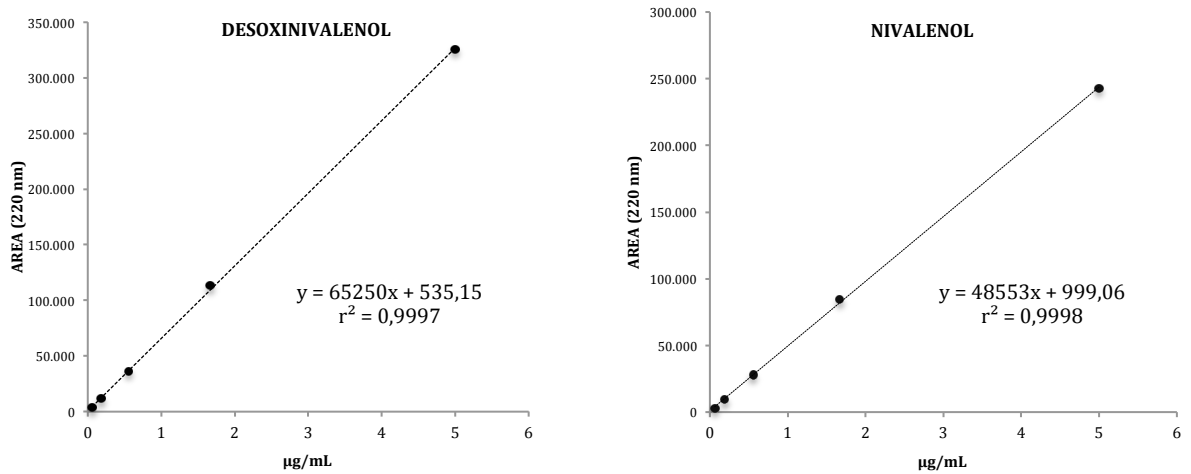
Estudos mais específicos sobre efeito da moagem sob as concentrações de DON e NIV apontam que o processo da moagem do grão desencadeia uma redistribuição dos tricotecnos em diferentes frações do trigo (EDWARDS et al., 2011; CHELI et al., 2013; TIBOLA et al., 2015).

Savi e colaboradores (2016) relataram que após a moagem do grão de trigo (n=30) contaminado com DON (média 1895  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), o tricoteceno foi detectado em média 1305

$\mu\text{g.kg}^{-1}$  na farinha de trigo e  $2278 \mu\text{g.kg}^{-1}$  no farelo. BELLUCO et al. (2017) também relatou sobre a redistribuição dos tricotecenos em diferentes frações de trigo. Segundo os autores, a concentração média de DON foi de 73% maior em farelo e 38% menor para farinha de trigo em relação ao grão limpo. O processo final da moagem espera-se na contaminação menor de DON e NIV nas frações de trigo destinadas ao consumo humano (farinha e semolina) e uma contaminação maior principalmente nas frações de trigo (farelo) destinado à alimentação animal (CHELI et al., 2010, SAMAR et al., 2003, SCOTT et al., 1984, SCUDAMORE; PATEL, 2008).

#### **4. CONCLUSÃO**

O método detecção simultânea de DON e NIV apresentou precisão e exatidão dentro das normas de exigência brasileira, sendo adequado para análise de TCTB em trigo. As matérias primas produzidas na Região Sul do PR apresentaram maior contaminação de DON. Embora em menor nível, atenção especial deve ser apontada para NIV, já que se observou uma maior tendência de ocorrência natural em relação a DON em grão estudado. Sugere-se também monitoramento contínuo de TCTB nas regiões nacionais produtoras de trigo, assim como ao produto importado (grão de trigo) que compõe quase a metade do grão destinado à industrialização.

**Figura 1.** Curva Padrão de DON e NIV por CLAE-UV.

O eixo Y representa a área (220 nm) e o eixo X a concentração de DON ( $\mu\text{g/mL}$ ).

