



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

Centro de Ciências Agrárias  
Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos

JOICE SIFUENTES DOS SANTOS

**APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA: ANTICORPO  
MONOCLONAL ANTI-DESOXINIVALENOL PARA  
MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO PELO  
CONSUMO DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

---

LONDRINA - PR

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

JOICE SIFUENTES DOS SANTOS

**APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA: ANTICORPO  
MONOCLONAL ANTI-DESOXINIVALENOL PARA  
MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO PELO  
CONSUMO DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito final à obtenção do título  
de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisa Yoko Hirooka

Londrina - PR

2009

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profª Drª Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profª Drª Eliana Furlong  
Fundação Universidade Federal do Rio Grande

---

Profª Ijoni Hilda Costabeber  
Universidade Federal de Santa Maria

---

Prof. Dr. Carlos Kemmelmeier  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profª Drª Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de outubro de 2009.

*Dedicatória*

*Ao Diego, por todo amor e compreensão, apoio e  
companheirismo nos momentos mais difíceis;*

*Aos meus pais, Tânia e Olírio, e minhas irmãs Maúcha e  
Lírian, por acreditarem em mim e me incentivarem a nunca  
desistir dos meus sonhos, todo o meu amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

*À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação e incentivo, além de ser um exemplo de dedicação a Pesquisa;*

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

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa – CNPq, pela concessão da Bolsa de Doutorado e apoio financeiro, processo nº 479234/2008-6 e 47816-/2007-0;*

*À Fundação Araucária, UGF-SETI Fundo Paraná pelo apoio financeiro protocolo nº 9099;*

*Ao Dr. Osamu Kawamura, de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de hibridoma anti-DON.3 e pelas importantes informações a respeito de produção de reagentes imunológicos, sem os quais o trabalho não seria possível;*

*À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela orientação, apoio, prontidão e importantes ensinamentos no desenvolvimento deste trabalho;*

*À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela orientação e auxílio no desenvolvimento técnico para a execução do cultivo, manutenção de hibridomas e confecção de coluna de imunoafinidade;*

*Às Profas. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira e Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela participação e sugestões durante a Qualificação de Doutorado;*

*Aos pesquisadores Martha Zavariz de Miranda, João Leonardo Pires, Eduardo Caierão e Márcio Só e Silva (EMBRAPA Passo Fundo, RS), Manoel Carlos Bassói (EMBRAPA Londrina), ao Prof. Dr. Miguel Machinski Júnior (Universidade Estadual de Maringá), Jair Suguimoto e Valquíria Cecílio da Silva pelo fornecimento de amostras de trigo para execução deste trabalho;*

*Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann e Dr. Tibiriçá Vasconcelos, pela análise das amostras de trigo por CLAE-EM;*

*Às Profas. Dra. Ijoni Costabeber e Dra. Tatiana Emanuelli pela iniciação na Pesquisa, durante a Graduação e o Mestrado;*

*Aos Profs. Dr. Seiji Higarashi e Dr. Mário Augusto Ono, pela colaboração;*

*À Dra. Simone Fujii e à Mestra Luciana Hayashi, pelas orientações para o início do trabalho, na importante fase de cultivo dos hibridomas e purificação dos anticorpos, além de serem queridas amigas;*

*Aos técnicos de Laboratório Patrícia Sambatti, Elza Youssef e Neusa Cassula (Ciência e Tecnologia de Alimentos), Nelson Janeiro Rodriguez (Bioquímica), José Aparecido Rocha (Fitopatologia), Jurandir Pinto (Química Analítica) e Nilson de Jesus Carlos (Patologia Experimental), pelos auxílios prestados nas diferentes etapas deste trabalho;*

*Às Doutorandas Dani Luce Doro da Silva e Cássia Reika Takabayashi, importantes parceiras na execução deste trabalho, além de promoverem agradáveis e imprescindíveis momentos de descontração;*

*À Mestranda Tatiane Martins de Oliveira, pelo auxílio no cultivo dos híbridos, padronização do ensaio imunoenzimático e amizade;*

*Aos estagiários Ligia Martins, Jayme Almeida Filho e Igor Fernando Escanfelli, pela colaboração, amizade e descontração;*

*Aos colegas do grupo de Pesquisa, Dr<sup>a</sup> Sandra Garcia, Dr<sup>a</sup> Emília Kuroda, Luciana Bernd, Cleiton Ramos, Wagner Risso, Leandro Ferrari, Luciana Ferreira, Tatiana Miguel, Carolina Rossi, Thiago Montagner, Angélica Ishikawa, Francine Kuriama, Karla Guergueletto, Jaqueline Bordini, Diogo Pedrollo, Renata Sobotka, Maisa Leite, Livia Médici e Waneska Franco;*

*Aos amigos que já passaram pelo grupo de Pesquisa, Dra. Elisabete Hashimoto, Anié Francabandiera, Elaine Moreno, Alexandre Morey, Marcos Celli, Adriana da Silva, Alexandre Sasaki, Letícia Schiavo;*

*Aos amigos queridos Luciana Lobato, Caroline Calliari, Cláudio Ueno, Kérley Casaril, Cristiane Filgueiras, Giselle Nobre, Mariana Egea, Cristiane Canan, Luciane Yoshiara, Elvis Martins, Luis Rodrigo Morioka, Rafael Dias, Ana Augusta Xavier, Roberta Souza, Neusa Seibel, Lyssa Sakanaka, Dênis Marchi, Michele Rosset, Marciane Magnani, Carolina Bernardi, que sempre contribuíram auxiliando em alguma metodologia, ensinando algo novo, ou momento de descontração;*

*Aos meus sogros, Luiz e Isabel, e cunhadas, Luciana, Ana Cássia e Cristina, pelo apoio e carinho.*

*Às minhas queridas irmãs, Maúcha e Lírian, que apesar de toda a distância, estão diariamente no meu coração;*

*Aos meus pais, Olívio e Tânia, por sempre me incentivarem, favorecendo o meu crescimento pessoal e profissional, além de todo carinho e amor durante toda a minha vida;*

*Ao meu marido, Diego, por ter aceitado a aventura de uma nova vida. Sem ti, esta conquista não seria possível.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
5.1 MONOCLONAL ANTIBODY-BASED IMMUNOASSAY FOR DEOXYNIVALENOL SCREENING IN WHEAT AND WHEAT PRODUCTS.....	28
5.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE DERIVADOS DE TRIGO EM LONDRINA, PR, POR MEIO DE QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS .....	42
5.3 NATURAL OCCURRENCE OF DEOXYNIVALENOL IN WHEAT FROM SOUTH BRAZIL AND ESTIMATED DAILY INTAKE BY WHEAT PRODUCTS .....	53
5.4 DESOXINIVALENOL: MONITORAMENTO E PERIGO DE EXPOSIÇÃO POR TRIGO E PRODUTOS DERIVADOS EM LONDRINA-PR, BRASIL.....	68
5.5 TESTES PRELIMINARES PARA CONFECÇÃO DE COLUNA DE IMUNOAFINIDADE PARA CLEAN UP DE DESOXINIVALENOL.....	79
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS .....</b>	<b>86</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo Monoclonal
Ag-Ac	Antígeno-Anticorpo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATA	<i>Alimentary Toxic Aleukia</i> – Leucemia tóxica alimentar
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIA	Coluna de Imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DON	Desoxinivalenol, <i>deoxynivalenol</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EM	Espectrometria de Massas
FL	Fluorescência
HCK	Célula hematopoiética quinase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
H-SFM	Meio <i>Hybridoma-SFM</i> ( <i>serum free medium</i> )
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ic-ELISA	ELISA ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> ) <i>Indirect competitive</i>
IDE	Ingestão Diária Estimada
IDMTP	Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória
i-ELISA	ELISA ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> ) indireto
IgG	Imunoglobulina G
IMC	Índice de Massa Corporal
LC-MS	Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa
LOAEL	<i>Lower Observed Adverse Effect Level</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
OVA	Ovoalbumina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio - Tween
PDA	Photodiode Array (Arranjo de fotodiodo)
PKR	Proteína quinase ativada por RNA
QFCA	Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos
SFB	Soro fetal bovino
TFS	Fator de transcrição
UV	Radiação ultravioleta
WHO	Organização Mundial de Saúde

SANTOS, J.S. **Aplicação biotecnológica: anticorpo monoclonal anti-desoxinivalenol para monitoramento e avaliação da exposição pelo consumo de trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR. Orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisa Yoko Hirooka.

