

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Ocorrência de *Fusarium graminearum* e desoxinivalenol  
em grãos de trigo utilizados no Brasil**

**Renata Rodrigues de Almeida**

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de Mestre em Ciências. Área de  
concentração: Ciências e Tecnologia de  
Alimentos

**Piracicaba  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Renata Rodrigues de Almeida  
Licenciada em Ciências Biológicas

**Ocorrência de *Fusarium graminearum* e desoxinivalenol  
em grãos de trigo utilizados no Brasil**

Orientador:

Prof. Dr. **CLAUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciências e  
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba  
2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Almeida, Renata Rodrigues de  
Ocorrência de *Fusarium graminearum* e desoxinivalenol em grãos de trigo utilizados no  
Brasil / Renata Rodrigues de Almeida. - - Piracicaba, 2006.  
59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Contaminação de alimentos 2. Fungo fitopatogênico 3. Fusariose 4. Fusarium  
5. Micotoxinas 6. Trigo I. Título

CDD 633.11

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

*Agradeço aos meus pais, Seu Bernardo e Dona Ivone, pela vida e por todos os caminhos que eles indicaram e, muitas vezes, abriram para que eu pudesse continuar. A eles minha total gratidão. Aos meus avós Joaquim e Maria Luiza, por me ensinarem os valores da vida. À tia Ilda minha eterna gratidão. Aos meus irmãos Fernanda e André meus grandes amigos.*

*Sem eles, não seria capaz de concluir esse trabalho e por isso,*

**DEDICO**



À Helena Maria Carmignani Pescarin Chamma do Laboratório de Sementes – ESALQ – USP, pela disponibilização da infraestrutura e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Micotti da Glória, pela amizade.

Agradeço às mestrandas Alessandra e Geórgia do LABMIC – ESALQ/USP, pela convivência, incentivo e amizade.

À mestranda Cristiane Cassiolato Pires Hardoim e Pablo R. Hardoim, pela grande amizade e convivência.

Meu muito obrigada às empresas que disponibilizaram os grãos de trigo, em especial à Bruna (Moinho Anaconda), Carolina (Agrocervice) e Luciana (Correcta).

À Sâmia, eterna amiga.

À Sílvia e Ortiz, obrigada pela amizade.

Aos meus amigos Piracicabanos, pela força e amizade.

Aos amigos conquistados do Laboratório de Patologia de Sementes ESALQ/USP.

Às Bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Sílvia Maria Zinsly, muito obrigada pela correção da dissertação, apoio e incentivo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP em especial ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela oportunidade.

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

Muito Obrigada.

*“Nenhuma meta na vida é impossível de ser alcançada quando se realmente quer atingi-la”*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE TABELAS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Fusariose na cultura do trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	14
2.2 Condições favoráveis à produção de micotoxinas .....	16
2.3 Caracterização e efeitos tóxicos do desoxinivalenol (DON).....	18
2.4 Ocorrência de desoxinivalenol (DON) em trigo .....	20
2.5 Correlação entre infecção fúngica e presença de DON .....	22
2.6 Distribuição das micotoxinas no processo de moagem do trigo e efeito do processamento .....	24
2.7 Legislação .....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Amostras utilizadas .....	27
3.2 Preparo das amostras .....	27
3.3 Determinação de atividade de água ( $a_w$ ).....	28
3.4 Teor de umidade dos grãos (U%) .....	28
3.5 Peso de mil grãos (PMG) .....	28
3.6 Determinação da porcentagem de grãos giberelados (GG%).....	29
3.7 Avaliação da microbiota fúngica.....	29
3.8 Avaliação da contaminação por desoxinivalenol .....	30
3.9 Determinação do limite de detecção do método empregado .....	31
3.10 Determinação do limite de quantificação do método empregado.....	31
3.11 Análise estatística .....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Amostras utilizadas .....	33
4.2 Determinação da atividade de água ( $a_w$ ) e teor de umidade dos grãos (U%) .....	34

4.3	Peso de mil grãos (PMG) e grãos giberelados (GG).....	35
4.4	Avaliação da microbiota fúngica.....	36
4.5	Concentração de desoxinivalenol (DON) .....	41
4.5.1	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	41
4.5.2	Controle de qualidade analítico – Teste de recuperação .....	42
4.5.3	Controle de qualidade analítico – Amostra referência .....	43
4.5.4	Contaminação com DON das amostras avaliadas .....	43
4.6	Análises de correlação .....	45
5	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICES.....	57

## RESUMO

### Ocorrência de *Fusarium graminearum* e desoxinivalenol em grãos de trigo utilizados no Brasil

As condições climáticas presentes nas regiões produtoras de trigo, do Brasil e dos principais países do qual o produto é importado, favorecem o aparecimento de doenças importantes desta cultura, dentre elas a fusariose, causada principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum* Schwabe. Além dos danos diretos causados pela doença, os grãos infectados podem ser tóxicos para o homem e animais devido à presença de micotoxinas especialmente o desoxinivalenol (DON). Um total de 100 amostras de trigo, sendo 50 de trigo nacional (provenientes do Estado de São Paulo, Paraná e Rio grande do Sul) e 50 de trigo importado (Argentina e Paraguai) foram coletadas de empresas que normalmente comercializam ou processam trigo durante o período de maio a dezembro de 2005. Foram avaliados o percentual de frequência de fungos, especialmente *Fusarium graminearum*, a contaminação com DON, percentual de grãos giberelados e realizadas correlações entre os parâmetros avaliados. Os resultados indicaram que frequência média de *Fusarium graminearum* e *F. spp.* foram baixas ( $\leq 2,6$  e  $\leq 3,6\%$ , respectivamente), porém foi maior no trigo nacional do que no trigo importado. Do total de amostras avaliadas 94% do trigo nacional e 88% do trigo importado apresentaram-se contaminadas com DON em níveis médios de  $332 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (nacional) e  $90 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (importado). Existiu correlação positiva e significativa entre contaminação com DON e percentual de grãos giberelados ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,0001$ ), frequência de *Fusarium graminearum* ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,0001$ ) e frequência de *Fusarium spp.* ( $r = 0,86$ ;  $p < 0,0001$ ).

Palavras chave: *Fusarium graminearum*, desoxinivalenol, trigo, ocorrência, fusariose

## ABSTRACT

### ***Fusarium graminearum* and deoxynivalenol occurrence in wheat kernels used in Brazil**

The climatic conditions present in wheat producing areas from Brazil and main countries from which the product is imported favor the occurrence of important diseases in this crop, among them the Fusarium Head Blight or scab. It is mainly caused by the fungus *Fusarium graminearum*. Besides, direct damages caused by this disease, the infected kernels may be toxic for humans and animals due to presence of mycotoxins (e.g deoxynivalenol). A total of 100 wheat samples, being 50 from national production (São Paulo, Paraná and Rio Grande Do Sul states) and 50 from imported one (Argentina and Paraguay), were collected during the period of May to December 2005 from companies that normally commercialize or process wheat. Frequency (%) of fungi occurrence, specially *Fusarium graminearum* and *Fusarium* spp., DON contamination and *Fusarium* damaged kernels (%) were evaluated. Correlations between the evaluated parameters were carried out. Frequency of *Fusarium graminearum* and *Fusarium* spp. were low ( $\leq 2.6$  and  $\leq 3.6\%$ , respectively), however it was higher in Brazilian wheat when compared with imported wheat. Ninety-four percent of national wheat samples and 88% of the imported samples were DON contaminated (mean levels,  $332 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $90 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively). The occurrence of DON was highly correlated with percentage of *Fusarium* damaged kernels, ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,0001$ ), percentual frequency of *Fusarium graminearum* ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,0001$ ) and percentual frequency of *Fusarium* spp. ( $r = 0,86$ ;  $p < 0,0001$ ).

Key-words: deoxynivalenol, *Fusarium graminearum*, wheat, scab, occurrence

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Distribuição da origem das amostras de trigo utilizadas .....	33
Tabela 2 - Resultados médios da avaliação da atividade de água ( $a_w$ ) e teor de umidade (U%) das amostras de trigo nacional e importado.....	34
Tabela 3 - Resultados médios da avaliação do peso de mil grãos (PMG) e grãos giberelados (GG) das amostras de trigo nacional e importado .....	36
Tabela 4 - Valores da infecção fúngica, em percentagem, nos grãos de trigo nacional e importado .....	36
Tabela 5 - Valores, em percentagem, dos testes de recuperação avaliados .....	42
Tabela 6 - Contaminação por DON ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) nas amostras de trigo nacional e importado. ....	43
Tabela 7 - Correlação entre contaminação com DON e os parâmetros %GG, % <i>F.g.</i> , % <i>F.spp.</i> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum L.*) é o cereal mais cultivado no mundo e apresenta grande importância na alimentação humana sendo considerado uma das principais fontes de nutrientes.

A produção brasileira de trigo no período de 2001 a 2005 variou de 3,0 a 5,8 milhões de toneladas com um consumo na ordem de 10 milhões de toneladas. No mesmo período a região Sul foi responsável por cerca de 90% da produção brasileira de trigo. A demanda interna exigiu que o país importasse cerca de 50 a 70% do que foi consumido, em função da produção nacional. Os principais países fornecedores de trigo para o Brasil foram Argentina, Estados Unidos e Paraguai (FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO, 2006).

As condições climáticas das principais regiões produtoras de trigo, do Brasil e dos países tradicionalmente fornecedores, favorecem o aparecimento de doenças importantes dessa cultura, dentre elas a fusariose (ou giberela), causada principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum* Schwabe. No Brasil, a fusariose alcançou o *status* de principal doença nas regiões tritícolas, principalmente na região Sul do país (DEL PONTE et al., 2004).

Além dos danos diretos à cultura causados pela doença, os grãos infectados podem apresentar contaminação com micotoxinas, sendo tóxicos tanto para o homem quanto para os animais. Dentre as micotoxinas destaca-se o desoxinivalenol (DON ou vomitoxina), que pode causar vômitos, distúrbios intestinais e recusa alimentar no homem e em animais, principalmente suínos.

Em trigo e outros cereais, a infecção com fungos produtores de DON e a produção de micotoxinas está relacionada principalmente com as condições ambientais no campo. A toxina uma vez produzida permanece no grão após a colheita, podendo ocorrer um aumento nos níveis de contaminação dependendo das condições de armazenamento. Além disso, pode ser encontrada em produtos de trigo processados como farinhas, pães, biscoitos e massas.

A ocorrência mundial de micotoxinas em trigo, produzidas por espécies do gênero *Fusarium* já foi detectada em inúmeros trabalhos de pesquisa. No Brasil existem

poucos trabalhos sobre a ocorrência de toxinas de *Fusarium* no trigo utilizado, seja produzido no país ou importado.

Observa-se um aumento na preocupação com a contaminação de alimentos com micotoxinas incluindo-se o DON, tanto a nível mundial como por parte de algumas empresas no Brasil. Assim, conhecer a extensão dessa contaminação poderá fornecer subsídios para os diversos segmentos envolvidos com a produção, utilização e importação de trigo bem como fiscalização e pesquisa, sempre visando garantir ao consumidor final a possibilidade ter produtos de melhor qualidade.

Neste contexto, visando avaliar a qualidade dos grãos de trigo utilizado no Brasil provenientes da produção nacional e importado, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a percentagem de infecção fúngica, especialmente *Fusarium graminearum*; avaliar a ocorrência de desoxinivalenol e verificar a correlação entre a contaminação com DON e os parâmetros avaliados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fusariose na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.)

O trigo (*Triticum aestivum* L.) foi um dos primeiros cereais utilizados para o consumo humano, sendo atualmente um dos mais cultivados em todo o mundo. Originário do sudoeste asiático foi introduzido na Índia, China e Europa onde existem relatos datando o cultivo desta espécie desde 5.000 a.C. (OSÓRIO, 1982). É uma cultura de grande importância sócio-econômica no Brasil, destacando-se o fato de que o consumo brasileiro de trigo nos últimos 3 anos foi em média 10,3 milhões de toneladas. Em contrapartida, a produção nacional no mesmo período foi em média 5,5 milhões de toneladas, demandando a importação de aproximadamente 5,4 milhões de toneladas (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006).