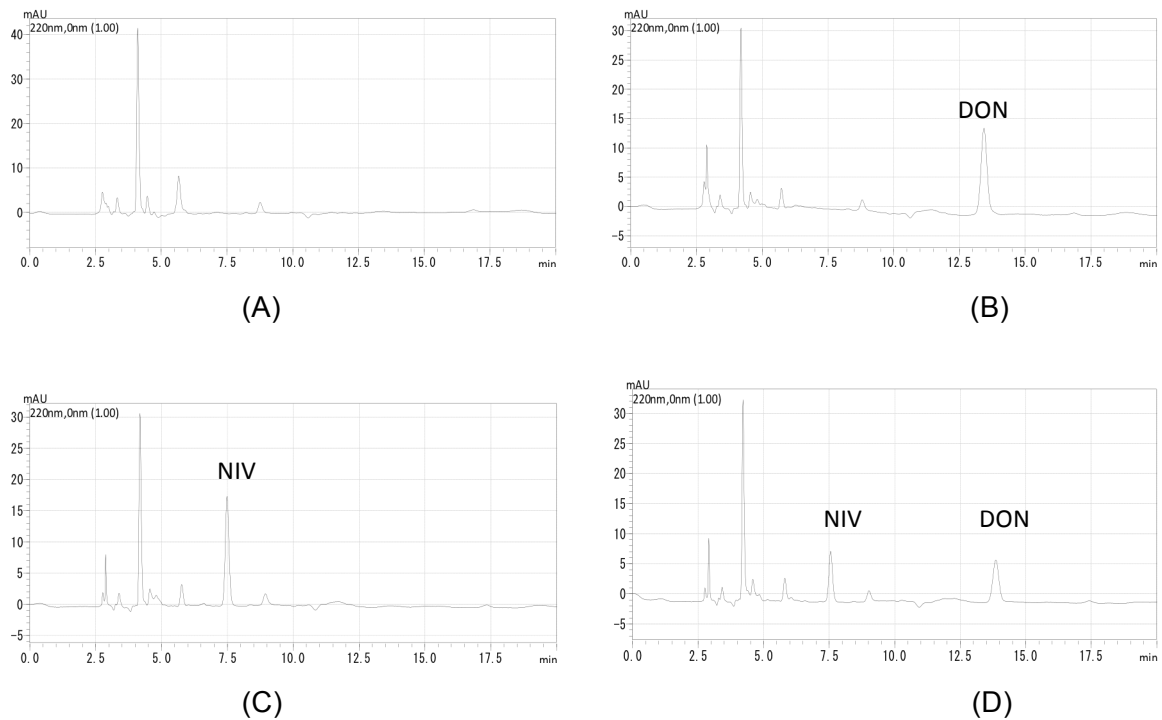
**Tabela 2.** Recuperação e repetitividade de CLAE-UV para determinação de DON e NIV em grão de trigo.

Tricoteceno	TRIGO (grão)			
	Recuperação (%)	Repetibilidade (CV, %)	Limite ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	
			LOD	LOQ
<b>DON</b>	114	0,56 - 2,72	7	21
<b>NIV</b>	95	1,71 - 2,98	7	21

\*CV= Coeficiente de Variação aceitável, <5,0% (DON e NIV - 185; 556; 1.667  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  - foi adicionado em grão de trigo integral triturado e peneirado a 50 mesh e mantido *overnight* a -20°C e, descongelada a 24°C por 1 hora).