## RESUMO

*Fusarium* spp., fitopatógeno relevante no campo, pode produzir micotoxinas de ocorrência inevitável em produtos de origem vegetal. *F. graminearum* contamina trigo e pode produzir desoxinivalenol (DON), tricotoceno de caráter citotóxico, emético e inibidor de síntese protéica, responsável por perdas na agricultura e produção animal. Analítica sem uso de solvente tóxico e sem equipamento sofisticado tem sido a meta de biotecnologia no controle de qualidade visando segurança alimentar. O trabalho teve como objetivo padronizar método imunológico para detecção de DON em trigo e derivados e avaliar a Ingestão Diária Estimada (IDE) desta toxina pela população de Londrina-PR. Para isso, AcM foi produzido por hibridoma linhagem DON.3 em meio RPMI + 10 % de soro fetal bovino (SFB), sendo o meio gradativamente substituído por *Hybridoma-Serum Free Medium* (H-SFM), resultando em 2320 mL de sobrenadante de cultivo. Os sobrenadantes referentes aos meios contendo RPMI + 10 % SFB, 75 % e 100 % meio H-SFM (1690 mL) foram precipitados com sulfato de amônio a 40 % de saturação, dialisados contra PBS pH 7,3 seguido por água ultra-pura, obtendo-se 71,3 mg de AcM anti-DON semi-purificado para desenvolvimento de *Enzyme linked immunosorbent assay* ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) e coluna de imunoafinidade (CIA). O ensaio ic-ELISA padronizado consistiu de sensibilização com 2 µg/mL de DON-HG-BSA, anti-DON (1,25 mg/mL) diluído a 1:200 e anticorpo secundário (anti-IgGHRP) na diluição 1:2000, com limite de detecção 177,12 µg/kg. A performance do ic-ELISA desenvolvido foi comparada com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Arranjo de Fotodiodo (CLAE-PDA) e CLAE-Espectrometria de Massas (CLAE-EM). A análise de 34 amostras de trigo dos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul (safras 2006, 2007 e 2008) indicou a eficiência de ic-ELISA desenvolvido, com coeficiente de correlação com CLAE-PDA de 0,84 para detecção de DON em grão de trigo. DON foi detectado em 24 amostras (70,6 %) por CLAE-PDA (ND a 1531,5 µg/kg) e 17 (50,0 %) por ic-ELISA (ND a 1362,1 µg/kg), sendo a relação ic-ELISA/CLAE-PDA de 0,68. A análise de 44 amostras por CLAE-EM apresentou correlação de 0,93 com ic-ELISA, com DON detectado em 22 amostras (50,0 %) por CLAE-EM (ND a 9906,9 µg/kg) e 31 amostras (71,4 %) por ic-ELISA (ND a 12291,4 µg/kg), relação ic-ELISA/CLAE-EM de 1,64. A recuperação de DON por ic-ELISA em amostras artificialmente contaminadas variou de 26,9 % (gérmen de trigo) a 108,4 % (grãos de trigo). Metodologia de extração e posterior análise por ic-ELISA foi satisfatória para as amostras de grãos de trigo (recuperação 108,43 %, desvio padrão relativo DPR 11,7 a 16,1 %) e farinha de trigo (103,0 %, DPR 19,0 a 36,2 %), não ocorrendo o mesmo para quibe e gérmen de trigo. Em suma, o monitoramento de DON por ic-ELISA em 136 amostras de grãos de trigo, obtidas de campos experimentais e de produtores tritícolas, pertencentes a safras de 2006, 2007 e 2008, revelou a presença da toxina em 67,6 %, média de 2140,19 µg/kg (amostras positivas de 206,3 a 16076,5 µg/kg). Oitenta amostras (58,8 %) apresentaram nível de contaminação de DON inferior ao limite máximo permitido pela Comunidade Européia em cereais para o consumo humano (< 1750 µg/kg). Amostras oriundas do Paraná apresentaram contaminação inferior (845,8 µg/kg) à observada no Rio Grande do Sul (3163,8 µg/kg), sendo que também observou-se diferenças significativas entre as diferentes regiões dos Estados e, entre as três safras analisadas (p< 0,05). Referente a 44 amostras de trigo em diferentes fases de processamento em moinho (grão na recepção, trigo limpo, trigo úmido, farinha, gérmen e farelo de trigo), 16 (36,4 %) apresentaram-se positivas por ic-ELISA (ND a 4262,4 µg/kg). Analisando 22 amostras de trigo para quibe coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais paranaenses por inspetores da Vigilância Sanitária, DON foi detectado em 10 amostras (45,4 %, média de 166,1 µg/kg, ic-ELISA). Para avaliar o consumo de derivados de trigo, foi utilizado um Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos (270 indivíduos, baseado em população de 447000 habitantes e erro amostral de 6 %). Macarrão e pão francês foram os derivados mais consumidos, observando-se correlação entre o consumo de derivados de trigo e dados sócio-demográficos e antropométricos. A IDE foi calculada considerando-se nível de DON em 76 amostras de grãos de trigo produzidas no Paraná e fator de processamento. A IDE de DON apreciando o consumo de pão francês e macarrão foi 0,82 µg/kg peso corporal/dia, sendo que 85 indivíduos (32,7

%) ultrapassaram a Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória de 1 µg/kg p.c./dia. A confecção de protótipos de CIA, utilizando AcM anti-DON produzido, não foi concluída com êxito, devendo-se prosseguir desde etapa de produção de AcM. A ocorrência de DON em trigo e IDE apontam para necessidade de medidas de controle da produção da toxina a nível de campo, já que os métodos de processamento atualmente utilizados não promovem diminuição e/ou detoxificação de DON. As expectativas futuras prometem a utilização deste AcM como ferramenta para desenvolvimento de imunossensores, contribuindo com avanço metodológico através da automação de controle de qualidade – segurança alimentar.

**Palavras-chave:** desoxinivalenol, cadeia produtiva de trigo, ensaio imunoenzimático, exposição estimada.

SANTOS, J.S. **Application in biotechnology: anti-deoxynivalenol monoclonal antibody for monitoring and exposure assessment from wheat (*Triticum aestivum* L.) intake.** Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

### ABSTRACT

*Fusarium* spp., phytopathogen of field relevance, also manifests importance by mycotoxins production, of inevitable occurrence in products of vegetable origin, widely consumed. *F. graminearum* contaminate wheat and can produce trichothecenes, with emphasis on deoxynivalenol (DON), cytotoxic, emetic and inhibitor of proteic synthesis, responsible by losses in agriculture and livestock. Analytical without toxic solvents and sophisticated equipments are goal of biotechnology in the quality control, aiming food safety. Immunochemical methods presents advantages, like cost-effective, water and buffer use, equipment of simple operation and rapid execution, being essentials for trial of DON in food. The aim of this work is to develop an immunological method based on monoclonal antibody (mAb) for DON detection in wheat and wheat based products, involving samples from field, processing mill and commercial kibbe; as well as to evaluate the Estimated Daily Intake (EDI) of this compound by the population of Londrina – PR, Brazil. mAb was produced by hybridoma cell line DON.3 in RPMI + 10 % fetal bovine serum (FBS), that was gradually replaced by Hybridoma-Serum Free Medium (H-SFM), resulting in 2320 mL of cultivate supernatant. The cell culture in synthetic medium containing RPMI + 10 % FBS, 75 % and 100 % H-SFM (1690 mL) was precipitated with ammonium sulfate (40 % saturation), dialized against PBS pH 7.3 followed by ultrapure water, obtaining 71.3 mg of semi-purified anti-DON, used for development of enzyme linked immunosorbent assay indirect competitive ELISA (ic-ELISA) and immunoaffinity column (IAC). ic-ELISA was standardized in the following conditions: 2 µg/mL DON-HG-BSA, anti-DON (1.25 mg/mL) diluted to 1:200 and HRP-labeled goat IgG diluted to 1:2000, detection limit was 177.12 µg/kg. The ic-ELISA performance was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and HPLC-mass spectrometry (HPLC-MS). The analysis of 34 wheat samples from Paraná and Rio Grande do Sul states (2006, 2007 and 2008 crops) demonstrated reliability and efficiency of ic-ELISA, with IAC-HPLC correlation coefficient of 0.84. DON was detected in 24 samples (70.6 %) by IAC-HPLC (ND to 1531.51 µg/kg) and 17 samples (50.0 %) by ic-ELISA (ND to 1362.1 µg/kg), with ELISA/IAC-HPLC relation of 0.68. The analysis of 44 samples by HPLC-MS demonstrated high correlation with ic-ELISA ( $r = 0.93$ ). DON was detected in 22 samples (50.0 %) by HPLC-MS (ND to 9906.9 µg/kg) and 31 samples (71.4 %) by ic-ELISA (ND to 12291.4 µg/kg), with relation ELISA/HPLC-MS of 1.64. DON recovery in artificially contaminated samples ranged from 26.9 % (wheat germ) to 108.4 % (wheat grain). The extraction methodology and later ic-ELISA analysis was satisfactory for samples of wheat grain and wheat flour. Wheat kibbe samples presented high relative standard deviation. Summary, survey of DON by ic-ELISA in 136 wheat grain samples, obtained from trial fields and wheat producers, from 2006, 2008 and 2008 crops revealed the presence of DON in 67.6 %, mean level 2140.2 µg/kg, levels over positive samples ranging from 206.3 to 16076.5 µg/kg. Eighty samples (58.8 %) presented lower levels than maximum level permitted by European Commission for cereals for human consume ( $< 1750$  µg/kg). Samples from Parana exhibited lower levels (845.7 µg/kg) when compared to Rio Grande do Sul (3163.8 µg/kg). Differences in DON levels were also observed among the States regions and three crops analyzed. Regard 44 samples obtained from different steps of wheat processing (reception grains, clean wheat, moist wheat, flour, germ and bran), 16 (36.4 %) presented positive levels by ic-ELISA (ND to 4262.37 µg/kg). analyzing 22 kibbe samples collected in Paraná commercial establishments by the Sanitary Surveillance inspectors, DON was detected in 10 samples (45.4 %), mean 166.1 µg/kg (ic-ELISA). To evaluate intake habits of wheat and wheat products, a Food Frequency Questionnaire was applied in Londrina, Paraná, Brazil (270 persons, based on 447000 inhabitants and 6 % sampling error). Pasta and bread were the most consumed wheat derivatives and a correlation between wheat products intake, social-demographic and anthropometric data were observed. Estimated Daily Intake (EDI) was calculated considering DON level in 76 wheat grain samples from Paraná and processing factors. The EDI of DON regard bread and pasta consumption was 0.82 µg/kg body weight/day, 85 (32.7 %) individuals are above Provisional Tolerable Daily Maximum Intake settled in 1 µg/kg b.w./day. The making of 4 immunoaffinity columns prototypes was not concluded with success, due to absence on DON retention by antibodies. The results of DON occurrence in wheat and EDI pointed to the necessity of toxin production control on field level, since processing methods actually used do not promote DON diminish and/or detoxification, and the DON intake could cause toxic effects in the population. Future expectatives promised the utilization of this mAb produced as a tool for immunosensors development, contributing to methodological advance through quality control automation, improving food safety.

**Key-words:** deoxynivalenol, wheat, immunoassay, exposure estimation.

## 1 INTRODUÇÃO

O fator climático e a extensão do territorial favorecem a posição de destaque do Brasil no cenário mundial agropecuário, favorecido, sendo um dos raros países ainda com possibilidade de expandir a fronteira agrícola sem afetar a área de preservação ecológica. O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos alimentos mais difundidos na alimentação humana mundial, responsável por cerca de 20 % de calorias diárias.

Entre diversas *commodities* produzidas pelo Estado do Paraná, o trigo merece destaque, visto que a produção representa cerca de 53 % da safra nacional (IBGE, 2009). A Região Norte do Estado é a principal produtora de trigo, com área equivalente a 41 % do total semeado. A produção nacional aumentou durante os últimos anos, reflexo de uma maior área plantada e melhor produtividade, demonstrada pela produção nacional de 5,8 milhões de toneladas no ano de 2008 (CEPEA, 2008). No entanto, as expectativas de aumento de produção para a safra de 2009 foram frustradas, devido aos elevados índices de chuva ocorridos. A produção de trigo do Paraná foi de 3,2 milhões de toneladas em 2008, e a previsão inicial de 3,5 milhões de toneladas para 2009 terá uma queda para aproximadamente 2,7 milhões de toneladas. Assim, para abastecer o consumo nacional aproximado de 10 milhões de toneladas, faz-se necessária a importação do produto (CONAB, 2009). Além da quebra na safra, a chuva também foi fator importante que pode estar associado ao desenvolvimento fúngico e conseqüente produção de micotoxinas. Para suprir a demanda nacional de trigo, com vistas à auto-suficiência, a Região Centro-Oeste do país tem sido utilizada para expansão da triticultura. Ao contrário das regiões tradicionalmente produtoras, esta região apresenta umidade relativa baixa no inverno, com alta insolação, ausência de geadas, secas e granizo e pequena necessidade de secagem (tempo seco na colheita). Esses elementos climáticos favorecem a cultura, tanto na produtividade quanto na qualidade do produto obtido, além das poucas injúrias causadas por pragas e doenças (CÁNOVAS et al., 2004).