Nos últimos 6 anos, a Região Sul foi responsável em média por 92,5% da produção brasileira de trigo, seguido das regiões Centro-Oeste e Sudeste, sendo o Paraná o principal produtor. A Argentina é o principal país fornecedor de trigo representando 82,5%, 83,6%, 96% e 90,6%, do trigo importado pelo Brasil nos anos de 2002, 2003, 2004 e 2005, respectivamente. Países como Paraguai, Estados Unidos e Uruguai também figuram na lista dos principais exportadores de trigo para o Brasil (CONAB, 2006).

A cultura do trigo é afetada por diversas doenças, dentre as principais encontra-se a fusariose, cujo principal patógeno é o fungo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch forma anamórfica *Fusarium graminearum* (Schwabe), embora outras espécies sejam importantes em algumas regiões, como *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc. e *Gibberella avenacea* Cook forma anamórfica *Fusarium avenaceum* (Corda ex Fries) Bottalico e Perrone (2002). De ocorrência generalizada no mundo, é responsável por grandes epidemias em regiões dos Estados Unidos, Canadá, oeste e leste Europeu, Rússia, China, Argentina e também em regiões tradicionais de cultivo no Brasil. Os danos são observados em regiões tritícolas onde o clima é úmido e quente e com

níveis elevados de precipitação (acima de 48 h de molhamento) no estágio de floração do trigo (SUTTON, 1982; REIS, 1990; BERGSTROM, 1993).

A intensidade da fusariose é altamente dependente das condições climáticas para o seu estabelecimento, por isso, as epidemias variam de ano para ano (CASA et al., 2004a). De acordo com Clear e Patrick (1992) a fusariose é uma doença altamente dependente das condições climáticas durante o florescimento, durante esse período o fungo penetra facilmente no ovário e avança ao longo dos espaços intercelulares, sem resistência, tomando conta do grão. Segundo os mesmos autores infecções tardias o grão não é tão permeável à hifa e o fungo pode ficar restrito ao pericarpo ou ao embrião. Segundo os autores, períodos de exposição em umidade contínua favorece a infecção, bem como dias quentes e úmidos, umidade relativa acima de 70% e temperaturas elevadas, não inferiores a 16°C, influenciam favoravelmente o estabelecimento e o progresso da infecção por *Fusarium graminearum* em cultivares de trigo no estágio de floração.

Além de fatores climáticos, é possível que a presença de resíduos culturais, possa contribuir para o aumento do inóculo e a sobrevivência do patógeno entre as estações de cultivo exercendo uma maior pressão de inóculo (SCHAAF SMA et al., 2001). Em condições climáticas favoráveis os sinais do patógeno são facilmente observados em espiguetas afetadas, que apresentam coloração rosa-salmão, essas espiguetas atacadas formam-se grãos denominados giberelados, os quais apresentam características físicas como chocho, enrugamento e de coloração branco-rosada a pardo-clara (LIMA, 2002). Além das espiguetas, o fungo também pode colonizar o sistema radicular e porções basais da planta podendo causar necrose de tecidos e a morte de plântulas (SUTTON, 1982).

Os danos causados à produtividade de grãos na Região Sul do Brasil, de 1984 a 1994, atingiram em média 5,4% (REIS et al., 1996). Na safra de 2000, a redução da produtividade foi de 17,5% e nas safras de 2001 e 2002 foi de 13,4 e 11,6% respectivamente (CASA et al., 2004a).

As estratégias de controle da fusariose baseiam-se no desenvolvimento de cultivares resistentes e no uso de fungicidas aplicados na parte aérea durante a fase de floração; embora a utilização de fungicidas seja preconizada, dificuldades residem no

fato de se conhecer a necessidade e o momento ideal de aplicação e na tecnologia utilizada para obtenção de resultados satisfatórios (DEL PONTE et al., 2004). Com relação a variedades resistentes, poucas fontes de resistência genética foram encontradas e a introdução de tais genes em materiais de qualidade tecnológica é uma tarefa difícil e de longo prazo (LIMA; FERNANDES; PICININI, 2000). A utilização de um bom manejo como rotação de cultura, embora sua eficiência seja questionada, evitando-se plantar trigo sobre milho, pode ser importante na redução do risco de fusariose em trigo (DEL PONTE et al., 2004).

Além dos danos diretos causados na cultura do trigo pela doença, *F. graminearum* pode produzir micotoxinas, principalmente o desoxinivalenol (DON ou vomitoxina).

## **2.2 Condições favoráveis à produção de micotoxinas**

Esforços para encontrar medidas de prevenção ou controle do crescimento de fungos e produção de micotoxinas têm recebido maior atenção atualmente, o conhecimento dos fatores que governam a produção de toxinas pelos fungos é extremamente importante para o controle de qualidade dos alimentos, pois pode contribuir para o estabelecimento de medidas de prevenção durante a produção (TANIWAKI; SILVA, 2001).

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época de cultivo, colheita ou estocagem dos alimentos, podendo permanecer no grão mesmo depois que os fungos responsáveis pela produção não estejam mais presentes; contudo, o crescimento de fungos e a produção de toxinas não são sinônimos, porque nem sempre as melhores condições de crescimento coincidem com as condições para síntese de toxinas, os gêneros de fungos mais comumente associados com toxinas que ocorrem naturalmente são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (TANIWAKI; SILVA, 2001).

As condições ótimas para a produção de micotoxinas em grãos infectados são dependentes do substrato, espécies e isolado ou linhagem de *Fusarium*, além disso, é dependente principalmente de limites bem definidos de temperatura e atividade de

água (DOOHAN; BRENNAN, COOKE, 2003). Estudos envolvendo a contaminação de grãos de cevada, trigo, arroz e milho por *F. graminearum* e *F. culmorum* demonstraram que as melhores condições para produção de micotoxinas pertencentes ao grupo dos tricotecenos são temperaturas entre 25 a 28°C e atividade de água de 0,97 (GREENHALGH; NEISH; MILLER, 1983; BEATTIE et al., 1998; HOMDORK; FEHRMANN; BECK, 2000).

Ramirez, Chulze e Magan (2006) relataram que a produção de DON produzido por 2 isolados de *F. graminearum* em trigo variou consideravelmente (de 5 a 140.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) dependendo da interação entre atividade de água e temperatura, sendo que a atividade de água ótima para o crescimento estava entre 0,95 e 0,99 e temperatura ótima de 25°C.

De acordo com Molin (1999) o DON pode ser sintetizado em ambientes com temperaturas constantes e situadas entre 12 e 28°C, com ótimo entre 25-28°C e umidade do substrato entre 22 e 50% (ótimo = 50%).

Homdork, Fehrmann e Beck (2000) analisaram o nível de toxinas produzidas por *F. culmorum* em grãos de trigo com diferentes níveis de infecção inicial e condições de armazenamento. Os autores observaram que zearalenona foi acumulada em altos níveis no final do armazenamento (36 semanas) quando os grãos foram mantidos a 25°C e 90% de umidade relativa do ar UR%, enquanto que a quantidade de DON em grãos severamente infectados permaneceu inalterada sob qualquer condição avaliada; entretanto os níveis desta toxina aumentaram em amostras pouco ou moderadamente infectadas por *F. culmorum* quando em condições de UR% igual a 90% e temperatura de 25°C. Ainda segundo estes autores, condições de armazenamento de 15°C e 56% UR são apropriadas para a manutenção da boa qualidade de semente e grãos de trigo, enquanto que condições de 25°C e 73% de UR são adequadas apenas para armazenamento de grãos.

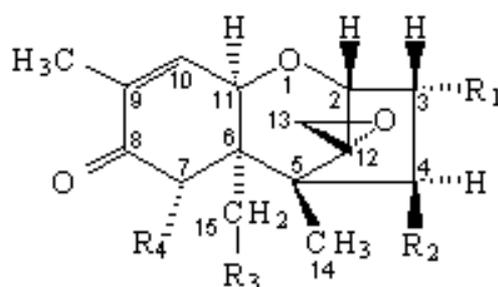
Pozzi et al. (1995) constataram correlação significativa e positiva entre a população de *Fusarium* spp. e a umidade de grãos, bem como, correlações negativa com os fatores umidade relativa do ar de 64 a 97,5 %, temperatura mínima média do ar de 18,4°C, temperatura máxima média de 24,1°C, chuva próximo a 337 mm e tempo de

armazenamento, em avaliação realizada em grãos de milho armazenados durante um ano, em Riberão Preto/SP, em sacos de 60 kg, com umidade entre 12,3 e 17,8 %.

Segundo Dieckman e Green (1992), o armazenamento de grãos de milho com umidade entre 13-14% previne o desenvolvimento de *F. graminearum*, bem como a produção de DON, sendo que, em grãos armazenados com umidade na faixa dos 22-23% o fungo cresce e produz altas concentrações dessa micotoxina.

### 2.3 Caracterização e efeitos tóxicos do desoxinivalenol (DON)

O DON é prevalente dentro do grupo dos tricotecenos, que quimicamente são derivados de um sistema aromático, chamado tricotecano. Os que ocorrem na natureza contém uma ligação olefínica no C-9, 10 e também um anel epóxi em C-12,13, o que lhes confere a denominação de “12, 13 epoxitricotecanos”. Geralmente, os átomos de carbono em posições 3,4,7,8,14 e 15 são ocupados por hidrogênio, hidroxila, grupamentos acila, epóxido adicional ou ligações éster macrocíclicas (Figura 1). Em função dos substituintes são classificados em 4 grupos com diferentes propriedades físico-químicas e toxicidade (BENNETT et al., 1990, SCOTT, 1982).



Deoxynivalenol ( $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{OH}$ ); nivalenol ( $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{OH}$ ); 3-acetyldeoxynivalenol ( $R_1 = \text{OAc}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{OH}$ ); 15-acetyldeoxynivalenol ( $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{OAc}$ ,  $R_4 = \text{OH}$ ); and fusarenon X ( $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OAc}$ ,  $R_3 = \text{OH}$ ,  $R_4 = \text{OH}$ )

Figura 1 - Estrutura química dos tricotecenos tipo B, grupo que inclui a micotoxina desoxinivalenol (DON). Fonte: (Who, 2001)

O DON tem gerado preocupações crescentes devido ao seu potencial em causar efeitos adversos sobre a saúde animal e humana (CREPPY, 2002). Efeitos tóxicos em animais têm sido bem documentados e focalizam principalmente o sistema imunológico e o trato gastrointestinal; doses agudas são caracterizadas por efeitos como diarreia, vômito, leucocitose, hemorragia, choque circulatório e por fim morte, as doses crônicas são caracterizadas por recusa alimentar, redução no ganho de peso e na absorção de nutrientes e alterações neuroendócrinas e imunológicas (LARSEN et al., 2004; PESTKA; SMOLINSKI, 2005).

O DON pode suprimir a resistência de camundongos à infecção por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, em concentrações apresentando NOEL (*non observed effect level* – nível de efeito não observado) de 0,25 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo ao dia e LOEL (*lowest observed effect level* - nível mínimo de efeito observado) de 0,12 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo ao dia, a produção de anticorpos também é afetada com NOEL de 1 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo ao dia, porém não foi demonstrado efeito carcinogênico da toxina quando administrada na alimentação de camundongos após 2 anos de estudos (CREPPY, 2002).

Existem poucos dados relativos à toxicocinética de DON em humanos. A maioria dos estudos têm sido conduzida em animais onde a variação interespecífica na biodisponibilidade oral de DON é frequentemente relatada, os suínos são a espécie modelo mais sensível ao DON e amplamente utilizados com analogia para o intestino humano, sendo este o principal sítio de absorção da micotoxina (ERIKSEN; PETTERSSON; LINDEBERG, 2003). Segundo os autores, o DON é rapidamente e eficientemente absorvido com maior probabilidade nas porções superiores do intestino delgado e é principalmente excretado através da urina, sem ocorrência de acúmulo em tecidos.