\*LOD: Limite de Detecção

\*LOQ: Limite de Quantificação

**Figura 2.** Perfil cromatográfico de trigo grão integral analisado por CLAE-UV.

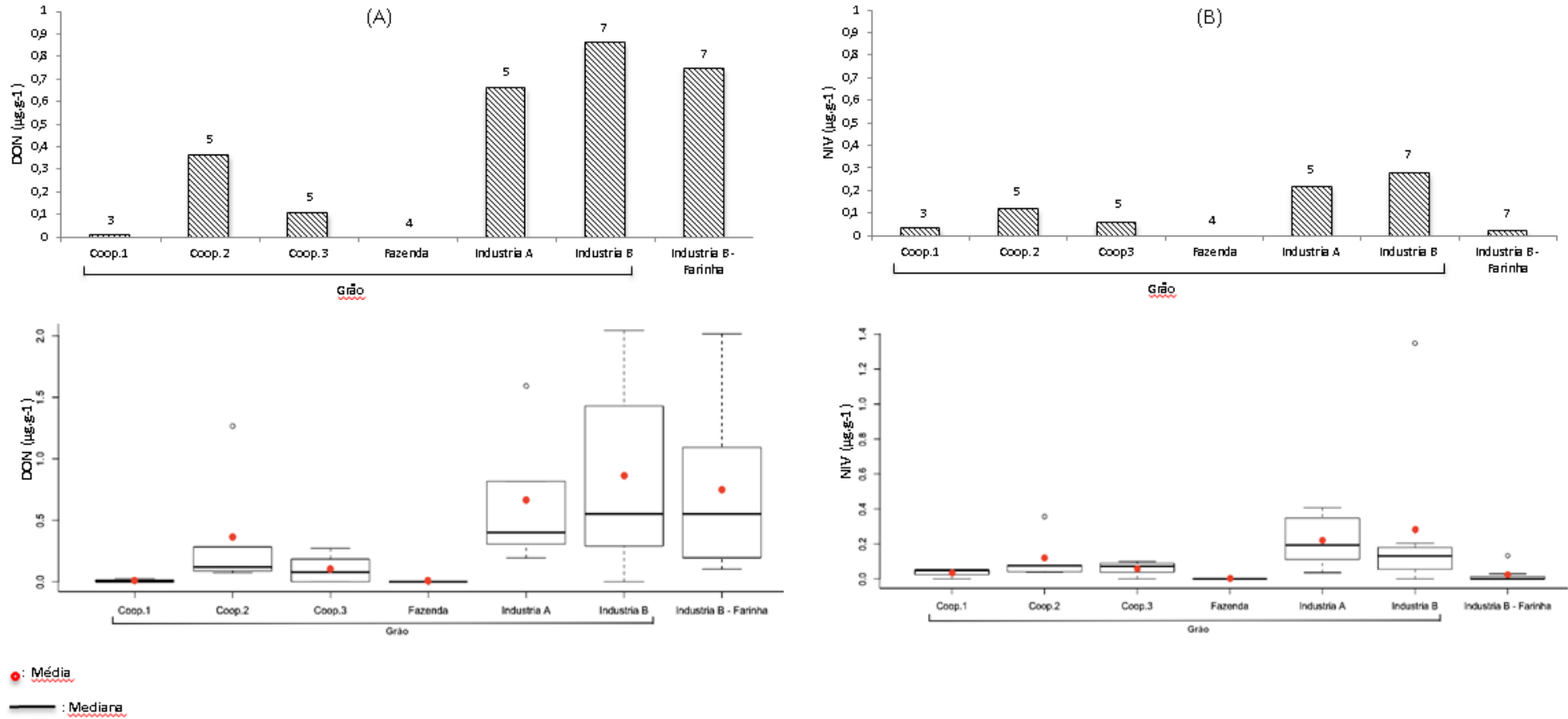
(A) - trigo não contaminado; (B) – contaminação artificial com DON ( $1,67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ );  
 (C) - contaminação artificial com NIV ( $1,67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ); (D) - contaminação artificial com DON + NIV ( $1,67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

**Tabela 3.** Ocorrência natural de DON e NIV em trigo e farinha destinadas ao processamento avaliada por CLAE-UV.

Trigo	Nº	DON			NIV			Co-ocorrência
		Positivas (%)	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		Positivas (%)	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		DON + NIV (%)
			Média*	Faixa*		Média*	Faixa*	
Farinha	07	07 (100)	749	102 - 2016	02 (28,6)	81,5	30 - 133	2 (28,6)
Grão	29	20 (68,9)	586,4	26 - 2044	22 (75,8)	183,7	32 - 1348	17 (58,6)

\*: médias de amostras positivas.

**Figura 3.** Média e Mediana de DON (A) e NIV (B) em trigo (grão e farinha) \* e boxplot correspondente\*, considerando diferentes procedências.



\*:compilando a análise com todas as amostras, i.e., positivas e negativas.

**Tabela 4.** Perfil da contaminação natural de DON e NIV em trigo (grão e farinha para processamento) por CLAE-UV, Estado do Paraná.