O trigo pode estar contaminado por fungos, como *Fusarium graminearum*, importante produtor de micotoxinas, metabólitos secundários fúngicos de presença natural e inevitável em produtos de origem vegetal.

Entre micotoxinas produzidas em trigo, desoxinivalenol (DON) tem sido a toxina de *Fusarium* spp. mais freqüentemente reportada no mundo, assim como detectada em maior concentração, considerada como “toxina indicadora” de contaminação por este grupo de fitopatógeno (PRANGE et al., 2005). DON possui estrutura sesquiterpenóide, é tricoteceno do tipo B responsável por efeitos tóxicos como decréscimo ou rejeição de alimentação, vômitos e distúrbios digestivos (com conseqüente perda de peso) e inibição da síntese protéica.

Micotoxinas causam importantes impactos econômicos, devido à redução na produtividade vegetal e animal; e toxicológicos, observados tanto em humanos como em animais. Assim, metodologias analíticas capazes de detectar baixas concentrações dessas substâncias são essenciais para garantir o controle de qualidade de matéria-prima fornecida às indústrias, e de produtos industrializados, para alimentação humana e animal. Atualmente, métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) são os mais utilizados, acoplados a detectores UV-visível e espectrômetro de massa (*MS*). No entanto, estas metodologias requerem equipamentos de alto custo, com uso de grandes volumes de solvente e extensiva extração e purificação das amostras. Neste sentido, métodos imunológicos, como ensaio imunoenzimático ELISA e cromatografia por imunoafinidade, têm sido objeto de aprimoramentos, devido a sua grande importância para triagem rápida de alimentos contaminados e com resultados quantitativos confiáveis.

Base da produção de métodos imunológicos, anticorpos monoclonais (AcM), produzidos em meios sintéticos a partir de linhagens específicas de hibridomas, são caracterizados por alta especificidade, uniformidade e afinidade constante a um único epítipo. A tecnologia de hibridomas permitiu a produção contínua de anticorpos em larga escala.

A ausência de legislação específica para a presença de tricotecnos em alimentos no Brasil é um dos fatores da falta de monitoramento de trigo e outros grãos. Aliado a isso, existe dificuldade de implantação de métodos de fácil execução na rotina do controle de qualidade de cooperativas e empresas processadoras. Desta maneira, não existe um mapeamento do trigo importado pelo país, havendo apenas trabalho acadêmico isolado (CALORI-DOMINGUES et al., 2007).

Até o presente momento, o fornecimento de 'kits' de ELISA e colunas de imunoafinidade é dependente da importação destes produtos, o que acarreta custo adicional aos fabricantes de alimentos e rações. Assim, o objetivo desta Tese de Doutorado é a produção de reagentes imunológicos visando desenvolvimento de imunoenensaio ELISA e coluna de imunoafinidade para serem utilizados no controle de DON na cadeia produtiva de trigo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Produzir reagentes imunológicos na forma de anticorpos monoclonais específicos para desoxinivalenol (DON) e destinados ao uso em imunoenensaio ELISA e preparo de coluna de imunoafinidade, visando padronização de 'kits' para uso no controle de qualidade na cadeia de trigo. Paralelamente, monitorar a aplicabilidade e eficácia dos reagentes produzidos, empregando-os na implementação de imunoenensaio como ferramenta prática no diagnóstico rápido de DON.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Cultivar e manter hibridoma linhagem DON.3, secretor de anticorpo monoclonal (AcM) IgG específico para DON;
- Produzir e purificar IgG anti-DON procedendo ao cultivo de hibridoma DON.3 em meio sintético, obtendo anticorpo com especificidade e afinidade passível de ser empregado em imunoenensaio;
- Padronizar ensaio imunoenzimático ic-ELISA utilizando AcM anti-DON produzido visando monitoramento de DON em trigo e produtos derivados;
- Avaliar a influência do processamento do trigo para fabricação de derivados nos níveis de DON;
- Levantar dados de consumo de produtos derivados de trigo e estimar a exposição à DON através dos dados de contaminação de trigo;
- Desenvolver coluna de imunoafinidade empregando AcM anti-DON e suporte gel ativado.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS COM ÊNFASE A DESOXINIVALENOL EM TRIGO**

SANTOS, Joice Sifuentes; ONO, Elisabete Yurie Sataque; ONO, Mario Augusto; ITANO, Eiko Nakagawa; HIROOKA, Elisa Yoko. **Revista Biosáude**, aceito com pequenas alterações. Versão atualizada do artigo submetido à publicação.

#### **Resumo**

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial agropecuário, favorecido pelo fator climático e extensão do território nacional, sendo um dos raros países que ainda apresenta possibilidade de expandir a fronteira agrícola sem afetar a área de preservação ecológica. Aliado à preocupação com a ampliação da área plantada e rendimento das mais variadas *commodities*, o país também deve se preocupar com a qualidade do alimento produzido, seja para o consumo interno quanto à exportação. Micotoxinas constituem toxinas naturais de ocorrência inevitável em produtos de origem vegetal, sendo o constante monitoramento um requisito obrigatório na rotina de controle de qualidade. Metodologias analíticas sem o uso de solventes tóxicos e equipamentos sofisticados tem sido uma meta na inserção de nanotecnologia na análise laboratorial. Desoxinivalenol é toxina produzida principalmente por *Fusarium graminearum*, responsável pela fusariose em trigo, um dos principais alimentos da cadeia alimentar humana, sendo o Estado do Paraná o principal produtor nacional. A revisão compila informações enfocando química, bioquímica, toxicologia, metodologias analíticas e perigo de contaminação de desoxinivalenol por meio do consumo de trigo e produtos derivados.

**Palavras-chave:** micotoxinas, desoxinivalenol, trigo, toxicidade.

#### **Abstract**

Brazilian agri-food system plays an important role in the world agribusiness, due to its favorable climatic condition and huge territorial land. Brazil is classified as an exceptional country with possibility of further expansion of agricultural frontier without ecological preservation damage. In addition to care concerning the enlargement of cultivated area and commodities yield, the country has to improve the food quality for both internal consumption and exportation. Mycotoxins are natural toxins of unavoidable occurrence in vegetable origin products, where the continuous monitoring is requested in the routine of quality control. Analytical methodologies avoiding the use of toxic solvents and sophisticated equipments have been the goal of the rapid nano-laboratorial analysis. Deoxynivalenol is toxin produced mainly by *Fusarium graminearum*, which causes Fusarium head



blight in wheat, that is the major ingredient in food. The review compiles information focused on chemistry, biochemistry and toxicological hazard due to contaminated wheat and derived products.

**Key words:** mycotoxins, deoxynivalenol, wheat, toxicity.

### **Introdução**

Alimentos isentos de contaminantes tóxicos constituem assunto prioritário na saúde humana, cuja preocupação crescente tem exigido rigoroso controle. O trigo (*Triticum aestivum* L.), por exemplo, é um alimento de consumo mundial, sendo um dos ingredientes mais difundidos na dieta humana, que pode ser contaminado por micotoxinas. Micotoxinas são metabólitos secundários fúngicos, relevantes na toxicologia humana e animal, sendo classificados na categoria de “toxinas naturais” (KUIPER-GOODMAN, 1995). *Fusarium* spp. constitui fitopatógeno freqüente em grãos como trigo, milho, cevada, entre outros. *Fusarium graminearum* causa fusariose ou giberela e predomina no trigo contaminado, sendo a mais importante doença desta cultura. O fato constitui motivo de perda econômica devido à redução na produtividade, além da produção de metabólitos secundários tóxicos pertencentes ao grupo de tricotecenos, por exemplo. Entre tricotecenos do grupo B, desoxinivalenol ou vomitoxina induz vômito e conseqüente perda de peso, principalmente em suínos. Esta revisão enfoca a química, bioquímica, toxicologia, metodologias analíticas e perigo de contaminação de desoxinivalenol oriundo do consumo de trigo e derivados.

### **Trigo**

O trigo, originário do Oriente Médio (Ásia), cultivado no Brasil desde 1534, foi introduzido pelos imigrantes portugueses (OSÓRIO, 1992). Ocupando cerca de 20% da área mundial cultivada, é um dos principais alimentos da humanidade, cuja produção aproximada de 500 milhões de toneladas/ano concentra-se na Rússia, Ucrânia, Estados Unidos, China, Índia e França, responsáveis pela oferta de 60% da produção.

No Brasil, a produção de trigo atingiu 4,7 milhões de toneladas no ano 2005, diminuindo para 3,8 milhões de toneladas na safra de 2007. Em 2008, devido a maior área plantada e melhor produtividade, a safra chegou a 6 milhões de toneladas, sendo o Estado do Paraná responsável por 53 % da produção nacional (IBGE, 2009). No entanto, o consumo nacional é de cerca de 10 milhões de toneladas, havendo a necessidade de importação do produto (CONAB, 2009).

O trigo brasileiro (*Triticum aestivum* L) atinge 0,5 a 1,5 m de altura e apresenta raiz em forma de cabeleira, caule oco e reto (colmo), 6 a 9 folhas estreitas e compridas; as flores em grupo de 3 a 5 formam espiguetas, agrupados em número de 15 a 20, constituindo a espiga. O fruto (grão) é uma cariopse seca e pequena, com desenvolvimento concluído 30 dias após a fecundação. Sendo cereal de clima temperado e moderadamente seco, geadas no início do desenvolvimento favorecem a produtividade, uma vez que estacionam o crescimento vegetativo em favor do sistema radicular.

Todavia, as geadas tardias, no estágio da floração, são totalmente desfavoráveis, com o conseqüente abortamento de flores.

A composição centesimal deste grão é 12,4 g de umidade; 12,8 g de proteínas; 1,3 g de cinzas; 1,9 g de lipídios, 14,7 g de fibra alimentar e 56,7 g de carboidratos disponíveis (FUJITA; FIGUEROA, 2003). O teor máximo de umidade tecnicamente recomendada para a conservação e empacotamento do trigo é 13% (BRASIL, 2001).