A micotoxina pode ser descrita como uma inibidora da síntese protéica afetando a subunidade ribossomal 60S (FEINBERG; MCLAUGHLIN, 1989 apud SERGENT et, al., 2006), além disso, causa diminuição do transporte de nutrientes e provoca a apoptose de células intestinais (MARESCA et al., 2002).

Casos de vômitos, náuseas, dores abdominais e diarreia em humanos já foram relatados na Ásia, estes sintomas foram correlacionados com o consumo de grãos

contaminados por *Fusarium*, e mais recentemente com a presença de DON nos grãos utilizados para o consumo humano, nas concentrações de 3.000-93.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (CREPPY, 2002). Surto de desordem gastrointestinal ocorreu no Vale do Kashmir, Índia, sendo que os sintomas apresentados pela população eram dores abdominais que ocorriam de 15 minutos a 1 hora após o consumo de pão elaborado com farinha de trigo contaminada com tricotecenos, especialmente o DON (BHAT et al., 1989).

## 2.4 Ocorrência de desoxinivalenol (DON) em trigo

A ocorrência de micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* em trigo, já foi relatada mundialmente em inúmeros trabalhos de pesquisa (PACIN et al., 1997; GONZÁLEZ et al., 1999; CREPPY, 2002; OMURTAG; BEYOGLU, 2003).

Na década de noventa, as lavouras de trigo e cevada nos Estados Unidos (Nordeste de Minnesota, Leste de Dakota do Norte e Nordeste de Dakota do Sul) e Canadá (Sul de Manitoba) foram atacadas por *F. graminearum*, sendo a severidade da doença de 20 a 80%. Além das perdas em produtividade, os grãos apresentaram altos níveis de contaminação pela toxina DON, o que gerou redução na qualidade e nos preços. Para comercializar, os compradores exigiam valor máximo de 500  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , mas apenas 19% dos grãos produzidos apresentavam esse valor (WINDELS, 2000).

Scott et al. (1984) analisaram amostras de trigo de algumas províncias do Canadá durante os anos de 1979 a 1982 e constataram contaminação com DON em níveis que variaram de 30 a 3000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Neste mesmo levantamento, constatou-se que alimentos a base de trigo para consumo também apresentaram contaminação pela toxina, sendo que os níveis médios encontrados estavam entre 43 e 400  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Em levantamento sobre a ocorrência de micotoxinas produzidas por *Fusarium* realizado por SCHOLLENBERGER et al. (2002), foi constatada que em 60 amostras de farinha de trigo provenientes do sudeste da Alemanha o DON foi a toxina predominante em 98% das amostras. Realizando um levantamento sobre a ocorrência de DON em amostras de grãos de diversos cereais produzidos na Europa (CREPPY, 2002) reportou que 57% das amostras de trigo estavam contaminadas e a variação média de contaminação estava entre 1 e 5.700  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Pacin et al. (1997) avaliaram a presença de DON em trigo, farinha de trigo, pães e massas amplamente consumidas pela população da Argentina e verificaram que 93,3% das amostras do trigo estavam contaminadas pela toxina em concentrações que variavam entre 100 e 9.250  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Foi encontrado em todas as amostras de farinha analisadas contaminação por DON (concentração média de 1.309  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), e em 92,8% das amostras dos diferentes produtos de panificação apresentando concentrações de até 2.800  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e média de 464  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Quiroga et al. (1995) realizaram um levantamento da ocorrência de tricotecenos em amostras de trigo da região de Buenos Aires e Santa Fé, na Argentina no período de 1986 a 1992, e verificaram que, das 1.056 amostras analisadas, 49,6% estavam contaminadas e o DON ocorreu em todas as amostras. Nas safras de 1985 e 1986 os níveis foram mais elevados variando de 50 a 2.400  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e nas safras de 1989, 1990, 1991 e 1992 variaram de 30 a 672  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Em monitoramento realizado no Uruguai no período de 1993 e 1995 em amostras de trigo e cevada verificou-se que o DON ocorreu em concentrações superiores a 1.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  em diversos grãos produzidos no país (PINEIRO; DAWSON, COSTARRICA, 1996)

No Brasil são escassos os trabalhos de levantamento sobre a presença de toxinas produzidas por *Fusarium* spp. em grãos de trigo consumido no país, seja ele produto nacional ou importado. Sabino et al. (1989) pesquisaram a ocorrência de DON em trigo, produtos de trigo e milho provenientes de diversas regiões do país, em 120 amostras de produtos de trigo DON foi detectado em apenas duas amostras (farelo de trigo) com contaminação de 183  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

De 38 amostras de trigo provenientes de São Paulo e de armazéns do Rio Grande do Sul analisadas por Furlong (1992), 23% estavam contaminadas com toxinas produzidas por espécies de *Fusarium*, o DON predominou, ocorrendo em 55% das amostras analisadas em níveis que variavam de 470 a 580  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Soares e Furlani (1996) avaliaram quanto a presença de micotoxinas, 38 amostras de trigo e produtos derivados vendidos em lojas de alimentos naturais na cidade de Campinas no ano de 1991 e não observaram contaminação com nenhuma micotoxina.

Um estudo realizado por Oliveira et al. (2002) sobre a incidência de DON em produtos de panificação, farinha e farelo de trigo comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998 a 2000 mostrou que a toxina foi detectada em 32 (68%) das 47 amostras analisadas, na faixa de 40 a 1.205  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Baraj e Furlong (2003) avaliaram 112 amostras de farinha de trigo comercializadas na cidade de Rio Grande (RS) e verificaram que apenas 2 amostras (1,8%) estavam contaminadas com DON em níveis de 128 e 323  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

## 2.5 Correlação entre infecção fúngica e presença de DON

As diferenças aparentes no nível de infecção fúngica entre grãos separados visualmente e classificados como leve, moderada ou severa foram confirmadas pelo teor de ergosterol e presença de DON em trabalho realizado por Seitz e Bechtel (1985), os grãos moderadamente infectados apresentavam tamanho normal e peso ligeiramente menor que os grãos normais, entretanto o teor de ergosterol e de DON (22.700  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) indicaram uma considerável infecção fúngica. Mesmo grãos classificados como levemente infectados e que tinham peso e coloração próximos ao normal, apresentavam teores de DON que variaram de 400 a 800  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Trabalho realizado por Dexter, Matsuo e Martin (1996), no sul de Manitoba (Canadá), com amostras de trigo consideradas como abaixo do padrão de classificação devido à presença de grãos giberelados, indicou que conforme se aumentava o nível de infecção fúngica aumentavam também os níveis de DON. Eskola, Parikka e Rizzo (2001) estudando a ocorrência de micotoxinas e infecção fúngica em grãos de trigo, centeio, aveia e cevada na Finlândia, detectaram a presença de DON, nivalenol e toxina HT-2. *Fusarium avenaceum* foi a espécie mais comum dentro do gênero *Fusarium* nos grãos de cereais, além disso, a maioria das amostras contaminadas por DON apresentavam infecção por este fungo. Os níveis de DON variavam entre 5 -115  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Gonzáles et al. (1999) realizando um levantamento da população de fungos em amostras de trigo durum na principal área produtora da Argentina, verificaram que *Alternaria alternata* era o fungo prevalecente, seguido de *F. graminearum*, o estudo

demonstrou correlação positiva entre *F. graminearum* e DON que estava presente em 45% das amostras em concentrações variando entre 26 e 6.400  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Em estudo realizado por Dalcerro et al. (1997) durante 1 ano para avaliar incidência natural de fungos e presença de DON na ração utilizada para alimentação de aves na província de Córdoba, Argentina, mostrou que 98% das amostras estavam contaminadas com fungos do gênero *Penicillium*, o segundo gênero de maior frequência foi o *Fusarium* (87% das amostras), dentro da qual foram identificadas as espécies *F. moniliforme* (73%), *F. subglutinans* (35%), *F. graminearum* (20%) e *F. proliferatum* (12%) os autores encontraram a toxina em 8% das amostras analisadas com concentração variando entre 240 a 410  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Gonzales et al. (1996), nesta mesma região produtora, também verificaram que o gênero *Fusarium* foi predominante em grãos de trigo, em especial *F. graminearum*, e os autores observaram que 75% das amostras estavam contaminados com DON existindo uma correlação entre densidade relativa de *F. graminearum* e DON.

Lori et al. (2003) relacionaram a presença de *F. graminearum* com a contaminação de DON em amostras de trigo durum em duas colheitas consecutivas em diferentes localidades da Argentina. Estes autores verificaram que todos os 20 cultivares avaliados foram infectados pelo fungo, na primeira colheita a incidência fúngica foi baixa (10,2%) e a toxina foi detectada em 55% das amostras, sendo que apenas 10% destas possuíam concentrações superiores a 2.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , no segundo ano, a invasão fúngica foi superior, chegando a 42% nas regiões mais úmidas, e a micotoxina estava presente em 78,2% das amostras, das quais 31,6% apresentavam concentrações elevadas tais como 8.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Azcarate, Vaamonde e Fernandez-Pinto (2006) avaliaram a frequência de espécies de *Fusarium* e *Alternaria* com a ocorrência de micotoxinas em amostras de trigo da região sudeste da província de Buenos Aires e na província dos Pampas, no biênio 2004-2005, eles avaliaram 32 amostras, sendo detectados níveis da contaminação fúngica de 100% para a espécie de *Alternaria* e 56,3% para a espécie de *Fusarium*. No referido trabalho, todas as amostras apresentaram contaminação com a toxina DON com níveis que variaram de 58 a 1.970  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , e 5 das 20 amostras foram

positivas para a toxina ácido tenuazóico (TA) produzidos por *Alternaria alternata* com níveis que variaram de 1.682 a 6.795  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

## **2.6 Distribuição das micotoxinas no processo de moagem do trigo e efeito do processamento**

O DON pode ser produzido e permanecer no grão após a colheita, podendo aumentar em níveis de concentração dependendo das condições de armazenamento além disso a toxina é capaz de manter-se ativa após o processamento do grão e conversão em alimento ou bebida, pode ser encontrado nas farinhas, pães, biscoitos, cereais matinais, massas e alimentos para bebês (CREPPY, 2002), podendo ser detectada também em cerveja.

Pelas características de infecção no grão as frações de moagem de trigo podem estar contaminadas com a toxina, frações como farelo podem ter maior teor de DON e zearalenona que as farinhas (SEITZ; BECHTEL, 1985).

A contaminação com DON entre os produtos da moagem do trigo ocorre em todas as frações obtidas no processo, o padrão de distribuição entre as frações tem mostrado que o farelo e o farelinho ("shorts"), apresentam maiores níveis de DON do que no grão de trigo, enquanto a farinha apresenta o menor nível de contaminação (YOUNG et al., 1984; SCOTT, 1983; SCOTT et al., 1984).

Nowicki et al. (1988) afirmaram que a distribuição de DON nas frações 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 conseqüentemente baixos níveis do DON estavam presentes na farinha de trigo produzida.

Trigo-Stockli et al. (1996) avaliando a distribuição de DON em frações da moagem de trigo, também verificaram que a toxina geralmente não está uniformemente distribuída nos grãos de trigo. Os autores observaram que os níveis de DON foram maiores no farelo e menores na farinha, o alto nível de toxina no farelo pode ser atribuído a uma prevalência do *F. graminearum* no aleurona e tecidos do pericarpo.

Samar et al. (2003) avaliando a distribuição de DON em frações obtidas a partir da moagem do trigo para utilização na produção de alimentos mostraram que o farelo possuía níveis superiores de DON ( $4680 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) em relação ao grão ( $1928 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), já a farinha apresentava a menor concentração da toxina ( $994 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

O DON é termoestável a  $120^{\circ}\text{C}$ , moderadamente estável a  $180^{\circ}\text{C}$  e estável a  $210^{\circ}\text{C}$  apenas por 30-40 min, é capaz de se manter ativo em condições ácidas, mas é sensível quando em pH básico (WHO, 2001). A estabilidade a temperaturas elevadas é muito importante em processos tais como cozimento e produção de cereais matinais. Neira et al. (1997) mostraram que a concentração de DON pode ser reduzido em até 44% na massa de pão depois de assado: aproximadamente metade desta redução ocorre após a fermentação.