REGIÃO	TRIGO				MICOTOXINAS ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )															
	Tipo	Safr	Local	Nº	POSITIVIDADE			DON					NIV					Recomendação Estimada****		
					Total	%	DON+ NIV, % (co-ocorrência)	AMOSTRA			LEGISLAÇÃO / RECOMENDAÇÃO			AMOSTRA						
								Positiva	%	Média*	Faixa	$\geq\text{EC}^{**}$	$\geq\text{Anvisa}^{***}$	$\geq\text{JP}^{****}$	Positiva	%	Média*		Faixa	JP
NORTE PR <sup>1</sup>	Grão	2014	Fazenda UEL	4	<LOQ	-	-	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-	<LOQ	-	-	-	-
					1	3	3	100	-	1	33,3	-	-	-	-	-	-	2	66,6	50,5
		2016	Coop. <sup>2</sup>	2	5	5	100	100	5	100	365	73 - 1266	-	-	1	5	100	118	37-356	-
				3	5	5	100	40	3	60	178	78 - 272	-	-	-	4	80	75	39-99	-
				A	5	5	100	100	5	100	662	193 - 1593	-	-	1	5	100	219	36-408	-
SUL PR (Ind. B)	Grão	2015	PR	N	1	1	100	100	1	100	507	-	-	-	-	1	100	132	-	-
				S	2	2	100	50	2	100	1057,5	71 - 2044	1	-	1	1	50	1348	-	1
				RS <sup>4</sup>	2	2	100	100	2	100	1155	552 - 1758	1	-	1	2	100	141	78-204	-
				Paraguai	2	2	100	50	1	50	1104	-	-	-	1	2ç	100	94,5	32-157	-
				Farinha	2015 Moag. <sup>5</sup>	PR	N	1	1	100	-	1	100	102	-	-	-	-	<LOQ	-
2016	RS	S	2	2	100	50	2	100	1378	739 - 2016	1	1	1	1	50	133	-	-		
Paraguai	2	2	100	-	2	100	833	218 - 1447	1	1	1	<LOQ	-	-	-	-	-			
Paraguai	2	2	100	50	2	100	361	169 - 552	-	-	-	1	50	30	-	-	-			
<b>LOD</b>											<b>7,0</b>			<b>7,0</b>						
<b>LOQ</b>											<b>21,0</b>			<b>21,0</b>						
<b>Recuperação (%)</b>											<b>114</b>			<b>95</b>						
<b>r<sup>2</sup></b>											<b>0,99971</b>			<b>0,99977</b>						
<b>Repetibilidade (CV%)</b>											<b>0,59 - 2,71</b>			<b>1,71 - 2,98</b>						

\*: Médias de amostras positivas.

**DON**EC\*\*: EC 1881 de 2016 considera o LMT para DON em grão e farinha de trigo de 1750 e 750  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente.ANVISA\*\*\*: RDC N<sup>o</sup> 138 de fevereiro de 2017, considera o LMT para DON em grão e farinha de trigo de 3000 e 1000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente.JP\*\*\*\*: N<sup>o</sup> 0521001-MHLW-2002, considera LMT para DON em trigo de 1100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .**NIV**JP\*\*\*\*\*: Não consta LMT. O programa *Health & Labour Sciences Research* do Japão em 2010 propôs exposição simulatória a NIV em quatro níveis de LMT conforme faixa etária.\*\*\*\*\*: Estimando LMT de NIV em 500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de trigo. O valor simulatório foi calculado considerando consumo de alimento contendo 95% de trigo contaminado com 500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (corresponde a <0,4  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de por peso corpóreo por dia, faixa etária de 1 - 6 anos).<sup>1</sup>: Paraná; <sup>2</sup>: Cooperativa; <sup>3</sup>: Indústria; <sup>4</sup>: Rio Grande do Sul; <sup>5</sup>: MoagemLOD: Limite de Detecção; LOQ: Limite de Quantificação; r<sup>2</sup>: Coeficiente de Correlação.