O trigo representa aproximadamente 20% das calorias na dieta humana, tornando-o componente importante na alimentação. Os derivados imediatos são farinha branca e integral para a produção de pão, macarrão, bolo, massas (tortas, empadas, pastéis), panqueca, pizza, assim como o triguilho, utilizado no preparo de quibe, torta de quibe, tabule e produtos diversos (CORNELL; HOVELING, 1998). Os produtos a base de trigo fornecem proteínas de alto valor biológico e carboidratos complexos (principalmente amido e fibras), bem como vitaminas do complexo B e ferro (CORNELL; HOVELING, 1998).

#### **Importância de *Fusarium* spp. na cultura do trigo**

O gênero *Fusarium* spp. se distribui amplamente na natureza, seja como saprófitas ou parasitas, encontrado numa grande variedade de plantas e produtos agrícolas, principalmente cereais. Entre as espécies de *Fusarium*, na cultura do trigo predomina o *Fusarium graminearum*, capaz de colonizar também o milho, cevada e outros cereais (BRIYONES-REYES et al., 2007).

As toxinas fúngicas produzidas na pré-colheita são denominadas toxinas de campo, como tricotecenos, fumonisinas e zearalenona. As produzidas na pós-colheita constituem as toxinas de armazenamento, a exemplo de ocratoxinas e aflatoxinas (CHAMPEIL et al., 2004).

As espécies de *Fusarium* spp. são responsáveis pela produção de toxinas de campo, com destaque a *Fusarium graminearum* Schuwabe, causador da fusariose ou giberela em trigo. *F. graminearum* é a fase assexual do fungo *Gibberella zeae* (CASA et al., 2004). A giberela é apresentada por envolturas florais da espiga infectada, surgindo pequenas massas rosadas constituídas pelos esporos do patógeno (“espiga-branca”). A fusariose é uma doença de infecção floral, cujos esporos caem sobre as anteras expostas, germinam e emitem micélios e através do filete atingem o ovário. A instalação da infecção requer um prolongado período de molhamento da espiga (30 a 48 horas) e temperatura entre 22 e 25°C (OSÓRIO, 1992). A doença resulta em perdas na produção de até 50% (PARRY et al., 1995) e contaminação adicional com zearalenona, desoxinivalenol e outros tricotecenos (nivalenol, toxina T-2, toxina HT-2) (PLACINTA et al., 1999). Além disso, a fusariose destrói os grânulos de amido e paredes celulares, afetando a estocagem de proteínas do endosperma, resultando em uma baixa qualidade do produto (SNIJDERS, 2004). Devido à característica hidrossolúvel de DON e deslocamento no floema, assume-se que ocorra fluxo desta micotoxina para tecidos não infectados por *Fusarium* spp.

Entre os fatores que influenciam o aparecimento da fusariose, o clima é determinante. No entanto, em um determinado ano, campos vizinhos podem desenvolver diferentes níveis de contaminação, em razão da influência do sistema de plantio (CHAMPEIL et al., 2004). O uso de fungicidas no decorrer do plantio de trigo não garante a ausência de toxinas no grão colhido. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade e condições de armazenamento também interferem na produção de metabólitos fúngicos, podendo ocorrer produção simultânea de micotoxinas (BULLERMAN et al., 1984). Produção orgânica parece reduzir as taxas de infecção de fusariose e conseqüente menor contaminação por micotoxinas, se comparado ao sistema convencional de produção (BIRZELE et al., 2002).

O controle estratégico de giberela baseia-se no desenvolvimento de cultivares resistentes e uso de fungicidas aplicados na parte aérea na fase de floração. Algumas características morfológicas contribuem para a proteção contra a infecção, tais como plantas altas sem barba e plantas com espigas frouxas, tendem a menores taxas de infecção natural do que plantas de porte menor com barbas (SNIJDERS, 2004). A giberela classifica-se como doença de difícil controle (CASA et al., 2004), sendo os fungicidas autorizados para uso metoconazole, procloraz, propioconazole e tebuconazole (REUNIÃO..., 2004). A resistência à fusariose pode ser de dois tipos: resistência à penetração inicial (tipo I) e resistência à propagação do patógeno no tecido hospedeiro (tipo II) (SNIJDERS, 2004).

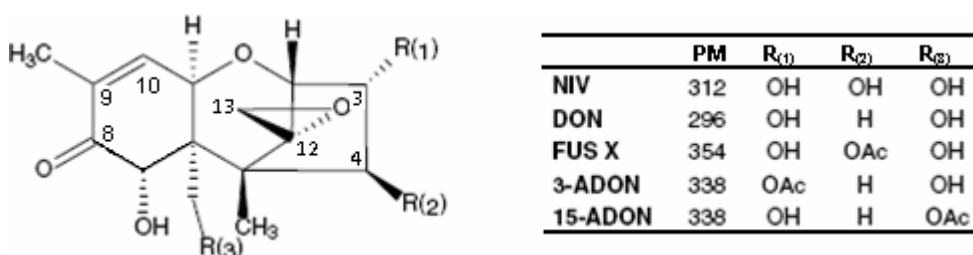
As micotoxicoses produzem uma variedade de sinais clínicos, dependendo de fatores como o tipo e concentração da micotoxina, duração da exposição e grau, gênero, idade e saúde do animal. Uma exposição prolongada resulta em imunodepressão, i.e. aumento da suscetibilidade a doenças secundárias causadas por vírus, bactérias e fungos (CONKOVÁ et al., 2003). Também deve-se considerar o fator sinérgico entre as diversas micotoxinas e fatores toxicológicos ambientais, resultando em multiplicação de efeitos adversos à saúde humana e animal.

### **Desoxinivalenol**

A toxina desoxinivalenol (DON) pertence ao grupo de tricotecenos da família dos sesquiterpenóides, contendo uma dupla ligação entre as posições C<sub>9,10</sub>, um anel epóxido na posição C<sub>12,13</sub> e um número variável de grupos hidroxila e acetil (Figura 1). Embora o número de tricotecenos identificados e caracterizados supere os 150 análogos, somente poucos são detectados em cereais naturalmente contaminados, pertencendo principalmente a grupo de tricotecenos do tipo A ou B. Os tricotecenos do tipo A (toxina T-2, toxina HT-2, neosolaniol e diacetoxiscirpenol) não possuem função carbonila C<sub>8</sub> conjugada à dupla ligação C<sub>9,10</sub>, impedindo a absorção de radiação ultravioleta. Em contraste, os tricotecenos do tipo B (desoxinivalenol e nivalenol) contém um grupo carbonila no C<sub>8</sub>, portanto, esta conjugação com a dupla C<sub>9,10</sub> permite detecção empregando radiação ultravioleta.

Devido à toxicidade, os tricotecenos são classificados como toxinas gastrintestinais, dermatotoxinas, imunotoxinas, hematotoxinas e genotoxinas (CONKOVÁ et al., 2003). Em cães, gatos e aves, os sintomas agudos incluem inflamação dérmica, taquicardia, diarreia, edema, necrose

dérmica, hemorragia na mucosa estomacal e intestinal, distúrbios no sistema hematopoético, incluindo leucopenia, trombocitopenia, sangramento no cérebro, danos aos nervos e rejeição a alimentos (PESTKA et al., 2005). Os efeitos crônicos podem ser atrofia ou hiperplasia do sistema hematopoético, tumores de tireóide, dutos biliares e hipotálamo, hiperqueratose inflamatória do estômago, bem como papilomas e efeitos imunossupressores (PESTKA et al., 2005). Necrose da cavidade bucal é freqüente em aves. Entre os tricotecenos, DON ou vomitoxina, tem como principal efeito tóxico o decréscimo ou rejeição de alimentação, vômitos e distúrbios digestivos com conseqüente perda de peso. Os suínos são os mais suscetíveis, se comparados a aves e ruminantes.

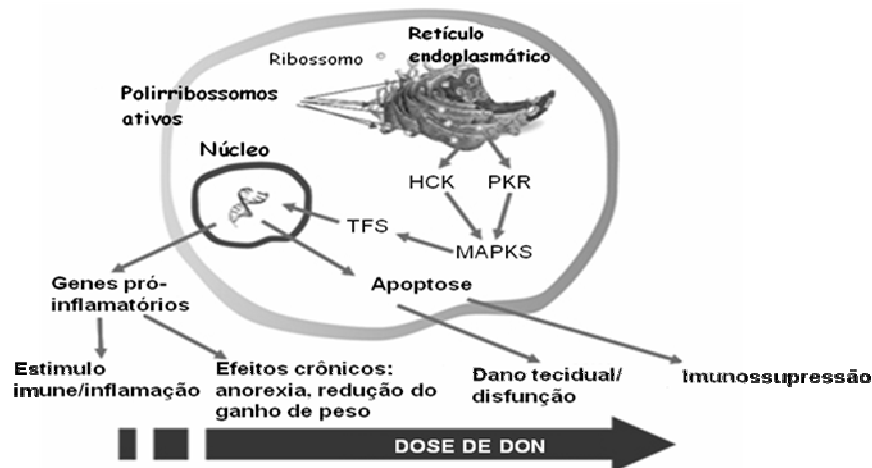


**Figura 1:** Estrutura química de tricotecenos. NIV= nivalenol, DON= desoxinivalenol, FUS X= fusarenona X, 3-ADON= 3- acetil desoxinivalenol, 15-ADON= 15-acetil desoxinivalenol, PM= peso molecular.

Mecanismo de toxicidade de DON é a inibição da síntese protéica em eucariotos. Tricotecenos se ligam a sub-unidade 60S dos ribossomos e interagem com peptidiltransferases, que inibem a formação de ligações peptídicas (SUDAKIN, 2003). Na Figura 2 está apresentado um esquema geral sobre os efeitos causados por DON. Os leucócitos são os principais alvos de tricotecenos, que podem atuar como imunoestimuladores ou imunossupressores, dependendo da dose, freqüência e tempo de exposição (PESTKA et al., 2004). Exposição a baixas doses de DON regulam a expressão de citocinas, quemocinas e genes inflamatórios, que colaboram com a estimulação imune. Exposição a altas doses de DON promovem apoptose leucocitária, com simultânea supressão imune. MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno) são importantes agentes da cascata de eventos relacionada à imunoestimulação induzida por tricotecenos e apoptose. Estudos com inibidores e genes silenciadores indicam que HCK (célula hematopoiética quinase) e PKR (proteína quinase ativada por RNA) atuam na fosforilação de MAPK induzida por DON e subsequente indução da expressão gênica e apoptose.