Levantamento realizado por Scott (1996) na Alemanha mostrou que 100% das amostras avaliadas estavam contaminadas com DON atingindo concentrações superiores a  $569 \mu\text{g. L}^{-1}$ .

## 2.7 Legislação

No Brasil ainda não existe legislação regulamentando a presença de DON em alimentos destinados ao consumo humano ou animal, o que se verifica é que empresas produtoras de ração impõem níveis máximos aceitáveis de DON no farelo de trigo a ser utilizado (GIACOMINI; NEGAZZO, 1998). Com relação à legislação sobre micotoxinas, apenas alguns países possuem regulamentações quanto ao nível aceitável do DON, que varia de 500 a  $2.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para alimentos destinados ao consumo humano (VAN EGMOND, 1989).

Larsen et al. (2004) apresentaram proposta da Comunidade Européia (*Codex Alimentarius Commission* – FAO; *World Health Organization* – Organização Mundial de Saúde, 2003) para os limites aceitáveis de DON:  $2.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para grãos de trigo durum e milho não processados;  $750 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para farinha de trigo integral, farelo e macarrão;  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para cereais limpos para consumo humano direto e todos os

produtos derivados;  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para cereais infantis e ingredientes utilizados na fabricação do mesmo.

Nos Estados Unidos o limite máximo para DON em produtos trigo como farinha, farelo de trigo e germe de trigo é de  $1.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e grãos destinados a alimentação animal varia de  $5.000$  a  $10.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  dependendo da espécie animal e da idade do animal (CAST, 2003).

Outros países que apresentam limites estabelecidos são: Áustria,  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para trigo comum e  $750 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para trigo durum; Canadá  $2.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para grãos de trigo; Rússia  $1.000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para farinha e farelo de trigo (CAST, 2003).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras utilizadas**

Foram obtidas 50 amostras de trigo produzido no Brasil (Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul) e 50 amostras de trigo importado da Argentina e Paraguai, totalizando 100 amostras. As amostras utilizadas no trabalho foram obtidas de empresas ou cooperativas que utilizam e comercializam grãos de trigo e foram oriundas de diferentes localidades produtoras e armazenadoras. As amostras foram coletadas no período de maio a dezembro de 2005 sendo que cada amostra continha aproximadamente 5kg de grãos de trigo.

#### **3.2 Preparo das amostras**

O preparo das amostras foi realizada no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

As amostras foram homogeneizadas e subdivididas utilizando o subamostrador tipo Gamet em 2 porções: A e B. A porção A com aproximadamente 4kg destinada à análise de DON e atividade de água e a porção B com 1kg para avaliação da microbiota fúngica, peso de mil grãos, grãos giberelados e teor umidade.

A porção A foi triturada na sua totalidade em moinho de martelo modelo MA 090, primeiramente utilizando peneira de abertura de 2,0mm (10mesh) e em seguida homogeneizada manualmente e subdividida utilizando o quarteador de canaletas obtendo-se uma subamostra de aproximadamente 1kg. Cada subamostra foi novamente triturada ajustando-se a granulometria para 0,85 mm (20mesh) e armazenadas a -18 °C até o momento da análise.

### **3.3 Determinação de atividade de água ( $a_w$ )**

A análise da atividade de água ( $a_w$ ) foi realizada no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

Antes da moagem da porção A todas as amostras foram avaliadas, em triplicata, quanto à atividade de água ( $a_w$ ), de acordo com as instruções do equipamento Determinador de Atividade de Água da marca Testo 650 (TESTO AG, Lenzkirch, Alemanha). Considerou-se o valor médio entre as triplicatas.

### **3.4 Teor de umidade dos grãos (U%)**

A análise do teor de umidade (U%) foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

A determinação de U% nos grãos de trigo foi realizada em duplicata pelo método de estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ , durante 24 horas, conforme protocolo padrão (BRASIL, 1992), empregando-se aproximadamente 7g de cada amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem.

### **3.5 Peso de mil grãos (PMG)**

A análise do peso de mil grãos (PMG) foi realizada no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

Da porção B foram retiradas, aleatoriamente, quatro subamostras de 25g da massa de grãos das quais foram removidos os grãos quebrados e material estranho. Cada subamostra foi contada, manualmente, de acordo com a metodologia empregada por (DEXTER; MATSUO; MARTIN, 1987) e os valores obtidos foram padronizados para 13% de umidade.

### **3.6 Determinação da Porcentagem de Grãos Giberelados (GG%)**

A análise da determinação de grãos giberelados (GG) foi realizada no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

Da porção B, referente a cada amostra, foi retirada uma subamostra composta de 1.000 grãos para determinação da porcentagem de grãos giberelados (GG%). Os sinais visíveis da ocorrência de fusariose foram estabelecidos visualmente conforme metodologia descrita por Lima (2002b). Nesta análise foram identificados como grãos giberelados aqueles que apresentavam-se chochos, enrugados e com coloração branco-rosada a pardo-clara.

### **3.7 Avaliação da microbiota fúngica**

A análise da avaliação da microbiota fúngica foi realizada Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

A incidência de fungos nos grãos de trigo foi determinada utilizando-se o método de plaqueamento direto em meio de cultura de acordo com Pitt e Hocking (1997). Para tanto, foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de cultura Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Para cada amostra analisada foram empregados 100 grãos (20 grãos/placa). Os grãos foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio 0,6% por 1 minuto. Os grãos foram dispostos nas placas em dois círculos concêntricos com 10 grãos (mais externo), 9 grãos (mais interno) e 1 grão no centro da placa. As placas foram mantidas em incubadora do tipo B.O.D. durante 5 dias a 25°C. A avaliação consistiu na observação e identificação sob microscópio estereoscópio ou através do preparo e observação de lâminas em microscópio composto, sendo a identificação realizada de acordo com Hanlin (1990) e Ellis (1976). A incidência dos

fungos foi expressa em porcentagem considerando-se o número de grãos infectados em relação ao total de grãos avaliados.

A identificação gênero *Fusarium graminearum* associados aos grãos foi feita com base nas características morfológicas das colônias isoladas, tais como tamanho e número de septos nos macro e microconídeos (BOOTH, 1971).

### **3.8 Avaliação da contaminação por desoxinivalenol (DON)**

A análise de desoxinivalenol (DON) foi realizada no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba.

A análise para quantificação de DON foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A extração da toxina foi realizada de acordo com método oficial nº 986017 da Associação de Química Analítica Oficial (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 1995), com algumas modificações. A toxina foi extraída a partir de 25g da amostra, previamente triturada conforme (item 3.2), com 100mL da mistura de solventes contendo acetonitrila:H<sub>2</sub>O destilada (84:16v/v). A purificação foi realizada em coluna contendo 3g da mistura carvão ativado: alumina neutra:celite (7:5:3p/p/p).

As alíquotas dos extratos das amostras, bem como do padrão quantitativo (Biopure), foram aplicadas em cromatofolha (Merck Cat. N. 5553) utilizando-se o aplicador automático *Linomat IV* (Camag). A eluição foi conduzida empregando-se o sistema de solventes clorofórmio:acetona:álcool isopropílico (8:1:1v/v/v). Após a eluição e secagem da cromatofolha sob exaustão à temperatura ambiente por 10 minutos. Procedeu-se a derivação através de imersão rápida da cromatofolha em solução metanólica de cloreto de alumínio a 20%, seguido de aquecimento a 120°C durante 7 minutos.

Após resfriamento por 1 minuto a temperatura ambiente realizou-se a análise visual da cromatofolha sob luz UV de  $\lambda=366\text{nm}$ , comparando-se a intensidade de fluorescência das manchas das amostras com as do padrão. No caso de intensidades de fluorescências intermediárias considerou-se a média dos pontos adjacentes. As

modificações foram realizadas e testadas através dos testes de recuperação, análise de 1 amostra de referência FAPAS (Test material T221 – Wheat Flour), determinação do limite de detecção e quantificação. Os testes de recuperação foram realizados juntamente com a realização das análises das amostras do projeto. Amostras com nível não detectado de DON foram artificialmente contaminadas adicionando-se quantidades de padrão para se obter as contaminações de aproximadamente: 120, 260, 550, 1100 e 1520  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

### **3.9 Determinação do limite de detecção do método empregado (LD)**

O limite de detecção (LD) foi determinado nas condições da realização do método. Primeiramente, aplicou-se em cromatofolha quantidades decrescentes do padrão de DON até se obter o limite visual de observação do padrão. Em seguida adicionou-se quantidade suficiente do padrão de DON em uma amostra de trigo, previamente analisada onde não se detectou a presença de DON, para se obter a contaminação correspondente em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  do que foi considerado limite visual. Considerou-se como limite de detecção o nível no qual, após análise, a toxina adicionada foi observada de forma inequívoca por no mínimo 2 analistas. Esse procedimento foi realizado com 5 repetições.

### **3.10 Determinação do limite de quantificação do método empregado**

O limite de quantificação foi avaliado considerando-se 3 x LD em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  empregando material previamente analisado onde não se detectou a presença de DON. A extração e quantificação foram realizadas de acordo com o método empregado calculando-se o valor da recuperação (%R) e o valor do desvio padrão relativo de repetibilidade ( $\text{RSD}_r$ ). Os valores obtidos de %R e  $\text{RSD}_r$  foram avaliados segundo Garfield, Klesta e Hirsch (2000).

### 3.11 Análise Estatística

O delineamento empregado foi inteiramente ao caso com dois grupos (nacional e importado). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 0,05% de probabilidade, com nível do valor p corrigido. O programa utilizado foi SAS (STATISTICAL ANALYSES SYSTEM).

Os dados foram transformados, através da potência ótima de Box –Cox., para atender as exigências das suposições para a análise de variância. Para os parâmetros avaliados foram feitas as transformações abaixo relacionadas:

- *Alternaria alternata*:  $\sqrt{x+1}$ ;
- *Aspergillus* spp.:  $1/\sqrt{x+1}$ ;
- *Bipolares sorokiniana*:  $1/(x+1)$ ;
- *Cladosporium* spp.  $1/\sqrt{x+1}$ ;
- *Drechslera* spp. elevado  $(x+1)^{-8,7}$ ;
- *Epicoccum* spp.:  $\log_{10}(x+1)$ ;
- *Fusarium graminearum*: elevado a  $(x+1)^{-2,5}$ ;
- *Fusarium* spp:  $1/\sqrt{x+1}$ ;
- *Penicillium* spp: elevado  $(x+1)^{3,9}$ .
- Concentração de DON.:  $\log_{10}(x+0,5)$ ;
- Porcentagem de Grãos Gibberelados:  $\log_{10}(x+0,5)$

Foram realizadas análises de correlação de Pearson e o teste de hipótese para correlação nula ao nível de 0,05% de probabilidade para os parâmetros avaliados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amostras utilizadas

Foram obtidas 50 amostras de trigo produzido no Brasil (Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul) e 50 amostras de trigo importado da Argentina e Paraguai, totalizando 100 amostras (Tabela 1). Cada amostra continha aproximadamente 5kg de grãos de trigo.

Tabela 1 - Distribuição da origem das amostras de trigo utilizadas

<b>Procedência</b>	<b>Número de amostras</b>
São Paulo	14
Paraná	32
Rio Grande do Sul	4
Paraguai	25
Argentina	25

Das 50 amostras de trigo nacional avaliadas, 32 (64%) eram provenientes do Estado do Paraná, 14 (28%) de São Paulo e 4 (8%) do Rio Grande do Sul. Já do trigo importado 25 amostras (50%) eram provenientes da Argentina e 25 (50%) do Paraguai. Embora o número de amostras avaliadas do Paraguai tenha sido igual ao da Argentina, é importante ressaltar que o trigo importado do Paraguai representou apenas 1 a 8% do total importado nos últimos 5 anos, enquanto que o trigo da Argentina representou 83 a 96% do total importado neste mesmo período (CONAB, 2006). A dificuldade na obtenção de amostras do trigo importado provenientes de diferentes regiões ou carregamentos fez com que apenas amostras desses dois países fossem avaliadas.