**Tabela 5.** Diferença de níveis de DON e NIV após o processamento de grão de trigo em farinha.

TRIGO													
Indústria	Região	Município	Safr	GRÃO				FARINHA				DIFERENÇA (grão vs farinha)	
				Armazenagem		Micotoxinas ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ )		Armazenagem		Micotoxinas ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ )		DIFERENÇA (%)	
				Silo	Capacidade (t)	DON	NIV	<i>Big bags</i>	Capacidade (t)	DON	NIV	DON	NIV
A	PR	Sertanópolis	2016	1	2,64	399	112	-	-	-	-	-	-
				2	2,57	193	36	-	-	-	-	-	-
				3	2,57	815	348	-	-	-	-	-	-
				4	2,85	1593	408	-	-	-	-	-	-
				5	2,28	307	194	-	-	-	-	-	-
							Moagem em 2016 (correspondente a safra 2015)						
B	Norte PR	-	2015	6	-	507	132	A	1,2	102	<LOQ	-79,9	-84,1
	Sul PR	Candói		7	-	2044	1348	B	1,2	2016	133	-1,4	-90,1
		São João		8	-	71	<LOQ	C	1,2	739	<LOQ	+1040	-
	RS	Centro		9	-	552	78	D	1,2	218	<LOQ	-60,5	-73,1
		Passo Fundo		10	-	1758	204	E	1,2	1447	<LOQ	-17,7	-89,7
	Paraguai	Obligado		11	-	1104	157	F	1,2	552	30	-50	-80,9
		-		12	-	<LOQ	32	G	1,2	169	<LOQ	+804,7	-34,3

<LOQ: Foi considerado valor igual a  $21\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITRIGO - Associação Brasileira da Indústria de Trigo. Importação de Trigo 2017. Disponível em: <[http://www.abitrigo.com.br/associados/arquivos/importacao\\_trigo.pdf](http://www.abitrigo.com.br/associados/arquivos/importacao_trigo.pdf)>. Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018.

AOYAMA, K.; AKASHI, H.; MOCHIZUKI, N.; ITO, Y.; MIYASHITA, T.; LEE, S.; OGISO, M.; MAEDA, M.; KAI, S.; TANAKA, H.; NORIDUKI, H.; HIRAOKA, H.; TANAKA, T.; ISHIKURO, E.; ITOH, Y.; NAGAYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; NAITO, S.; SUGITA-KONISHI, Y. Interlaboratory Study of LC-UV and LC-MS Method for the Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Wheat. **Journal of Food Hygiene and Safety**, v. 53 (3), p. 152- 156, 2011.

ATANDA, S. A.; AINA, J. A. ; AGODA, S. A.; USANGA, O. E.; PESSU P. O. Mycotoxin Management in Agriculture: a Review. **J. Anim. Sci. Adv.**, n. 2 (Suppl. 3.1), p. 250-260, 2012.

BANDO, E., GONÇALES, L., TAMURA, N. K., & MACHINSKI, M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43(3), p.175-180, 2007.

BECHER, R., MIEDANER, T., WIRSEL, S.G.R. Biology, diversity, and management of FHB-causing fusarium species in small-grain cereals. F. Kempken (Ed.), *The Mycota XI. Agricultural applications* (2nd ed.), Springer Verlag, Berlin , p. 199, 2013.

BELLUCO, B.; DE CAMARGO, A.C; DE GLORIA, E. M.; DO SANTOS DIAS, C.T.; BUTTON, D. C.; CALORI-DOMINGUES, M. A. Deoxynivalenol in wheat milling fractions: A critical evaluation regarding ongoing and new legislation limits. **Journal of Cereal Science**, v. 77, p. 284 - 290, 2017.

BENNETT, J.W., KLICH, M. *Clinical Microbiology Review*, v. 16, p. 3, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE no. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No 38, 30 de Novembro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de dezembro 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, 22 de fevereiro de 2011.

BRIYONES-REYES, D.; GOMÉZ-MARTINEZ, L.; CUERVA-ROLÓN, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, México. **Food Chemistry**, v.100, p.693-698, 2007.

BRYŁA, M., KSIENIEWICZ-WOŹNIAK, E., WAŚKIEWICZ, A., SZYMCZYK, K., JĘDRZEJCZAK, R. Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples. **Food Control**, vol. 92, pp 319-324, 2018.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; BLUM, M.M.C.; BOGO, A.; SCHEER, O.; ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.289-293, 2004.

CAVALIERE, C.; D'ASCENZO, G.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. **Food Chemistry**, v.92, p.559-568, 2005.

CHAMPEIL, A.; FOURBERT, J. F.; DORÉ, T.; ROSSIGNOL, L. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. **Crop Protection**, v.23, p.531-537, 2004.