Ma e Guo (2008) apontam relação de DON e câncer esofágico em regiões da África e China, bem como associação entre tricotecenos e câncer hepático. No entanto, a presença de fatores de confundimento como aflatoxinas e fumonisinas, dificulta a prova de que DON tenha sido o único causador de câncer. Reconhecido caso de epidemia associada a ingestão de tricotecenos ocorreu na década de 1930, na Rússia. A doença ficou conhecida como leucemia tóxica alimentar (*Alimentary Toxic Aleukia* – ATA), quando a população foi forçada a consumir cereais contaminados por espécies

de *Fusarium* spp. São descritos 4 estágios da ATA: (1) severos sintomas gastrintestinas, que duram de 3 a 9 dias; (2) melhora dos sintomas, concomitante desenvolvimento de anemia, trombocitopenia e leucopenia, após um período de várias semanas; (3) se houver exposição persistente, surgem lesões necróticas nas vias aéreas e complicações hemorrágicas; (4) convalescença, com o cessamento da exposição, finalmente são resolvidas as lesões necróticas e anormalidades hematológicas.



**Figura 2:** Representação das interações moleculares e mecanismos envolvidos na toxicidade desencadeada por tricotecenos. HCK, PKR, MAPK e TFS atuam como reostatos moleculares e definem se ocorrerá resposta imunoestimulatória ou imunossupressiva. Fonte: Riley e Norred (1996).

HCK= Célula hematopoiética quinase; PKR= Proteína quinase ativada por RNA; MAPK= Proteína quinase ativada por mitógeno; TFS= Fator de transcrição.

A elevada estabilidade química de DON dificulta a sua redução, seja na estocagem ou durante processamento térmico como cozimento, assamento ou fermentação (PRANGE et al., 2005). Uma elevada contaminação por *Fusarium* spp. em trigo tem sido associada à perda na qualidade de panificação e redução no volume de pão. Portanto, medidas preventivas desde o início do cultivo no campo tornam-se essenciais para evitar matéria-prima contaminada.

Sabino et al. (1989) avaliando 70 amostras de trigo brasileiro, detectaram contaminação em apenas 2 amostras de farelo de trigo, com níveis de 183 µg/kg, sendo estas amostradas de matéria-prima utilizada como ingrediente de ração em caso suspeito de intoxicação. Segundo os autores, a ocorrência de DON nesta avaliação de 1989 não refletiu uma preocupação alarmante, sendo os baixos níveis detectados atribuídos às condições ambientais (umidade e temperatura).

Pesquisadores brasileiros (CALORI-DOMINGUES et al., 2007) detectaram DON em 94 % das amostras de trigo nacional (50 amostras) analisado e 88 % de trigo importado (50 amostras, safra de 2005). O trigo nacional apresentou uma contaminação média de 332 µg/kg, enquanto o trigo importado apresentou uma contaminação estatisticamente inferior (90 µg/kg; p<0,05). As amostras de trigo nacional eram provenientes do Estado do Paraná (28 %), São Paulo (28 %) e Rio Grande do Sul (8 %); o trigo importado da Argentina e Paraguai (50 % de cada país). Lamardo et al. (2006),

analisando 28 amostras de trigo comercial nacional, detectaram DON em 50 % das amostras de farinha de trigo, com contaminação média de 296,3 µg/kg (amostras positivas), enquanto 33 % das amostras de trigo em grão apresentaram contaminação de 753,2 µg/kg (média das amostras positivas) por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo alguns confirmados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Tutelyan (2004), empregando CCD e CLAE, avaliou 2166 amostras de trigo estocados entre 1989 e 2002 na Rússia e detectou DON em 69%. Entre as amostras positivas, o nível de DON variou de 50 a 8600 µg/kg, com 37 % ultrapassando o limite máximo de exposição tolerável. Quiroga et al. (1995) analisaram amostras de trigo da Argentina entre os anos de 1985 e 1992 e detectaram contaminação em 49,6 % das amostras, com DON em níveis variando de não detectável (safra 1990 e 1992) a 40,8 µg/kg (safra -1986), empregando CCD. Lori et al. (2003) analisando 145 amostras de trigo duro de cinco localidades da província de Buenos Aires, Argentina, detectaram níveis entre 0 e 8440 µg/kg por CCD. Schollenberger et al. (2005) avaliaram 5 amostras de trigo contaminadas na Alemanha, procedendo análise de DON por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Os níveis de DON variaram de 31 a 95 µg/kg, abaixo dos limites máximos permitidos naquele país (500 µg/kg).

### **Legislação e detoxificação**

O limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia para a presença de DON em cereais não-processados é de 1750 µg/kg para trigo e aveia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2005). Além do máximo permitido em cereais não transformados, existem valores máximos para farinha de cereais (750 µg/kg), pães, produtos de pastelaria, bolachas, refeições leve à base de cereais e cereais para refeições (500 µg/kg), massas alimentícias secas (750 µg/kg) e alimentos destinados a lactentes e crianças (200 µg/kg). A Legislação brasileira e o Mercosul ainda não determinaram limite máximo permitido para DON em trigo ou qualquer outro alimento destinado ao consumo humano ou animal. No Canadá, o limite para desoxinivalenol em ração para gado e ave é de 5000 µg/kg e para porcos, novilhas e animais em lactação de 1000 µg/kg. Na Alemanha, o limite de DON em grãos para uso como alimento e seus produtos é 500 µg/kg, exceto para DON em pães e correlatos, onde não deve exceder 350 µg/kg (SCHOLLENBERGER et al., 2005).

Estratégias de detoxificação para alimentos e rações contaminados para reduzir ou eliminar os efeitos tóxicos de DON e outras micotoxinas por métodos químicos, físicos e biológicos são cruciais para a segurança, prevenção de perdas econômicas e recuperação de alimentos contaminados. Alguns processos são apresentados em revisão publicada por Zinedine et al. (2007). Degradação e detoxificação ocorrem sob altas concentrações de ozônio (O<sub>3</sub>). Também relata a destruição de micotoxinas por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dependente de concentração, temperatura e período de exposição. A extrusão de determinados produtos de cereais, amplamente utilizada na indústria para fabricação de cereais matinais, petiscos e ração para pequenos animais melhora a qualidade de produtos processados, além do potencial redutor nos níveis de micotoxinas. Adição de adsorventes

nutricionalmente inertes (aluminossilicatos e aluminossilicatos contendo argila) tem sido recentes propostas para reduzir a toxicidade de micotoxinas, mas questiona-se o efeito na biodisponibilidade de nutrientes essenciais traços (LEMKE et al., 1998). Colestiramina (sal biliar) foi testada e confirmada como agente protetor contra micotoxinas (AVANTAGGIATO et al., 2004). Abordagem promissora com menor efeito colateral tem sido o uso de polissacarídeos naturais de origem microbiana, incluindo bactérias, leveduras e fungos (ZINEDINE et al., 2007). Estes fatos indicam a importância de boas práticas de produção do alimento em nível de campo e/ou armazenagem, devendo-se considerar desde a escolha de híbridos, manejo, plantio até as condições climáticas.

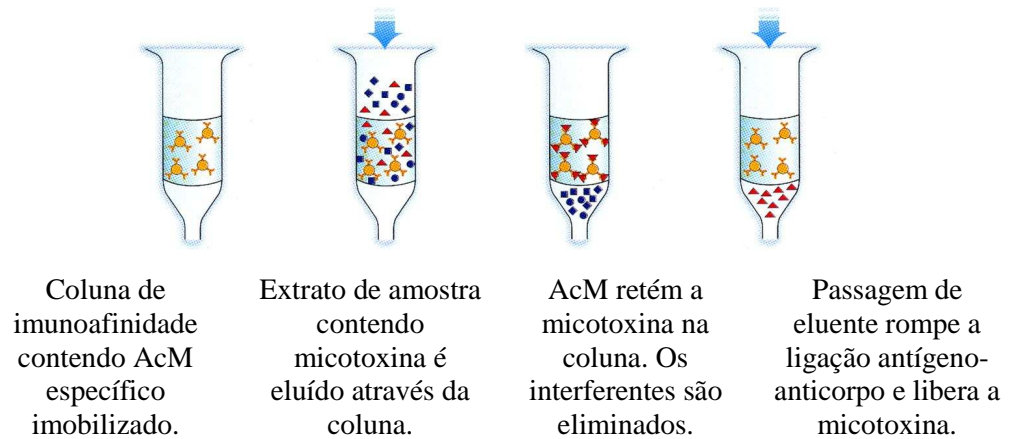
### **Metodologia analítica**

A análise de contaminantes em grãos e produtos vegetais não é simples. Diversas variáveis devem ser cuidadosamente controladas, sendo essencial uma amostragem adequada de quantidade representativa do material inicial; tratamento, estocagem, preparação e subamostragem de uma amostra, para garantir a representatividade do material testado. Além disso, a análise também se complica pela possível heterogeneidade do material inicial e pela presença de contaminantes provenientes da estocagem ou distribuição. Durante a análise, testes como precisão, exatidão e limite de detecção são necessários para garantir que os níveis medidos sejam representativos do material de partida e que os erros analíticos sejam minimizados (SOARES, 2006).

Para pré-limpeza (*clean-up*), as técnicas utilizadas podem ser agrupadas em químicas e imunológicas. Entre as técnicas químicas, a extração em fase sólida tem sido o método mais freqüente (SPE, *solid phase extraction*). A metodologia emprega os mais diversificados materiais, como adsorventes, a exemplo de carvão-alumina (ROMER, 1986), resina de troca iônica e sílica (MATEO et al., 2002), florisil (MATEO et al., 2002; TANAKA et al., 2000), carbono preto grafitizado (LAGANA et al., 2003) e colunas MycoSep® (ROMER, 1986; SCHOTHORST; JEKEL, 2001). A dificuldade no uso destes materiais deve-se ao seu alto custo, impossibilidade de reutilização e manutenção de interferentes no extrato obtido. Para contornar estes problemas, colunas de imunoafinidade (CIA) produzidas com anticorpos monoclonais de alta especificidade e sensibilidade têm sido desenvolvidas para obter extratos limpos, minimizando o efeito da interferência de matriz (MATEO et al., 2002; KRŠKA, 1998; NURYONO et al., 2005).

A CIA contém anticorpo anti-micotoxina imobilizado em suporte como sílica ou Affi-gel® em tampão fosfato, empacotado em pequeno cartucho plástico (Figura 3). A micotoxina (antígeno) se liga ao anticorpo, sendo a impureza removida com água ou tampão. A micotoxina é eluída com pequena quantidade de solvente (metanol, metanol:água) e analisada por métodos como CLAE, CLAE acoplada a espectrômetro de massa ou espectrofluorimetria.