#### 4.2 Determinação de atividade de água ( $a_w$ ) e teor de umidade dos grãos (U%)

Os valores médios de  $a_w$  e U% dos grãos avaliados estão apresentados na Tabela 2. No trigo nacional a  $a_w$  variou de 0,56 a 0,75 sendo que apenas 4 amostras (8%) apresentaram  $a_w > 0,70$ . No trigo importado os valores variaram de 0,56 a 0,79 sendo que apenas 5 amostras (10%) apresentaram  $a_w > 0,70$ . De acordo com Taniwaki e Silva (2001) no que diz respeito à  $a_w$ , a produção de micotoxinas pode ocorrer na faixa de 0,70 a 0,90. Assim a maior parte das amostras avaliadas não apresentou condições para que houvesse produção de micotoxinas após o recebimento das mesmas. Além disso, todas as amostras foram armazenadas sob temperatura de congelamento ( $< -18^\circ\text{C}$ ), o que assegurou a não produção de micotoxinas até o momento da análise.

O teor de umidade das amostras de grãos de trigo avaliadas no presente estudo (Tabela 2) variou de 9,9 a 14,2%, para o trigo nacional, e de 10,5 a 13,7% no trigo importado. O teor de umidade máximo exigida pela classificação oficial brasileira para o trigo é de 13% conforme Instrução normativa nº 1, de 27/01/99 (Brasil, 1999). Do total das 100 amostras apenas 3 estavam acima da especificação, sendo 1 do trigo nacional e 2 do trigo importado. Os valores originais encontram-se no Apêndice (A e B).

Tabela 2 - Resultados médios da avaliação da atividade de água ( $a_w$ ) e teor de umidade (U%) das amostras de trigo nacional e importado

<b>Procedência</b>	<b><math>A_w</math></b>	<b>U (%)</b>
<b>Nacional</b>	0,66 (0,56 - 0,75)	11,5 (9,9 - 14,2)
<b>Importado</b>	0,64 (0,56 - 0,79)	11,6 (10,5 - 13,7)

Os valores representam a média de todas as amostras avaliadas  
Valores entre parênteses representam o menor e o maior valor obtido

De acordo com Rasper (1991), a determinação da umidade é essencial para a avaliação da qualidade dos grãos de cereais tanto no armazenamento quanto no processo de moagem. Grãos que contém umidade acima do teor crítico de

armazenamento, estão sujeitos a deterioração por fungos, ataque de insetos e germinação (POMERANZ, 1987).

Os valores obtidos do teor de umidade foram utilizados para as correções dos resultados da análise do peso de mil grãos.

#### **4.3 Peso de mil grãos (PMG) e Grãos giberelados (GG)**

O PMG é uma maneira de se avaliar a qualidade dos grãos através da determinação do tamanho destes e geralmente, esse parâmetro é indicador da sanidade do grão (DICK; MATSUO, 1988). É expresso em gramas por 1.000 grãos em função do tamanho e da densidade do grão (HALVERSEN; ZELENY, 1988). É uma medida que apresenta forte controle genético, mas é afetada por condições ambientais durante a fase de maturação no campo (MACRITCHIE, 1980).

Constatou-se que valor médio de PMG (Tabela 3) para as amostras de trigo nacional foi de 33,6g (20,1 a 48,6 g), não diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do trigo importado que apresentou PMG médio de 34,1g (28,7 a 39,6g). De acordo com Guarienti (1996) PMG na faixa de 26 a 45g corresponde a grãos de tamanho médio sendo o mais indicado para um melhor desempenho de moagem do trigo. Apenas 1 amostra apresentou PMG < 26 g. Os valores originais encontram-se no Apêndice (A e B).

Um estudo realizado nas safras de 2001 e 2002, na cidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, demonstrou que houve diminuição crescente no PMG, conforme se aumentava o número de espiguetas gibereladas por espiga em relação às espigas saudáveis (CASA et al., 2004b). Neste trabalho não foi observada correlação entre PMG e percentual de grãos giberelados.

O percentual médio de GG está apresentado na Tabela 3 não existindo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre no trigo nacional e o trigo importado.

Tabela 3 - Resultados médios da avaliação do peso de mil grãos (PMG) e grãos giberelados (GG) das amostras de trigo nacional e importado

Procedência	PMG (g)	GG (%)
<b>Nacional</b>	33,6 (20,1 - 48,6)	2,3 (0 - 20,6)
<b>Importado</b>	34,1 (28,7 - 39,6)	1,3 (0 - 6,3)

Os valores representam a média de todas as amostras avaliadas  
Valores entre parênteses representam o menor e o maior valor obtido

#### 4.4 Avaliação da microbiota fúngica

De acordo com a metodologia descrita, foi determinada a porcentagem de infecção de gêneros/espécies fúngicas que estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores da infecção fúngica, em porcentagem, nos grãos de trigo nacional e importado

Fungo	Infecção Fúngica (%)				Pr > F
	Trigo Nacional		Trigo Importado		
	Média	Mín.-Máx.	Média	Mín.-Máx.	
<i>Fusarium graminearum</i>	2,3 a	(0 – 33,0)	0,14 b	(0 -3,0)	0,0005
<i>Fusarium spp.</i>	3,6 a	(0 -34,0)	1,2 b	(0-6,0)	0,037
<i>Aspergillus spp.</i>	2,5 b	(0 – 26,0)	4,3 a	(0 -18,0)	0,048
<i>Penicillium spp.</i>	0,7 a	(0 – 10,0)	0,6 a	(0 -9,0)	0,619
<i>Alternaria alternata</i>	25,2 b	(0 – 69,0)	36,7 a	(11,0-83,0)	0,001
<i>Cladosporium spp.</i>	3,2 a	(0 – 17,0)	1,4 b	(0 -9,0)	0,030
<i>Drechslera spp.</i>	0,4 a	(0 – 5,0)	0,03 b	(0 -1,0)	0,011
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,8 a	(0 – 5,0)	1,7 a	(0 -11,0)	0,264
<i>Epicoccum spp.</i>	6,3 a	(0 – 38,0)	4,3 a	(0 -9,0)	0,555

Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Podemos observar que a infecção média de *F. graminearum* tanto nas amostras de trigo nacional (2,3%) quanto do trigo importado (0,14) foi baixa, uma vez que percentuais menores que 10% não são consideradas problemáticas (PITT, 2005). Da mesma maneira quando se considerou todas as espécies de *Fusarium*, incluindo-se o

*F. graminearum*, os percentuais de infecção de *Fusarium* spp. foram baixos para o trigo nacional (3,6%) e importado (1,2%). No entanto pode-se constatar que as amostras de trigo nacional apresentaram porcentagem de infecção maior do que no trigo importado ( $p < 0,05$ ) tanto para *F. graminearum* quanto para *Fusarium* spp.. Três amostras do trigo nacional apresentaram valores maiores do que 10% de infecção para *F. graminearum* sendo 1 de São Paulo, apresentando 13% e 2 do Paraná (30,0 e 33,0%). Para *Fusarium* spp. as mesmas amostras apresentaram percentuais maiores do que 10% sendo São Paulo com 13% e do Paraná com 30,0 e 34,0 % indicando que nessas amostras ocorreu praticamente apenas o *F. graminearum*. Já para o trigo importado os valores máximos observados foram 3% para *F. graminearum* e 6% para *Fusarium* spp. Os valores originais estão apresentados no Apêndice (A e B).

A baixa infecção de *F. graminearum* também foi observada em trabalho realizado por Garcia (2006) onde avaliando genótipos de trigo plantados nos anos de 2003 e 2004 em duas localidades no Estado de São Paulo, observou percentuais de infecção que variaram de 0,3 a 9,3%. Carneiro (2003) avaliando 3 genótipos de trigo plantados no Estado de São Paulo observou que os grãos recém colhidos apresentaram infecção de *Fusarium* spp. na faixa de 1,5 a 33% dependendo do genótipo, época de colheita e da temperatura de secagem. Durante o período de armazenamento o mesmo autor observou que de uma maneira geral houve uma redução ( $p < 0,05$ ) no percentual de infecção, sendo que após 8 meses de armazenamento os valores variaram de 1,0 a 18,5%.

Furlong et al. (1995a) verificaram em amostras de trigo colhido de 1988 a 1990, armazenados no Rio Grande do Sul, com infecção por *F. graminearum* variando de 1 a 22%, valores semelhantes aos observados nessa pesquisa. Dois genótipos de trigo plantados em 10 diferentes regiões do Estado de São Paulo foram avaliados por Furlong et al. (1995a). Os autores não detectaram que *F. graminearum* nas amostras mas, detectaram uma infecção de *Fusarium* spp. entre 0 a 33% .

Apesar da baixa infecção de *F. graminearum* ou *Fusarium* spp. nas amostras analisadas neste trabalho não se pode desconsiderar a hipótese destes fungos terem colonizado os grãos antes da colheita e terem sido eliminados por competição com outros fungos ou devido às condições de armazenamento como observado por Furlong

et al. (1995a). De acordo com Sauer (1992) *Fusarium* spp. pode continuar se desenvolvendo durante o armazenamento de grãos caso as condições de umidade sejam favoráveis porém, estes fungos não são bons competidores em condições normais de armazenamento. Guariente e Costamilan (1999) avaliou a sobrevivência de fungos durante armazenamento de grãos de trigo e observaram que no tempo zero de armazenamento os grãos apresentaram infecção de 18,8% de *Fusarium* spp., após o primeiro mês apresentou um decréscimo de 3,1% mantendo-se estável durante nove meses, zerando no décimo mês.

Devido ao desconhecimento das condições do campo e do período de armazenamento das amostras avaliadas pode-se supor apenas que essa infestação reduzida tenha ocorrido devido a alguns fatores como: (i) redução da viabilidade do inóculo, (ii) período ou temperatura excessiva no armazenamento, ou (iii) condições ambientais ou de manejo da cultura desfavoráveis à proliferação do fungo.

Na literatura consultada não foram obtidos dados sobre a infecção do trigo paraguaio por *F. graminearum* ou *Fusarium* spp. Já para o trigo argentino existem trabalhos apresentando dados de infecção por estes fungos.

Azcarate, Vaamonde e Fernandez-Pinto (2006) avaliaram 32 amostras de trigo da safra 2004/2005 provenientes de 2 importantes regiões tritícolas argentinas e observaram uma infecção de 56,3% para as espécies de *Fusarium*. Tal resultado é semelhante aos obtidos por González et al. (1999) que analisaram 60 amostras de trigo da safra de 1996 recém colhidos da região sudeste de Buenos Aires e observaram que a infecção por *Fusarium graminearum* foi de 76,1%. González et al. (1996) analisaram trigo recém colhidos de 2 regiões produtoras da Argentina e observaram uma infecção de 44,4 a 100% por *Fusarium graminearum* dependendo da região.

Dentre os demais gêneros/espécies observados nas amostras avaliadas podemos destacar como potencialmente produtores de micotoxinas os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e a espécie *Alternaria alternata*.

Os resultados de incidência de *Aspergillus* spp. mostraram que o nível médio de infecção do trigo nacional (2,5%) foi menor ( $p < 0,05$ ) do que o do trigo importado (4,5%). Dentre as amostras nacionais 50% apresentaram percentual de infecção  $\leq 0,5\%$ . Nas demais apenas 3 (6%), provenientes do Paraná, apresentaram níveis acima de 10%

(11 a 26%). Nas amostras de trigo importado observou-se que 50% das amostras apresentaram níveis de infecção  $\leq 2,5\%$  e 7 amostras (14%) apresentaram níveis entre 11 e 18%.