CHELI, F.; CAMPAGNOLI, A.; VENTURA, V.; BRERA, C.; BERDINI, C.; PALMACCIO, E.; DELL'ORTO, V. Effects of industrial processing on the distributions of deoxynivalenol, cadmium and lead in durum wheat milling fractions. **Food Science and Technology**, v. 43 (7), p. 1050 - 1057, 2010.

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

COMUNIDADE EUROPÉIA. Commission Regulation (EC) n. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 70, p. 12-34, 2006. Disponível em: <<https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es401-2006.pdf>>. Acesso em: 18 de setembro de 2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. 4º Levantamento de grãos- Safra 2017/2018. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/noticias/safra-de-graos-poder-atingir-227-9-milhoes-de-toneladas-em-2017-2018/AcompanhamentodaSafraBrasileiradeGros4Levantamento20172018.pdf>>. Acesso em 15 de Maio de 2018.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Trigo - Análise Mensal - Fevereiro 2018. Disponível em:< <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-trigo>>. Acesso em 20 de Maio de 2018.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. A Cultura do Trigo. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-trigo>>. Acesso em 10 de Junho de 2018.

CONKOVÁ, E.; LACIAKOVÁ, A.; KOVÁČ, G.; SEIDEL, H. Fusarial toxins and their role in animal diseases. **The Veterinary Journal**, v.165, p. 214-220, 2003.

CUNHA, G. R da. Oficina sobre trigo no Brasil: bases para a construção de uma nova triticultura brasileira. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107847/1/2009-cunha-oficina-de-trigo-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 17 de Julho 2017.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. Maurício C.; PIEROBOM, Carlos R. and BERGSTROM, Gary C. Giberela do trigo: aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatol. bras.** 2004, vol.29, n.6, pp.587-605.

DEL PONTE, E. M., GARDA-BUFFON, J., BADIÁLE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, vol. 132 (2), 1087-1091, 2012.

DWEBA, C.C.; FIGLAN, S.; SHIMELIS, H.A.; MOTAUNG, T.E.; SYDENHAM, S.; MWADZINGENI, L.; TSILO, T.J. Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. **Crop Protection**, vol. 91, 114-122 p, 2017.

EDINBORO, L. E.; KARNES, H. T. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub> in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1083, p.127-132, 2005.

EDWARDS, S.G.; DICKIN, E. T.; MACDONALD, S., BUTTLER, D., HAZEL, C.M., PATEL, S., SCUDAMORE, K.A. Distribution of Fusarium mycotoxins in UK wheat mill fractions. **Food Additives and Contaminants**, vol. 28, pp. 1694-1704, 2011.

European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *European Food Safety Authority Journal*, 11, pp. 3262-3381, 2013.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cereal Supply and Demand Brief. Disponível em: <<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>>. Acesso em 17 de Julho de 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Food Situation. Disponível em: < <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>>. Acesso em 15 de Maio de 2018.

Food and Agriculture Organization, World Health Organization (FAO/WHO). Safety evaluation of certain contaminants in food. WHO Food Additives Series No. 63 World Health Organization, Geneva, 2011. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241660631\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241660631_eng.pdf)>. Acesso em 25 de Abril 2018.

Food Safety Commission of Japan. Risk assessment report. Deoxynivalenol and nivalenol (mycotoxin). FS/872/2010. Disponível em: <[http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/nm\\_toxins/rar\\_donniv\\_fs872\\_2010\\_nm.pdf](http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/nm_toxins/rar_donniv_fs872_2010_nm.pdf)>. Acesso em 26 de Abril de 2018.

FREIRE, F., VIEIRA, I., GUEDES, M., & MENDES, F. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, No. 110, 48 p. 2007.

HUANG, X. H., ZHANG, X. H., LI, Y. H., WANG, J. L., YAN, X., XING, L. X. Carcinogenic effects of sterigmatocystin and deoxynivalenol in NIH mice. **Chinese Journal of Oncology**, v. 26, n. 12, p. 705-708, 2004.

JENNINGS, P., COATES, M. & TURNER, J.A. 2004. Distribution, toxin production and control of *Fusarium* head blight pathogens in the UK. *Proceedings of the International Symposium of Mycotoxicology in Kagawa, 2003*. New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety. Mycotoxins. In press.