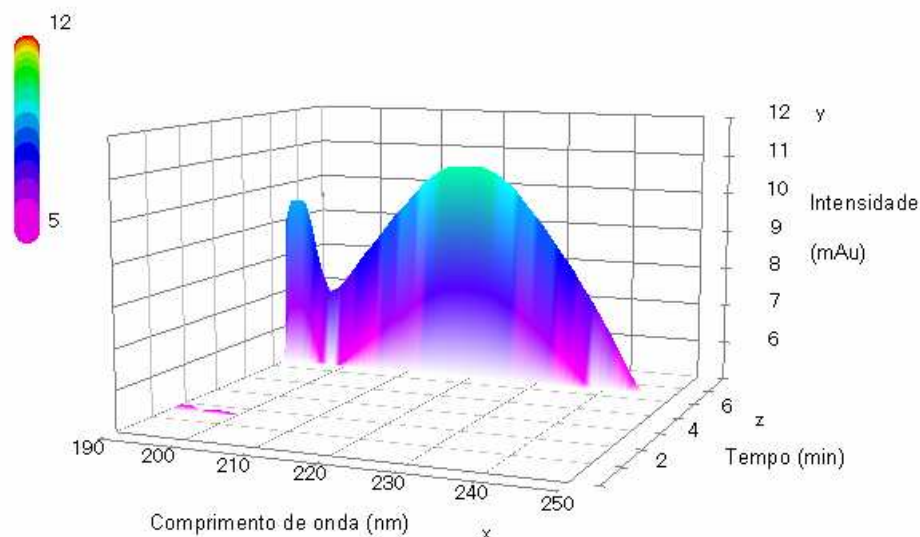
Métodos analíticos convencionais para análise de micotoxinas incluem cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG).



**Figura 3:** Procedimento de limpeza de amostra em coluna de imunoafinidade. (Fonte: R-BIOPHARM RHÔNE Ltd., USA).

CCD para DON geralmente utiliza sílica gel como adsorvente (BETINA, 1985). Para o desenvolvimento de DON, uma mistura de solventes orgânicos, como clorofórmio:acetona:isopropanol, é indicado pela AOAC (KRSKA et al., 2007). Como DON não é fluorescente, para visualização da cromatoplaça é borrifado, por exemplo, cloreto de alumínio.

A determinação de tricotecenos por CLAE emprega detector de ultravioleta (UV) e arranjo de fotodiodo (KRSKA et al., 2007). A Figura 4 apresenta cromatograma em 3 dimensões, sendo apresentado no eixo z o tempo (em minutos), no eixo y a intensidade de absorção (em mAu) e o eixo x o comprimento de onda (em nm). Na maioria dos métodos, a separação ocorre em colunas C-18 de fase reversa, com misturas metanol e água ou acetonitrila como fase móvel.



**Figura 4:** Cromatograma tridimensional de desoxinivalenol (amostra de trigo= 1500 µg/kg) obtido por cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de fotodiodo (*photodiode array* – PDA). Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel: metanol 30 %, fluxo de 0,7 mL/min, detector de arranjo de fotodiodo ( $\lambda = 220$  nm).



Entre os métodos atualmente disponíveis para determinação de DON em diversas matrizes, CLAE tem sido o método preferido. CLAE proporciona uma maior sensibilidade que CCD e requer procedimentos de purificação mais simples que os necessários para CG (MATEO et al., 2002; KRŠKA, 1998; NURYONO et al., 2005).

A metodologia mais recente tem utilizado CLAE acoplada com espectrometria de massa (CAVALIERE et al., 2005), apresentando a vantagem de acoplar o caráter confirmatório. Para análise de DON, a fonte de ionização pode ser APCI (*atmospheric pressure ionization*) ou ESI (*electrospray ionization*), nos modos negativo e positivo (ROSENBERG et al., 1998; ZÖLLNER et al., 1999; ZÖLLNER; MAYER-HELM, 2006).

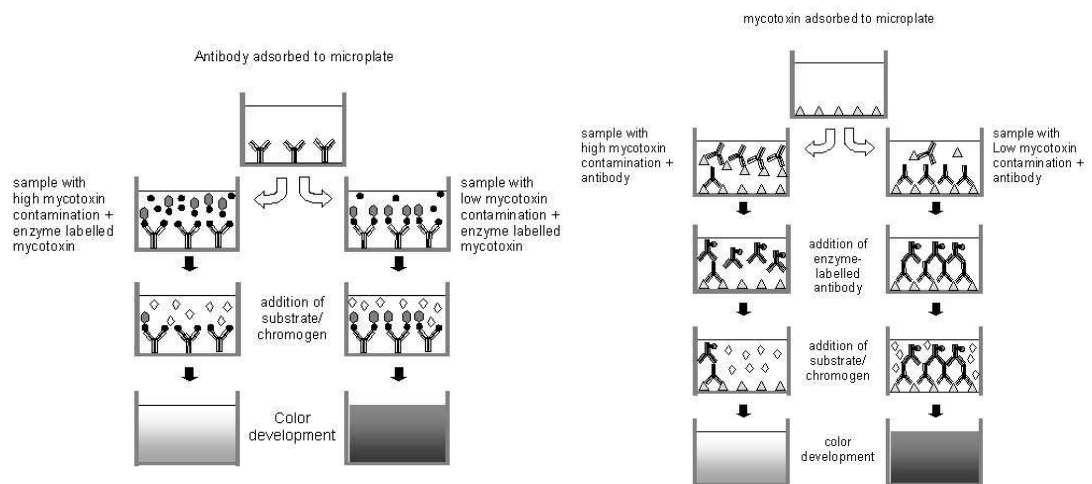
A competitividade na indústria de alimentos e rações envolve grande redução de custo, com menor mão-de-obra e resultados imediatos. Métodos rápidos têm conquistado cada vez mais importância, devido ao menor custo, facilidade no uso e possibilidade de análise *in loco*. Normalmente, a expressão “método rápido” refere-se a um método muito mais rápido do que o método referência, e tem o objetivo de promovê-lo (ZHENG et al., 2006). A maioria destes métodos fornecem resultados qualitativos ou semi-quantitativos em minutos, sendo recomendados para triagem.

As técnicas de imunoenensaio são procedimentos analíticos baseados na ligação não covalente entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ac) e, desenvolvidos para detectar o Ag ou Ac (ONO et al., 2004). A produção de Ac anti-micotoxina envolve anticorpo monoclonal (AcM) empregando hibridoma. Devido a característica de hapteno de micotoxinas, ocorre a necessidade de obtenção de conjugado toxina-proteína de alta pureza, em escala de rotina. Os hibridomas são células especiais, produzidas pela fusão de linfócitos B e células tumorais (mieloma), tendo a capacidade de proliferar, produzindo AcM específico para a confecção de métodos imunológicos com alta afinidade e especificidade de ligação, homogeneidade e em quantidades ilimitadas.

Os métodos de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para micotoxinas estão disponíveis comercialmente há décadas, sendo a tecnologia baseada na capacidade de um Ac específico distinguir estrutura tridimensional de uma micotoxina específica.

ELISA competitivo direto baseia-se na sensibilização da microplaca com Ac (Figura 5). Após extração, amostra e conjugado enzima-micotoxina são adicionados. Qualquer micotoxina (amostra ou padrão) competirá com o conjugado enzima-micotoxina pelos sítios de ligação do Ac. Após a etapa de lavagem, o substrato cromógeno é adicionado para desenvolver a coloração (intensidade da cor inversamente proporcional à concentração de micotoxina). A solução de bloqueio é adicionada, interrompendo a reação enzimática e a absorvância determinada em leitora de microplacas.

ELISA competitivo indireto baseia-se na sensibilização da microplaca com antígeno. Após extração, micotoxina (amostra ou padrão), seguida de Ac anti-micotoxina (Figura 5) são adicionadas. Após lavagem, adiciona-se o Ac marcado com enzima, procede-se nova lavagem, seguida de adição de substrato cromógeno para desenvolver a coloração. A solução de bloqueio é adicionada e a absorvância determinada, sendo esta inversamente proporcional à concentração de micotoxina.



**Figura 5:** Esquema de ELISA competitivo direto (esquerda) e ELISA competitivo indireto (direita). Fonte: Ono et al (2006).

Os kits de ELISA apresentam vantagens de requerer pequeno volume de amostra e etapa de extração e limpeza menos laboriosa do que métodos como CCD e CLAE. São rápidos, simples, específicos, sensíveis e portáteis, podendo ser usados no campo para detecção de micotoxinas em alimentos e rações. Este método pode ser qualitativo ou quantitativo.

Outros imunoenaios são baseados em membranas, como sondas *dipstick*, *flow-through assay* e o *lateral flow test* (SCHNEIDER et al., 2004). Nestes testes, Ac específicos são imobilizados em uma membrana, criando uma zona de reação para todas as etapas subsequentes. Ao final, ocorre desenvolvimento de uma cor específica na membrana, dependente da presença/ausência de micotoxina e visualmente avaliada contra um controle negativo, que fornece o máximo de intensidade de cor.

O *flow-through assay* é baseado no mesmo princípio do ELISA competitivo direto. Ac anti-micotoxina recobre a superfície de uma membrana. A micotoxina extraída é adicionada à membrana, seguida pela adição do conjugado enzima-micotoxina. A micotoxina e o conjugado enzima-micotoxina competem pelos sítios de ligação do anticorpo. Após lavagem, o substrato cromógeno é adicionado e reage com o conjugado enzima-micotoxina, desenvolvendo a cor. Para amostra negativa

(nível de micotoxina menor que o limite de detecção do método) haverá desenvolvimento de um ponto colorido visível no centro da membrana. Para amostra positiva, não haverá desenvolvimento de cor. A concentração de micotoxina das amostras positivas pode ser confirmada por um método quantitativo, como CLAE.

O *lateral flow test* se assemelha a um teste de gravidez, baseado na detecção imunológica de gonadotropina coriônica humana. Este ensaio utiliza Ac marcados (partículas de látex – azul; ou ouro coloidais – vermelho), onde amostra líquida é colocada em contato com a membrana teste do dispositivo. Através de capilaridade, o líquido contendo o analito migra através da membrana, redissolvendo em certa área os Ac específicos (marcados) na membrana. Enquanto o líquido contendo as partículas solubilizadas migra pela membrana, antígeno e anticorpo continuam reagindo. No campo indicador da membrana, o resultado desta reação é visualizado. A formação de cor indica a presença do Ag (resultado positivo), enquanto ausência de coloração indica ausência de Ag (resultado negativo) (SCHNEIDER et al., 2004).