Carneiro (2003) não observou crescimento de *Aspergillus* spp. na maioria das amostras avaliadas logo após a colheita ou após 8 meses de armazenamento. Para o fungo *Penicillium* spp. foi observado que 16% das amostras de trigo nacional e 18% de trigo importado apresentaram infecção média  $< 1,0\%$  não sendo estatisticamente diferentes. Furlong et al. (1995a) observaram infecção de *Penicillium* spp. que variou de 0 a 14% em amostras armazenadas em silos no Rio Grande do Sul. Carneiro (2003), observou que os grãos recém colhidos apresentaram baixos níveis de infecção de *Penicillium* spp. com no máximo 1% para 3 genótipos de trigo plantados no Estado de São Paulo e colhidos em diferentes épocas. No entanto após 8 meses de armazenamento o mesmo autor observou que 57% das amostras avaliadas apresentaram um percentual de infecção que variou de 11,5 a 94,5 %.

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são fungos potencialmente toxigênicos causadores de deterioração em grãos e sementes. São xerofílicos, ou seja, podem crescer em baixa  $a_w$ . Portanto, o conhecimento dos tipos de fungos contaminantes de um produto pode indicar em que condições o produto está armazenado, contribuindo na orientação de estratégia adequada de armazenamento (TANIWAKI; SILVA 2001).

A presença de *Alternaria alternata* afeta a qualidade dos cereais, pois causa descoloração dos grãos além de poder produzir micotoxinas (WATSON, 1984). Fungos do gênero *Alternaria* são freqüentemente encontrados em amostras recém colhidas e não são bons competidores em condições boas de armazenamento (SAUER, 1992).

A microbiota fúngica das amostras de grãos de trigo nacional mostraram *A. alternata* como a espécie com maior nível de infecção, com média de 25,4% e metade das amostras apresentaram infecção entre 24 e 69%. Furlong et al. (1995b) observaram infecção de *A. alternata* entre 24 a 92% em amostras recém colhidas produzidas em diversas regiões do Estado de São Paulo. Em amostras armazenadas no Rio Grande do Sul Furlong (1995b) observou infecção entre 1 a 54%.

Nas amostras de grãos de trigo importado observou-se média de 36,7% de infecção do fungo *A. alternata*. Este valor foi estatisticamente maior ( $p>0,05$ ) do que a

média encontrada no trigo nacional. Azcarate, Vaamonde e Fernandez-Pinto (2006) avaliaram 32 amostras de trigo provenientes da região Sul da Argentina e verificaram que o gênero *Alternaria* foi o fungo predominante com uma frequência de isolamento de 100%. Esse resultado é semelhante àqueles obtidos por Gonzáles et al. (1999), que verificaram em grãos de trigo durum recém colhidos a predominância de *A. alternata* (97,8%). González et al. (1996), observaram uma frequência de isolamento de 47,1 a 74,1% de *A. alternata* em grãos de trigo recém colhidos dependendo da região tritícola Argentina avaliada.

Azcarate, Vaamonde e Fernandez-Pinto (2006) avaliou a presença de ácido tenuazônico, produzido por *A. alternata* em 20 das amostras avaliadas quanto a infecção fúngica e observou que 5 (25%) estavam contaminadas com níveis entre 1682 e 6795  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  indicando um potencial perigo.

Os demais gêneros/espécies identificados e a infecção média nas amostras de trigo nacional foram: *Bipolares sorokiniana* (0,84%), *Cladosporium* spp. (3,16%), *Drechslera* spp. (0,40%), *Epicoccum* spp. (6,34%) e nas amostras de trigo importado: *Aspergillus* spp. (4,6%), *Bipolares sorokiniana* (1,73%), *Cladosporium* sp.(1,43%), *Drechslera* spp. (0,025%), *Epicoccum* spp. (4,25%).



Figura 2 – Quantificação fúngica pelo método de plaqueamento direto no meio de cultura DRBC

#### **4.5 Concentração de desoxinivalenol (DON)**

Nos itens a seguir estão apresentados os resultados dos parâmetros avaliados pela metodologia empregada para as amostras analisadas.

##### **4.5.1 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

O limite de detecção do método por cromatografia de camada delgada foi de  $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e o limite de quantificação foi de  $90 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . O valor do desvio padrão de repetibilidade ( $\text{RSD}_r$ ) no limite de quantificação foi de 4,95 % e a recuperação média foi de 98%. Tanto o valor do desvio padrão quanto o da recuperação estão de acordo com os valores recomendados para detecção de contaminação para a faixa avaliada:  $\text{RSD}_r \leq 15\%$  e Recuperação 80-110% (GARFIELD; KLESTA; HIRSCH, 2000).

#### 4.5.2 Controle de qualidade analítico – Teste de Recuperação

A cada remessa de análise realizou-se um teste de recuperação como procedimento de controle de qualidade analítico. Os percentuais de recuperação obtidos (Tabela 5) variaram de 72 a 113% com média 94%. O critério de avaliação dos resultados do teste de recuperação foi baseado nos valores aceitáveis de recuperação observados por Horwitz; Kamps e Boyer (1980) onde para níveis de contaminação maiores que  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , o valor da recuperação deve estar na faixa de 80 a 110%. Apenas 2 valores (72 e 113%) apresentaram-se fora da faixa aceitável porém estes estavam próximos do limite desejado. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao intervalo de quantificação empregado na cromatografia em camada delgada.

Também avaliou-se a variabilidade existente entre as repetições do teste. Garfield, Klesta e Hirsch (2000) apresentaram resultados corrigidos por Horwitz; Kamps e Boyer (1980) quanto aos valores do desvio padrão relativo (RSD), que podem ocorrer em avaliações (RSDr). Os valores aceitáveis para RSDr, de acordo com a concentração avaliada, citados pelos autores, variam de 15% para níveis de  $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$  a 10% para níveis de contaminação de  $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Assim pode-se verificar na Tabela 5) que os valores de RSDr obtidos (6,1 a 13%) apresentaram-se dentro da faixa estabelecida.

Tabela 5 - Valores, em %, dos testes de recuperação avaliados

<b>Contaminação adicionada <math>\mu\text{g.kg}^{-1}</math></b>	<b>Recuperação Média (%)</b>	<b>RSDr (%)</b>
120	100	12,9
260	84	13,0
550	89	6,3
1100	97	6,1
1520	101	8,6

#### 4.5.3 Controle de qualidade analítico – Amostra referência

A amostra referência de farinha de trigo adquirida junto ao FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) identificada como Test material T2221 – Wheat Flour, apresentava a contaminação de  $1017 \mu\text{g.kg}^{-1}$  com faixa de valores aceitáveis entre  $693$  e  $1342 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

O valor obtido empregando-se a metodologia apresentada foi de  $924 \mu\text{g.kg}^{-1}$  estando portanto dentro da faixa aceitável.

#### 4.5.4 Contaminação com DON das amostras avaliadas.

Os resultados médios da contaminação por DON das amostras avaliadas estão apresentados na Tabela 6. Pode-se verificar que as amostras de trigo nacional apresentaram-se com contaminação maior ( $p < 0,05$ ) do que o trigo importado.

Tabela 6 - Contaminação por DON ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) nas amostras de trigo nacional e importado

Procedência	Nº Amostras analisadas	Nº Amostras contaminadas	Contaminação DON ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )		
			Média	Min.	Max.
Nacional	50	47 (94%)	332 a	N.D.	4573
Importado	50	38 (88%)	90 b	N.D.	349

Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Do total de amostras do trigo nacional 3 (6%) não apresentaram contaminação por DON (N.D.) e 17 (34%) apresentaram níveis abaixo do limite de quantificação ( $90 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ); 25 (50%) com níveis de  $90$  a  $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ; 3 (6%) em níveis de  $500$  a  $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e 2 (4%) com níveis acima de  $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Em relação ao trigo importado, 6 amostras (12%) apresentaram níveis não detectados (N.D.), 23 amostras (46%) com níveis abaixo do limite de quantificação ( $< 90 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e 21 (42%) com níveis de  $90$  a  $349 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . As 6 amostras de trigo importado,

com nível de contaminação N.D., eram provenientes do Paraguai. Das 21 amostras contaminadas com níveis  $\geq 90\mu\text{g.kg}^{-1}$  16 eram provenientes da Argentina e 5 do Paraguai.

São poucas as informações referentes à contaminação de trigo e mesmo de seus derivados produzidos no Brasil para efeito de comparação com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Furlong et al. (1995a) avaliaram 12 amostras de trigo nacional armazenadas no Rio Grande do Sul e constatou que apenas 1 amostra (8%) estava contaminada com DON no nível de  $400\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Vinte amostras de trigo produzido em 10 regiões do Estado de São Paulo foram avaliados por Furlong et al. (1995b) quanto a presença de diversas micotoxinas. O DON foi detectado em 4 amostras (20%) em níveis que variaram de 470 a  $590\mu\text{g.kg}^{-1}$ . O percentual de amostras contaminadas são menores dos obtidos neste trabalho pois, o limite de detecção da metodologia por cromatografia gasosa empregada por Furlong et al. (1995a,b) era de  $200\mu\text{g.kg}^{-1}$  e o limite de detecção obtido no presente trabalho foi de  $30\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Soares e Furlani (1996) realizaram um levantamento de ocorrência de micotoxinas em 38 amostras de trigo e derivados comercializados em Campinas – SP e não observaram a presença de micotoxinas incluindo o DON. A metodologia empregada pelos autores apresentava um limite de detecção para DON de  $200\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Um estudo realizado por Oliveira et al. (2002) sobre a incidência de DON em produtos de panificação, farinha e farelo de trigo comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998 a 2000 mostrou que o DON foi detectado em 32 (68%) das 47 amostras analisadas, em uma faixa de concentração de 40 a  $1.205\mu\text{g.kg}^{-1}$  sendo que o limite de detecção da metodologia empregada foi de  $20\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Baraj e Furlong (2003) avaliaram 112 amostras de farinha de trigo comercializadas na cidade de Rio Grande-RS e verificaram que apenas 2 amostras (1,8%) estavam contaminadas com DON em níveis de 128 e  $323\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Informações sobre a contaminação do trigo produzido no Paraguai não foram encontradas, já para o trigo argentino vários trabalhos são apresentados. Rizzo et al. (1994) avaliando a presença de toxinas em trigo da sub-região tritícola no norte da Argentina detectaram entre as amostras somente o DON em níveis que variaram de

2.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$  a 28.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . O trigo argentino da safra de 1993 proveniente de 2 regiões de maior produção foi analisado por Gonzalez et al. (1996) que constataram que 60 e 100% do trigo em cada região estavam contaminados com DON com média de 2700  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e 4.300  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  dependendo da região. Em trabalho mais recente LORI et al. (2003) relataram a contaminação de trigo durum (*Triticum durum*) com DON em amostras coletadas durante 2 anos consecutivos de avaliação, no primeiro ano a contaminação foi 55%, sendo que 10% destas apresentavam níveis superiores a 2.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , no ano seguinte 78% das amostras estavam contaminadas sendo que 32% destas amostras continham níveis maiores que 2.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Ao contrário dos trabalhos anteriormente citados, no presente levantamento constatou-se que o trigo importado apresentou níveis de contaminação inferiores aos do trigo nacional ( $p < 0,05$ ). Enquanto nas amostras de trigo importado o maior nível de contaminação detectado foi de 349 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , o trigo nacional apresentou contaminação máxima de 4.573 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Baseando-se na proposta da Comunidade Européia, o valor máximo a ser considerado é de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para o grão de trigo. Assim 5 amostras (10%) de trigo nacional apresentaram contaminação de DON acima do limite aceitável sendo que dessas 2 (4%) apresentaram níveis acima de 3.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Dessas 5 amostras, 4 foram do trigo proveniente do Estado do Paraná e 1 do Estado de São Paulo. Para o trigo importado avaliado todas as amostras estavam dentro do limite máximo aceitável.

Como o Estado do Paraná é o maior produtor de trigo do Brasil e foi onde ocorreram os maiores níveis de contaminação com DON, seria importante um estudo para se identificar quais as regiões, dentro do Estado, que podem apresentar, com maior frequência, contaminação com DON no trigo produzido.

#### **4.6 Análises de correlação**

Os resultados obtidos na análise de correlação entre contaminação com DON e percentagem de grãos giberelados (%GG), incidência de *F. graminearum* (% *F.g.*), incidência de *Fusarium spp* (% *F.spp*), estão apresentados na Tabela 7. Os valores originais dos parâmetros avaliados encontram-se no (Apêndice A e B).