JIN Z., Caro, Y., Su, A., Yu, Y., Xu, M. Increase of Deoxynivalenol during the malting of naturally *Fusarium* infected Chinese winter wheat. **Food Control**, vol. 87, p. 88-93, 2018.

Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA). Evaluation of certain food additives and contaminants. (Report of the 72nd meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Technical Report Series 958, 2010

KONGKAPAN, J., GIORGI, M., POAPOLATHEP, S., ISARIYODOM, S., POAPOLATHEP, A. Toxicokinetics and tissue distribution of nivalenol in broiler chickens. **Toxin**, v. 111, p. 31-36, 2016.

KRSKA, R. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. **Journal of Chromatography**, v. 815, p. 49-57, 1998.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.241-264, 2007.

LEE, U.-S.; JANG, H.-S.; TANAKA, T.; TOYASAKI, N.; SUGIURA, Y.; OH, Y. J.; CHO, C.M.; UENO, Y. Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, Issue 6, P. 1258-1260, 1986.

LEE, Y.W, JEON, J.J, KIM, H.S, JANG, I.Y & YUN S.H. 2004. Lineage composition and trichothecene production of *Gibberella zeae* population in Korea. *Proceedings of the International Symposium of Mycotoxicology in Kagawa, 2003*. New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety. Mycotoxins. In press.

LIU, Y., LU, Y., WANG, L., CHANG, F., YANG, L. Occurrence of deoxynivalenol in wheat, Hebei Province, China. **Food Chemistry**, v.197 (Parte B), p. 1271 - 1274, 2016.

MATEO, J.J.; MATEO, R.; HINOJO, M.J.; LLORENS, A.; JIMÉNEZ, M. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. **Journal of Chromatography A**, v.955, p.245-256, 2002.

MENEELY, J.P., RICCI, F., VAN EGMOND, H.P., ELIOTT, C.T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30 (2), 192-203, 2011.

McMULLEN, M., JONES, R., GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, v. 81, 1340-1348 p, 1997.

- MILLER, J.D., Greenhalgh, R. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. **Mycologia**, v. 83, p.121–130, 1999.
- NIELSEN, L.K., COOK, D.J., EDWARDS, S.G., RAY, R.V. The prevalence and impact of *Fusarium* head Blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. **International Journal of Food Microbiology**, v. 179, p.38-49, 2014.
- NURYONO, N.; NOVIANDI, C.T.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. **Food Control**, v.16, p.65-71, 2005.
- OK, H.E., LEE, S.Y., CHUN, H.S. Occurrence and simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol in rice and bran by HPLC-UV detection and immunoaffinity cleanup. **Food Control**, v. 87, p. 53-59, 2018.
- OSBORNE, L.E.; STEIN, J.M. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p. 103-108, 2007.
- OSÓRIO, E.A. A cultura do trigo. São Paulo: Globo, 1992. 218 p.
- PALACIOS, S. A., ERAZO, J. G., CIASCA, B., LATTANZIO, V.M.T., REYNOSO, M.M., FARNOCHI, M.C., TORRES, A.M. Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in durum wheat from Argentina, v.230, p. 728-734, 2017.
- PARRY, D.W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. **Plant Pathology**, v.44, p.207-238, 1995.
- PAULITZ, T.C. *Fusarium* head blight: a re-emerging disease. **Phytoprotection**, v.80, p.127-133, 1999.
- PESTKA, J.J.; SMOLINSKI, A.T. Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, v.8, p.39-69, 2005.
- PONTE, E.M.D., GARDA-BUFFON, J., BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v. 132 (2), p. 1087-1091, 2012.
- REIS, E. M.; CASA, R, T. Patologia de sementes de cereais de inverno. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 1998.
- REIS, E. M.; CASA, R. T.; MEDEIRA, C. A. Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno. Londrina: E. S. Comunicação, p.96, 2001.
- RODRIGUES, I., HANDL, J., BINDER, E.M. Mycotoxin occurrence in commodities, feeds, and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 4, p. 168-179, 2011.
- ROSENBERG, E.; KRŠKA, R.; WISSIACK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI, E.; GRASSERBAUER, M. High-performance liquid chromatography – atmospheric-pressure

chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v.819, p.277-288, 1998.

ROTTER, B.A., PRELUSKY, D.B., PESTKA, J.J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology Environmental Health**, v. 48, p. 1-34, 1996.