No imunoensaio de polarização de fluorescência, a micotoxina é marcada com fluoróforo. Micotoxina livre e marcada competem por um sítio específico do Ac. Na ausência de micotoxina livre, a marcada se liga ao Ac. O aumento da massa molecular do complexo afeta a rotação da molécula alvo, mudando a orientação da fluorescência. A quantidade de alvo ligado pode ser medida (polarização), sendo inversamente proporcional à quantidade de micotoxina livre presente na amostra. Diferindo de ELISA, a separação de micotoxina livre e ligada ao Ac não é necessária. A medida da polarização pode ser feita utilizando um equipamento portátil (SCHNEIDER et al., 2004).

*Surface plasmon resonance* mede a mudança na concentração de massa na superfície de um sensor devido à ligação de moléculas. Em um comprimento de onda e ângulo de incidência específicos, luz será absorvida por elétrons livres em fino filme de metal da superfície de um sensor, diminuindo a intensidade da luz refletida. O ângulo em que o fenômeno ocorre muda proporcionalmente à mudança de concentração de massa na superfície do sensor. As mudanças na concentração de massa medida pelo biossensor são aquelas devido à ligação e dissociação de moléculas interativas, entre o antígeno imobilizado (micotoxina) e o anticorpo específico adicionado à amostra (GAAG et al., 2003).

Uma outra abordagem é a análise dos genes de toxicidade por PCR (*polymerase chain reaction*). Li et al. (2005) desenvolveram um PCR para detecção de *F. graminearum* produtor de DON e nivalenol. O método é baseado nos genes *Tri5-Tri6*, envolvidos no metabolismo de micotoxinas por *Fusarium* spp., e foi capaz de detectar um fragmento de 300 pares de base. Os autores afirmam que este ensaio pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para evitar ou reduzir a contaminação de micotoxinas em cereais.

Além de métodos cromatográficos e imunológicos, métodos espectroscópicos têm sido desenvolvidos para análise de micotoxinas em alimentos. Metodologia utilizada rotineiramente em elevadores e moinhos para determinação de proteína e umidade em cereais tem sido recentemente

testada para avaliar a presença de micotoxinas nestes grãos. Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NEAR Infravermelho) foi avaliada por Petterson e Aberg (2003) para análise de DON em trigo. Os autores observaram que o melhor modelo de regressão foi obtido com comprimentos de onda entre 670 e 1100 nm e slope de 0,949. O coeficiente de correlação alcançado foi de 0,984 e o erro padrão de 381 µg/kg de DON. As melhorias no modelo podem ser alcançadas eliminando ou minimizando os componentes que não estão diretamente relacionados com a concentração de DON.

Outro método espectroscópico aplicado na análise de micotoxinas é a espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (*Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection* – FT-IR/ATR). Kos et al. (2002) utilizaram esta técnica para detectar *Fusarium graminearum* como indicador da presença de DON. Uma triagem rápida do fungo pode aumentar a velocidade do resultado da análise. Neste trabalho, o fungo foi determinado em milho pressionando a amostra moída contra um diamante ATR-cristal com 3 refletores internos e gravando o espectro de absorção na região média do infravermelho. A análise de referência foi realizada com ergosterol (CLAE – Arranjo de fotodiodo) e DON (CG – detector de captura de elétrons). A porcentagem de amostras corretamente correlacionadas por análise de componente principal (PCA) para ergosterol variou de 50 a 90%, enquanto para DON variou de 65 a 100%. A espectroscopia no infravermelho fornece resultados rápidos e confiáveis.

Além de avanços metodológicos, também tem sido reunidos esforços para desenvolver métodos de amostragem não destrutivos e que possibilitem a análise de lotes prontos para expedição. A tecnologia chamada *Discovery* pelos seus proponentes (STROKA et al., 2004) é baseada no princípio de que a superfície do material das mercadorias testadas é coletada em um filtro e levada até um analisador químico ou espectroscópico. Esta metodologia tem sido aplicada a diversas matrizes e micotoxinas, com ênfase às combinações micotoxina-matriz que são de maior relevância na legislação atual ou futura. Os testes foram desenvolvidos com certa facilidade, demonstrando ser possível analisar grandes quantidades de material em diferentes pontos de operação, como em portos.

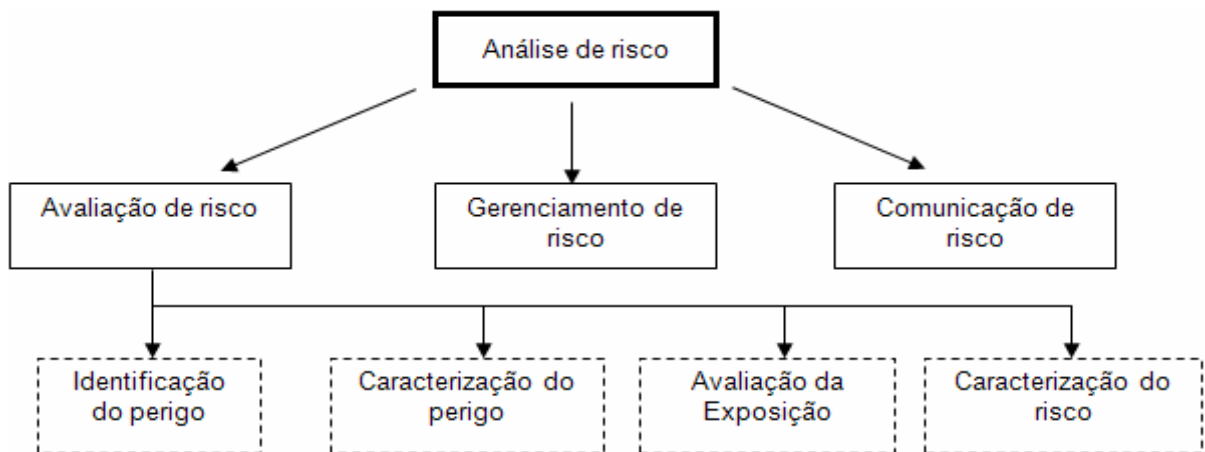
O bioensaio colorimétrico de proliferação celular MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazolium) tem sido utilizado para avaliação preliminar da presença de micotoxinas em cereais (CETIN; BULLERMAN, 2005). O cultivo *in vitro* de células pode ser utilizado em substituição aos estudos toxicológicos de micotoxinas citotóxicas que utilizam animais para os testes. Este teste determina a habilidade de células viáveis (através enzimas mitocondriais desidrogenases) converterem este sal tetrazólico (MTT) amarelo em cristais azul de formazan insolúveis. O ensaio MTT é um ensaio colorimétrico rápido, versátil, quantitativo e altamente reprodutível, utilizado para avaliar a viabilidade celular e atividade metabólica, sendo de boa utilidade como *screening* de micotoxinas em grande escala.

### **Exposição estimada a micotoxinas**

Nos últimos anos, ênfase tem sido atribuída à avaliação da exposição estimada a micotoxinas, como complemento às análises de contaminação em alimentos. A exposição estimada a contaminantes faz parte de uma abordagem maior, a Análise de Risco. Segundo a Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999), a Análise de Risco (Figura 6) é um processo que consta de três componentes: avaliação de risco, gerenciamento de risco e comunicação de risco. A Análise de Risco é utilizada para identificar e controlar o risco de uma população exposta a um dano causado por um organismo, sistema ou substância. É imperativo manter o interesse no bem estar do consumidor como consideração fundamental, sempre que qualquer análise de risco for executada. A redução do dano que pode estar associado ao alimento e a redução de risco de efeitos adversos a saúde dos consumidores são de particular importância no desenvolvimento de controle de qualidade (FAO/WHO, 1997).

A Avaliação de Risco (*risk assessment*) é processo fundamentado em conhecimentos científicos, envolvendo fases como: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (NAS, 1983). Perigo (*hazard*) é definido como agente biológico, químico ou físico, ou propriedade de um alimento, capaz de provocar um efeito nocivo à saúde, enquanto o risco (*risk*) é uma função da probabilidade de ocorrência de um efeito adverso à saúde e da gravidade de tal efeito, como consequência de um perigo ou perigos nos alimentos (BRASIL, 1999).

Para a Avaliação de Risco, os resultados da avaliação da exposição (ingestão diária estimada) são comparados a caracterização do perigo (ingestão diária tolerável, ou equivalente) para indicar o grau de preocupação (KUIPER-GOODMAN, 1995).



**Figura 6:** Esquema conceitual da análise de risco da FAO/OMS.

*Identificação do perigo:* identificação dos agentes biológicos, químicos e físicos que podem causar efeitos adversos à saúde e que podem estar presentes em um determinado alimento ou grupo de alimentos.

A identificação do perigo inicia com a identificação da estrutura da molécula em questão e sua atividade nos sistemas biológicos, através de testes *in vitro*, análise em animais de laboratório e estudos epidemiológicos, realizados em humanos, por meio de estudos de caso-controle ou coorte. A

identificação do perigo deve fornecer uma resposta para a questão: “A exposição a este agente químico causa algum efeito adverso a saúde?”.

*Caracterização do perigo:* avaliação qualitativa e/ou quantitativa dos efeitos adversos à saúde associados com agentes biológicos, químicos e físicos que podem estar presentes nos alimentos. Durante esta fase da avaliação de risco, a questão a ser respondida é: “Qual é a relação entre a dose e a incidência de reações adversas em humanos?”.

A caracterização do perigo é feita através do cálculo de dose/resposta. Substâncias não genotóxicas apresentam limiar de dose para efeito adverso (nenhuma resposta biológica evidente abaixo de uma dose específica). Substâncias genotóxicas e/ou carcinogênicas não apresentam limiar para efeito adverso, não existindo dose mínima de exposição para iniciar o efeito adverso (alteração genética) e carcinogênese. Para substâncias com limiar de dose, são calculados NOAEL (*no observed adverse effect level*), i.e., maior dose na qual nenhum efeito adverso foi observado; ou LOAEL (*lower observed adverse effect level*), i.e., menor dose na qual foi observado algum efeito adverso.

Com base em NOAELs, são calculados os valores de Ingestão Diária Aceitável ou Tolerável (HERMAN; YOUNES, 1999). O termo Ingestão Diária Aceitável é utilizado para substâncias que podem ser controladas (aditivos alimentares, drogas veterinárias e pesticidas). Ingestão Diária Tolerável é utilizado para contaminantes naturalmente presentes, em função de sua permissibilidade, em contraste a aceitabilidade, para a ingestão de contaminantes inevitavelmente associados ao consumo de alimentos. Como alguns contaminantes não são rapidamente eliminados do organismo, o termo Ingestão Diária Tolerável Provisória é utilizado. Quando se trata de contaminante cuja propriedade cumulativa não é conhecida, estabelece-se uma Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória.