Tabela 7 - Correlação entre contaminação com DON e os parâmetros %GG, %F.g., %F.spp.

Parâmetro	Valor de r *
grãos giberelados (% GG)	0,83
infecção de <i>F. graminearum</i> (%Fg)	0,924
infecção <i>Fusarium</i> spp (%F spp)	0,862

\* significativo ao nível de 0,0001

Os resultados obtidos indicaram uma correlação positiva entre percentual de grãos giberelados (%GG) e DON ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,01$ ). Shotwell et al. (1985) também observaram que a ocorrência de DON em trigo correlacionou-se positivamente ( $r = 0,75$ ,  $p < 0,05$ ) com a porcentagem de grãos danificados por *Fusarium*. No Canadá segundo Nowicki (2006), a associação entre concentração de DON e presença de grãos de trigo danificados por *Fusarium* é bem conhecida e de interesse da indústria pela possibilidade de empregar o percentual da presença desses grãos para estimar a contaminação por DON. O autor apresenta que uma ampla faixa de correlações entre concentração de DON e %GG já foi obtida por diversos autores ( $r = 0,58$  a  $0,93$ ), no entanto, a falta de detalhes apresentados nos trabalhos não permite assegurar as correlações encontradas.

Segundo o mesmo autor, a Comissão Canadense de Grãos (Canadian Grain Commission) têm investigado a correlação entre contaminação com DON e %GG nas principais classes de trigo do país nos últimos 15 anos. A conclusão obtida dessa avaliação é que os dados de correlação não são suficientemente fortes e robustos para prever a concentração de DON em transações comerciais com níveis aceitáveis de precisão e exatidão.

Embora os valores médios de incidência de *F. graminearum* e *Fusarium* spp. nas amostras avaliadas tenham sido baixo pode-se observar uma correlação positiva entre a concentração de DON e %F.g. ( $r = 0,92$ ,  $p < 0,0001$ ) e concentração de DON e %F.spp. ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,0001$ ). Dalcerio et al. (1997) avaliaram grãos de trigo obtidos na safra 1993/1994, quando houve uma alta incidência de fusariose na Argentina e

observaram uma boa correlação ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,02$ ) entre %*F.g.* e DON, no entanto, não observaram correlação entre %*F. spp.* e DON ( $r = 0,12$ ).

Em revisão realizada por Paul, Lipps e Madden (2005), verificou-se que o teor de DON em grãos pode estar relacionado com o nível de dano de fusariose. Observou-se em diversos trabalhos consultados pelos autores que vários graus de associação entre intensidade de fusariose e acúmulo de DON em grãos incluindo-se situações com altas correlações positivas, correlações pouco significativas, correlações negativas e mesmo próximas a zero.

## 5 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos nas amostras de trigo nacional e importado, avaliadas nesse estudo pode-se concluir que:

- a) A frequência de *Fusarium graminearum* e *F. spp.* foram baixas, porém foi maior no trigo nacional do que no trigo importado;
- b) A contaminação com Desoxinivalenol (DON) foi maior no trigo nacional do que no trigo importado;
- c) Das amostras de trigo nacional (94%) e do trigo importado (88%) apresentaram contaminação com DON com níveis médios de 332 e 90  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  respectivamente;
- d) Existiu correlação positiva e significativa entre contaminação com DON e percentual de grãos giberelados, frequência de *Fusarium graminearum* e frequência de *Fusarium spp.*

## REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods**. 16<sup>th</sup> ed. Washington, 1995. chap. 49, p. 1-49.

AZCARATE, P.M.; VAAMONDE, G.; FERNANDEZ-PINTO, V. Toxinas de *Fusarium* e *Alternaria* em trigo cultivados em La provincia de La Pampa e sudeste de Buenos Aires, Argentina. In: SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL “QUALIDADE TOTAL”, 4.; MICOTOXICOLOGIA & MICOTOXICOLOGIA CONGRESSO LATINO – AMERICANO, 5., 2006, Florianópolis. **Resumos ...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. p. 207-208.

BARAJ, E.; FURLONG, E.B. Procedimento para determinação simultânea dos tricotecenos desoxinivalenol e toxina T-2. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 95 - 104, 2003.

BEATTIE, S.; SCHWARZ, P.B.; HORSLEY R.; BARR, J.; CASPER, H.H. The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. **Journal of Food Protection**, Ames, US v. 61, p. 103–106, 1998.

BENNETT, G.A.; SHOTWELL, O.L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins, **Journal of AOAC International**, New York, v. 73, p. 270-275, 1990.

BERGSTROM, G.C. Scab (head blight). In: MATHUR, S.B.; CUNFER, B.M. (Ed.). **Seed – borne diseases and seed health testing of wheat**. Copenhagen: Hellerup, 1993. chap. 4, p. 83-93.

BHAT, R.V.; BEEDU, S.R.; RAMAKRISHNA, Y.; MUNSHI, K.L. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould damage wheat products in Kashmir Valley, India. **The Lancet**, London, v. 1, n. 8628, p. 35-37, Jan. 1989.

BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.

BOTTALICO, A.; GIANCARLO, P. Toxigenic *Fusarium* associated with head blight in small-grain cereals in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 611-624, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Divisão de sementes e Mudanças. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

CARNEIRO, L.M.T.A. **Antecipação da colheita, secagem e armazenamento na manutenção da qualidade de grãos e sementes de trigo comum e duro**. 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CASA, T.R.; REIS, M.E.; BLUM, C.M.M.; BOGO, A.; SCHEER, O.; ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Giberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.29, n.3, p. 289-293, 2004a.

CASA, T.R.; REIS, M.E.; BLUM, C.M.M.; SCHEER, O.; ZANATA T.; CARDOSO, C. Efeito do número de espiguetas gibereladas sobre o rendimento, o peso de mil grãos e a incidência de *Fusarium graminearum* em grãos de trigo. **Summa Phytopathologica Botucatu**, v. 30. n 2, p.277-280, 2004b.

CLEAR, R.M.; PATRICK, S.K. *Fusarium* species isolated from wheat samples containing tombstones (scab) kernels from Ontario, Manitoba and Saskatchewan. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 11, p. 233-238, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores agropecuários**. Disponível em: <http://www.conab.gov.com>. Acesso em: 20 maio 2006.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, 2003. 109 p. (Task Force Report, 139).

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 127, p. 19-28, 2002.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIOS, G.; REYNOSO M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina, **Mycopathologia**, Den Haag, v. 137, p. 179-184, 1997.

DEL PONTE, E.M.; FERNANDES, J.M.C.; PIEROBOM, C.R.; BERGSTROM, G.C. Giberela do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 587-606, 2004.

DEXTER, J.E.; CLEAR, R.M.; PRESTON, K.R. *Fusarium* head blight: effects on the milling and baking of some Canadian wheats. **Cereal Chemistry**. Saint Paul, v. 73, n.6, p. 695 - 701, 1996.

DEXTER, J.E.; MATSUO, R.R.; MARTIN, D.G. The relationship of durum wheat test weight to milling performance and spaghetti quality. **Cereal Foods World**, Saint Paul, v. 32, n. 10, p. 772-777, 1987.

DICK, J.W.; MATSUO, R.B. DURUM wheat and pasta products In: POMERANZ, Y. (Ed.). **Wheat: chemistry and technology**. 3th ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1988. v. 2, p. 507-547.

DIECKMAN, M.A.; GREEN, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 1615-1627, 1992.

DOOHAN, M.F.; BRENNAN, J.; COOKE, J. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals, **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 755–768, 2003.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.

ERIKSEN, G.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J., Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 57, p. 335-345, 2003.

ESKOLA, M.; PARIKKA, P.; RIZZO, A. Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in Finnish cereal samples in 1998, **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, p. 707-718, 2001.

FNP CONSULTORIA & COMÉCIO **Agrianual 2006**. São Paulo, 2006. 520 p.

FURLONG, E.B. **Tricoteceno em trigo**: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo. 1992. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1992.

FURLONG, B.E.; SOARES, V.M.L.; LASCA, C.C.; KOHARA, Y.E. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo Brasil, **Mycopathologia**, Den Haag, v. 131, p. 131-185, 1995a.

FURLONG, B.E.; SOARES, V. M. L.; LASCA, C. C.; KOHARA, Y. E. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brasil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, p. 683-688, 1995b.

GARCIA, J.D. ***Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)**: detecção, efeitos e controle. 2006. 78 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

GARFIELD, F.M.; KLESTA, E.; HIRSCH, J. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Gaithersburg: AOAC International, 2000. 187 p.

GIACOMINI, V.; MENEGAZZO, R. Níveis de vomitoxina (DON) em farelo de trigo na região sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1988, Florianópolis. **Resumos ...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1988. p. 122.

- GONZÁLEZ, H.H.L.; MARTINEZ, E.J.; PACIN, A.; RESNIK, S.L. Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. **Mycopathologia**. Den Haag, v. 144, p. 97-102, 1999.
- GONZÁLEZ, H.H.L.; PACIN, A.; RESNIK, S.L.; MARTINEZ, E.J. Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993, **Mycopathologia** Den Haag v. 135, p. 129-134, 1996.
- GREENHALGH, R.; NEISH, G.A.; MILLER, J.D. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation in Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 46 p. 625–629, 1983.
- GUARIENTI, E.M. **Qualidade industrial de trigo**. 2.ed. Passo Fundo: Embrapa, 1996. 36 p. (Documentos, 27).
- GUARIENTI, E.M.; COSTAMILAN, L.M. Sobrevivência de fungos micotoxigênicos em grãos de trigo armazenado. In: CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE PÓS COLHEITA, 1., 1999, Porto Alegre. **Anais ...** Passo Fundo, 1999. p. 264-267.
- HALVERSEN, J.; ZELENY, L. Criteria of wheat quality. In: POMERANZ, Y. (Ed.). **Wheat: chemistry and technology**. 3th ed. Saint Paul: **American Association of Cereal Chemists**, 1988. v. 1, p. 15-45.
- HANLIN, T.R. **Illustrated genera of Ascomycetes**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1990. 263 p.
- HOMDORK, S.; FEHRMANN, H.; BECK, R. Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat grain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 7–15, 2000.
- HORWITZ, W.; KAMPS, R. L.; BOYER, K. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal of the AOAC International**, Arlington, v. 63, p. 1345-1354, 1980.
- LARSEN, J.C.; HUNT, J.; PERRIN, I.; RUCKENBAUER, P. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 153, p. 1-22, 2004.
- LIMA, M.I.P.M. **Métodos de amostragem e avaliação de giberela usados na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 17 p.
- LIMA, M.I.P.M.; FERNANDES, J.M.C.; PICININI, E.C. Avaliação da resistência à giberela em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 30 – 35, 2000.

LORI, G.A.; SISTERNA, M.N.; HAIDUKOWSKI, M.; RIZZO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, p. 29-35, 2003.

MACRITCHIE, F. Physicochemical aspects of some problems in wheat research. In: AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Advances in cereal science and technology**. Saint Paul, 1980. v. 3, p. 271-326.

MARESCA, M.; MAHFOUD, R.; GARMY, N.; FANTINI, J. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells<sup>1</sup>. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 2723-2731, 2002.

MOLIN, R. **Avaliação de micotoxinas em grãos de milho nos estádios fenológicos próximos à colheita**. 1999. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

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

NOWICKI, T.W. Vomitoxin and *Fusarium* damaged kernels – Is there a relationship in Canadian wheat? In: CANADIAN WORKSHOP ON *FUSARIUM* HEAD BLIGHT, 2., 2001, Ottawa. **Proceedings ...**

NOWICKI, T.W.; DEXTER, J.E.; MATSUO, R.R.; CLEAR, R.M. Retention of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. **Journal of Cereal Science**, London, v. 8, p. 189-202, 1988.

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

OMURTAG, Z.G.; BEYOGLU, D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in processed cereals and pulses in Turkey. **Food Additives and Contaminants**, London v. 20, n. 4, p. 405-409, 2003.