SAMAR, M.M.; FONTAN, C.F.; RESNIK, S.L.; PACIN, A.M.; CASTILLO, M.D. Distribution of deoxynivalenol in wheat, wheat flour, bran and gluten, and variability associated with test procedure. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 551-556, 2003.

SANTOS, J. S. Aplicação biotecnológica: anticorpo monoclonal anti- desoxinivalenol para monitoramento e avaliação da exposição pelo consumo de trigo (*Triticum aestivum* L.). 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000151917>>. Acesso em: 03 de agosto de 2017.

SAVI, G.D., PIACENTINI, K.C., TIBOLA, C.S., SANTOS, K. SOUZA, MARIA, G.S., SCUSSEL, V.M. Deoxynivalenol in the wheat milling process and wheat-based products and daily intake estimates for the Southern Brazilian population. **Food Control**, v. 62, p. 231-236, 2016.

SCUDAMORE, K.A; PATEL, S. The fate of deoxynivalenol and fumonisins in wheat and maize during commercial breakfast cereal production. **World Mycotoxin Journal**, v.1, p. 437-448, 2008.

SILVA, M.V., PANTE, G.C., ROMOLI, J.C.Z., DE SOUZA, A.P.M., ROCHA, G.H.O.D., FERREIRA, F.D., FEIJÓ, A.L.R., MOSCARDI, S.M.P., DE PAULA, K.R., BANDO, E., NERILO, S.B., MACHINSKI, M.JR. Occurrence and risk assessment of population exposed to deoxynivalenol in foods derived from wheat flour in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 35 (3), p. 546 - 554, 2018.

SMITH, T.K, MCMILLAN, E.G., CASTILLO, J.B. Effect of feeding blends of *Fusarium* mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. **Journal of Animal Science**, v. 75 (25), p. 2184-2191, 1997.

SNIJDERS, C.H.A. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichotecene formation. **Toxicology Letters**, v.153, p.37-46, 2004.

SCUSSEL, V. M. Fungos e micotoxinas associados a grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. Armazenagem de grãos. Campinas: Instituto Bio Geneziz, p. 674-804, 2002.

SUTTON, J.C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.4, p.195-209, 1982.

TANAKA, T., YOSHIKAWA, T., TANAKA, H., SUGIURA, Y., TAKATORI, K. & KUMAGAI S. 2004. Food contamination of trichothecenes in Japan. *Proceedings of the*

*International Symposium of Mycotoxicology in Kagawa, 2003*. New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety. Mycotoxins. In press.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: ITAL/Núcleo de Microbiologia, 2001.

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

TIBOLA, C.S.; FERNANDES, J.M.C.; GUARIENTI, E.M.; NICOLAU, M. Distribution of *Fusarium* mycotoxins in wheat milling process. **Food Control**, v. 53, p. 91-95, 2015.

USDA -UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Economic Research Service. Washington: USDA, 2018. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf>>. Acesso em: 20 de Ju de 2018.

WANG, Y.Z. Epidemiology and management of wheat scab in China. Anais, *Fusarium head scab: global status and future prospects*, Mexico, p.97-105, 1997.

WOLF-HALL, C.E., HANNA, M.A., BULLERMAN, L.B. Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 962-964, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental health criteria 105 selected mycotoxins: Ochratoxins, trichothecenes, ergot. Trichothecenes. World Health Organization, Geneva, p. 71-154, 1990.

YOSHIDA, M., NAKAJIMA, T. Deoxynivalenol and Nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. **Phytopathology**, v. 100, p. 763-773, 2010.

ZHENG, Y., HOSSEN, S.M., SAGO, Y., YOSHIDA, M., NAKAGAWA, H., NAGASHIMA, H., OKADOME, H., NAKAJIMA, T., KUSHIRO, M. Effect of milling on the content of deoxynivalenol, nivalenol, and zearalenone in Japanese wheat. **Food Control**, v. 40, p. 193-197, 2014.

ZÖLLNER, O.; MAYER-HELM, P. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1136, p.123–169, 2006.

ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; LIDNER, W. Determination of zearalenone in grains by highperformance liquid chromatography – tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP- 18 columns or immunoaffinity columns. *Journal of Chromatography A*, v.858,p.167-174,1999.