OSÓRIO, E.A. **O trigo no Brasil**. São Paulo: Fundação Cargil, 1982. 287 p.

PACIN, M.A.; RESNIK, L.S.; NEIRA, S.M.; MOLTÓ, G.; MARTÍNEZ, E. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, p. 327-331, 1997.

PAUL, P.A.; LIPPS, E.P.; MADDEN, V. Relationship between visual estimates of *Fusarium* head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: a meta-analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 1225-1235, 2005.

PESTKA, J.J.; SMOLINSKI, T.A. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. Part B, Washington, v. 8, p. 39-69, 2005.

PITT, J. Methods and media for isolation and enumeration of fungi from foods. In: CURSO TEÓRICO-PRÁTICO: FUNGOS E MICOTOXINAS, 2005, Campinas. **Palestra ...** Campinas: ITAL, 2005.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2th ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593 p.

PINEIRO, M.; DAWSON, R.; COSTARRICA M. L., Monitoring program for mycotoxin contamination in Uruguayan food and feeds. **Natural Toxins**, New York, v. 4, p. 242-245, 1996.

POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O.; MEIRELLES, M.C.A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food and Additives and Contaminants**, London, v. 112, p. 313-319, 1995.

POMERANZ, Y. Grain quality. In: \_\_\_\_\_. **Modern cereal science and technology**. 2th ed. New York: VCH, 1987. p. 72-145.

PUZZI, D. Padronização de cereais, grãos leguminosos e café. In: \_\_\_\_\_. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. cap. 22, p. 573-580.

QUIROGA, N.; RESNIK, S.; PACIN, A.; MARTINEZ, E.; PAGANO, A.; RICCOBENE, I.; NEIRA, S. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in argentine wheat. **Food Control**, Guildford, v. 6, n. 4, p. 201-204, 1995.

RAMIREZ, L.M.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 291 – 296, 2006.

RASPER, V.F. Quality evaluation of cereal and cereal products. In: LORENZ, K.J.; KULP, K. **Handbook of cereal science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 595-638.

REIS, E.M. Effects of rain and relative humidity on the release of ascospores and on the infection of wheat heads by *Giberella zaeae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 339-343, 1990.

- REIS, E.M.; BLUM, M.M.C.; CASA, R.T.; MEDEIROS, C.A. Grain losses caused by the infection of wheat heads by *Gibberellazeae* in southern Brazil, from 1984 to 1994. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 22, p. 134-137. 1996.
- RIZZO, I.; LORI, G.; VEDOYA, G.Y.; CARRANZA, M. Presencia de *Fusarium* y sus toxinas en la subregion triguera II norte de la Argentina. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA. 1.; ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8., 1994, Rio de Janeiro. **Anais ...** p. 757.
- SABINO, M.; ICHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 155-159, 1989.
- SAMAR, M.M.; FONTANA, C.F.; RESNIK, S.L.; PACIN, A.M.; CASTILHO, M.D. Distribution of DON in wheat, wheat flour, bran and glúten and variability associated with test procedure. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 86, p. 551-556, 2003.
- SAUER, D.B. **Storage of cereal grains and their products**. 4<sup>th</sup> ed. St Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992. 615 p. (AACC Monograph Series).
- SCHAAFSMA, A.W.; TAMBURINC-ILLINCIC, L.; MILLER, J.D.; HOOKER, D.C. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Vancouver, v. 23, p. 279-285. 2001.
- SCHOLLENBERGER, M.; JARA, H.T.; SUCHY, S.; DROCHNER, W.; MÜLLER, H.M. *Fusarium* toxins in wheat flour collected in na area in southwest Germany. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p. 85-89, 2002.
- SCOTT, P.M. Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and products, **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 65, p. 876-882, 1982.
- SCOTT, P.M. Mycotoxins transmitted into beer contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, p. 875-882, 1996.
- SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; DEXTER, J.E.; BRENNAN, P.W.; TRENHOLM, H.L. Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 1, n. 4, p. 313-323, 1984.
- SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; LAU, P.Y.; DEXTER, J.E.; GREENHALGH, R. Effects of Experimental Flour Milling and Breadbaking on Retention of Deoxynivalenol (Vomitoxin) in Hard Red Spring Wheat. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 421-424, 1983.
- SEITZ, L.M.; BECHTEL, D.B. Chemical, physical and microscopical studies of scab infected hard red winter wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 33, n. 3, p. 373-377, 1985.

SERGEANT, T.; PARYS, M.; GARSON, S.; PUSSEMIER, L.; SCHNEIDER, J-Y.; LARONDELLE, Y., Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 164, p. 167-176, 2006.

SHOTWELL, O.L.; BENNET, G.A.; STUBBLEFIELD, R.D.; SHANNON, G.M.; KWOLEK, W.F.; PLATTNER, R.D. Deoxynivalenol in hard red winter wheat: relationship between toxin levels and factors that could be used in grading. **Journal of the AOAC International**, Arlington, v. 68, n. 5, p. 954-957, 1985.

SOARES, V.M.L.; FURLANI, Z.P.R. Survey of micotoxins in wheat and wheat products sold in health food stores of the city of Campinas, state of São Paulo. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v. 27, p. 41-45, 1996.

SAS INSTITUTE. **SAS**. Cary, 2003.

SUTTON, J.C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Vancouver, v. 4, n. 2, p. 195-209, 1982.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL, Núcleo de Microbiologia, 2001. 82 p.

TRIGO-STOCKLI, M.D.; DEYOE, W.C.; SATUMBAGA, F.R.; PEDERSEN, R.J. Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled fractions of wheat. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 73, n. 3, p. 388-391, 1996.

VAN EGMOND, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins: overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. **Food Additive and Contaminants**, London, v. 6, n. 2, p. 139-188, 1989.

WINDELS, C.E. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 1, p. 17-21, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Deoxynivalenol. In: \_\_\_\_\_. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. London, 2001. p. 419-528. (Food Additives Series, 47).

YOUNG, J.C.; FULCHER, R.G.; HAYHOE, J.H.; SCOTT, P.M.; DEXTER, J.E. Effect of Milling and Baking on Deoxynivalenol (Vomitoxin) Content of Eastern Canadian Wheats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 32, n. 3, p. 659-664, 1984.

## APÊNDICES

Apêndice A - Tabela 4 Incidência de *Fusarium graminearum*, *Fusarium* spp., análise visual de grãos “giberelados”, análise do peso de mil grãos e contaminação com DON ( em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) das amostras de trigo nacional

AM	Proc	PMG	GG	Fg	F.spp	DON	AM	Proc	PMG	GG	Fg	F.spp	DON
		g	%	%	%	$\mu\text{g.Kg}^{-1}$			g	%	%	%	$\mu\text{g.Kg}^{-1}$
1	PR	30,0	0,0	0	0	<90	26	SP	27,8	0,0	0	2	N.D
2	PR	32,1	1,8	0	1	<90	27	SP	35,4	6,4	1	4	N.D.
3	RS	28,2	4,0	0	1	214	28	PR	20,1	2,2	0	0	<90
4	RS	34,1	3,0	0	1	<90	29	PR	30,3	2,0	4	4	674
5	SP	41,2	4,1	13	13	359	30	SP	38,6	1,3	4	4	299
6	SP	38,9	2,8	3	3	825	31	SP	36,6	2,0	4	4	333
7	SP	48,64	0,5	0	0	105	32	SP	34,1	0,9	3	3	299
8	PR	33,3	1,7	1	1	105	33	SP	34,1	2,5	1	2	120
9	SP	36,9	4,5	6	6	189	34	PR	33,0	0,8	0	3	<90
10	PR	33,9	0,0	0	0	<90	35	PR	36,6	0,6	0	0	236
11	PR	32,5	0,1	0	6	135	36	PR	36,0	0,8	0	1	233
12	PR	34,8	0,0	0	0	N.D.	37	PR	32,2	1,6	0	0	120
13	RS	29,2	3,2	0	0	465	38	PR	30,6	0,0	0	0	266
14	PR	33,5	2,8	0	0	<90	39	PR	25,5	20,6	30	30	4573
15	RS	29,5	4,7	0	0	<90	40	PR	24,6	13,7	33	34	3327
16	PR	32,0	2,2	0	0	135	41	PR	31,6	0,7	0	1	<90
17	PR	34,5	0,5	1	13	<90	42	PR	32,2	0,0	0	1	<90
18	PR	43,0	7,6	5	8	932	43	PR	33,4	0,0	0	5	135
19	PR	28,5	1,2	0	3	105	44	PR	34,0	2,5	0	0	120
20	PR	35,0	1,6	0	4	135	45	PR	32,2	2,8	1	1	120
21	PR	32,8	1,3	2	3	299	46	SP	40,3	1,1	3	3	<90
22	PR	33,1	0,5	0	0	<90	47	SP	41,1	3,8	1	2	449
23	PR	36,1	0,0	0	0	<90	48	SP	35,0	0,0	0	0	<90
24	PR	32,2	0,0	0	2	<90	49	PR	31,2	0,0	0	0	<90
25	SP	39,2	0,0	1	5	150	50	PR	29,7	0,0	0	5	349

Apêndice B. Incidência de *Fusarium graminearum*, *Fusarium* spp., análise visual de grãos “giberelados”, análise do peso de mil grãos e contaminação com DON ( em  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) das amostras de trigo importado

AM	Proc	PMG	GG	Fg	F.spp	DON	AM	Proc	PMG	GG	Fg	F.spp	DON
		g	%	%	%	$\mu\text{g.kg}^{-1}$			g	%	%	%	$\mu\text{g.kg}^{-1}$
51	Arg	34,3	2,1	0	1	216	75	Parag	33,3	1,5	0	0	90
52	Arg	32,4	0,9	0	2	<90	76	Parag	32,5	1,5	0	0	N.D.
53	Arg	34,2	2,5	0	0	<90	77	Parag	28,7	4,4	0	1	<90
54	Arg	34,7	4,3	3	3	299	78	Parag	32,6	1,3	0	0	<90
55	Arg	36,0	4,8	0	2	105	79	Parag	31,8	0,0	0	0	<90
56	Arg	35,2	6,3	0	0	233	80	Parag	31,0	0,0	0	0	<90
57	Arg	35,1	2,7	1	1	329	81	Parag	34,6	0,7	0	0	<90
58	Arg	35,6	2,5	0	1	105	82	Parag	33,2	1,1	0	0	<90
59	Arg	34,2	2,5	0	0	<90	83	Parag	37,3	2,2	0	1	<90
60	Arg	36,2	2,5	0	0	90	84	Arg	34,3	1,5	0	2	105
61	Arg	38,0	4,7	0	0	<90	85	Arg	33,9	1,5	0	2	105
62	Arg	34,8	2,5	0	6	90	86	Arg	35,0	1,6	0	0	105
63	Arg	34,6	1,4	0	1	<90	87	Arg	35,0	1,7	0	0	<90
64	Arg	34,6	1,3	0	1	<90	88	Arg	35,2	1,3	0	4	<90
65	Parag	36,2	0,0	0	0	349	89	Arg	33,7	2,8	1	5	105
66	Parag	34,4	2,0	0	1	135	90	Arg	34,6	2,4	0	1	259
67	Parag	32,5	1,0	0	2	135	91	Arg	34,6	2,3	0	0	<90
68	Parag	36,3	0,0	0	2	N.D.	92	Arg	34,9	2,0	0	3	105
69	Parag	32,8	1,3	0	1	N.D.	93	Arg	34,0	0,9	0	0	105
70	Parag	39,6	0,0	0	3	<90	94	Arg	35,6	1,4	1	1	105
71	Parag	32,3	3,0	0	0	<90	95	Parag	35,4	0,0	0	4	N.D.
72	Parag	32,1	3,0	0	0	<90	96	Parag	33,0	0,0	0	0	N.D.
73	Parag	32,3	3,5	0	2	<90	97	Parag	35,8	0,0	0	1	N.D.
74	Parag	29,1	4,7	0	2	192	98	Parag	30,0	0,0	0	2	<90
99	Parag	29,3	2,4	1	1	<90	100	Parag	36,2	0,0	0	0	<90

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)