*Avaliação da exposição:* avaliação qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos e físicos através dos alimentos, assim como as exposições que derivam de outras fontes, caso sejam relevantes (WHO, 1998). A exposição através do consumo de alimentos é obtida através da concentração da substância no alimento e quantidade de alimento consumido por unidade de peso corpóreo. Dessa forma, é possível identificar grupos de risco a exposição de determinado contaminante, como por exemplo, crianças, que ao consumirem alimentos com a presença de algum contaminante, até mesmo dentro dos limites aceitáveis, devido ao seu baixo peso corpóreo estarão mais susceptíveis ao desenvolvimento de danos. Outro grupo importante na análise de risco são os grupos monofágicos, cujas dietas são compostas essencialmente por um único alimento, como milho em diversas tribos africanas. Esta fase deve ser conduzida de forma a responder a questão: “A que níveis de exposição os indivíduos estão sendo expostos, ou podem ser estimados para estes indivíduos, sob diferentes condições?”

*Caracterização do risco:* estimativa qualitativa e/ou quantitativa, incluídas as incertezas inerentes, da probabilidade de ocorrência de um efeito adverso, conhecido ou potencial, e de sua

gravidade para a saúde de uma determinada população, com base na identificação do perigo, sua caracterização e avaliação da exposição.

A caracterização do risco deve fornecer informações sobre a estimativa do risco de uma forma útil e de fácil entendimento por parte dos responsáveis pela tomada de decisões da Saúde Pública. Ao final desta fase, deve ser possível responder a questão: “Qual é a incidência de efeitos adversos a saúde, de uma dada população, sob condições específicas de exposição?”.

A avaliação da exposição a uma substância química em um alimento pode ser feita de diversas maneiras, e o método de escolha dependerá da informação disponível e quão precisa e detalhada a estimativa deve ser (KROES et al., 2002). Nenhum método suprirá a todos os critérios, como custo, precisão, tempo disponível, etc. O método deve ser selecionado caso-a-caso. Para isso, o primeiro passo é definir o objetivo da avaliação. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1992) define três propostas na estimativa quantitativa de exposição a substâncias químicas ambientais:

- i) A exposição pode ser medida no ponto de contato, medindo tanto a concentração como o tempo de contato, integrando os dois parâmetros (avaliação no ponto de contato);
- ii) A exposição pode ser estimada avaliando separadamente a concentração de exposição e o tempo de contato, combinando as informações posteriormente (avaliação do cenário);
- iii) A exposição pode ser estimada a partir da dose, que pode ser reconstruída a partir de indicadores internos (como biomarcadores) após a ocorrência da exposição (reconstrução).

Duplicatas de dieta são avaliações no ponto de contato; suprimento, aquisição e consumo de alimentos em combinação com informação da composição alimentar são avaliações do cenário e uso de biomarcadores é exemplo de estudo de reconstrução.

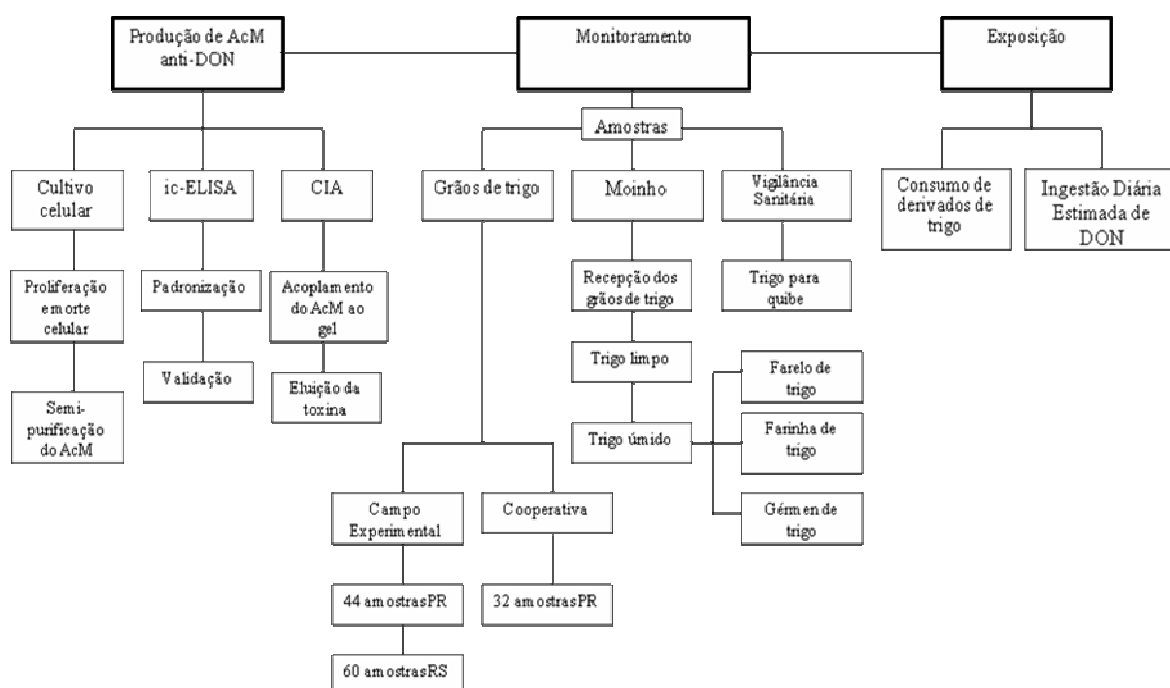
A avaliação de risco é envolvida por incertezas associadas à falta de dados adequados, e o gerenciador de risco deve considerar, além dos possíveis danos causados a saúde, o fato de que a contaminação por micotoxinas pode causar importantes impactos no comércio mundial e no suprimento de alimentos.

### **Considerações Finais**

O trigo e produtos derivados constituem alimentos de amplo consumo no país, portanto, o controle da contaminação por micotoxinas é de suma importância. A segurança irrestrita dos produtos consumidos depende do monitoramento contínuo, empregando métodos de alta sensibilidade e baixo custo, constantemente avaliados e comparados com métodos químicos oficiais, em contínuo avanço. Os métodos imunoquímicos surgiram como alternativa para minimizar o custo de análise, como uso de colunas de imunoafinidade para pré-limpeza de desoxivalenol. A aplicação de métodos imunológicos como biosensores, *microarrays*, imunossensores eletroquímicos, polarização de fluorescência constituem alternativas atraentes no controle de qualidade de alimentos.

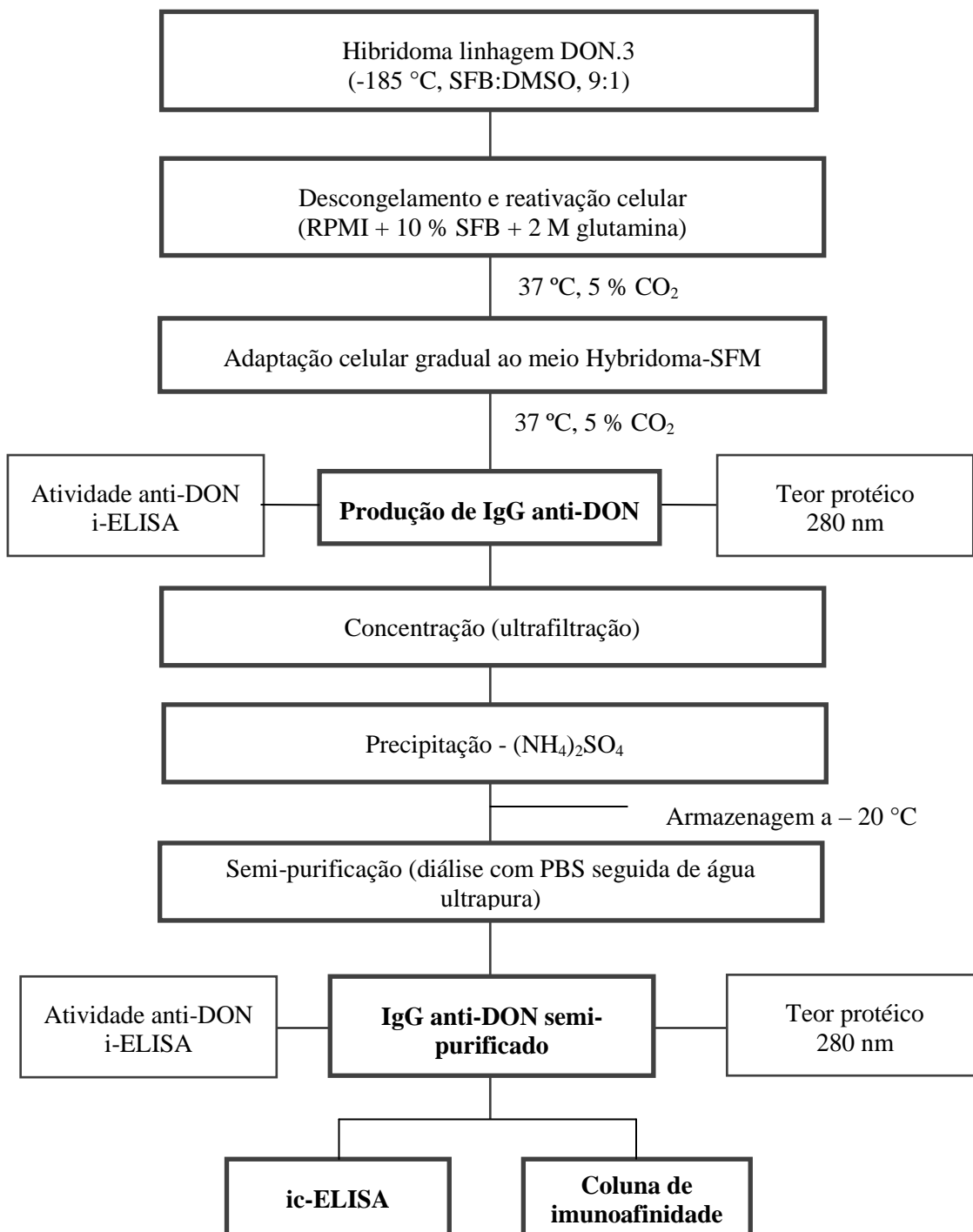
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias utilizadas no transcurso da pesquisa estão apresentadas de forma detalhada nos artigos científicos, apresentados no item Resultados e Discussão, visando posterior publicação. Neste item, serão apresentados fluxogramas dos principais procedimentos executados.

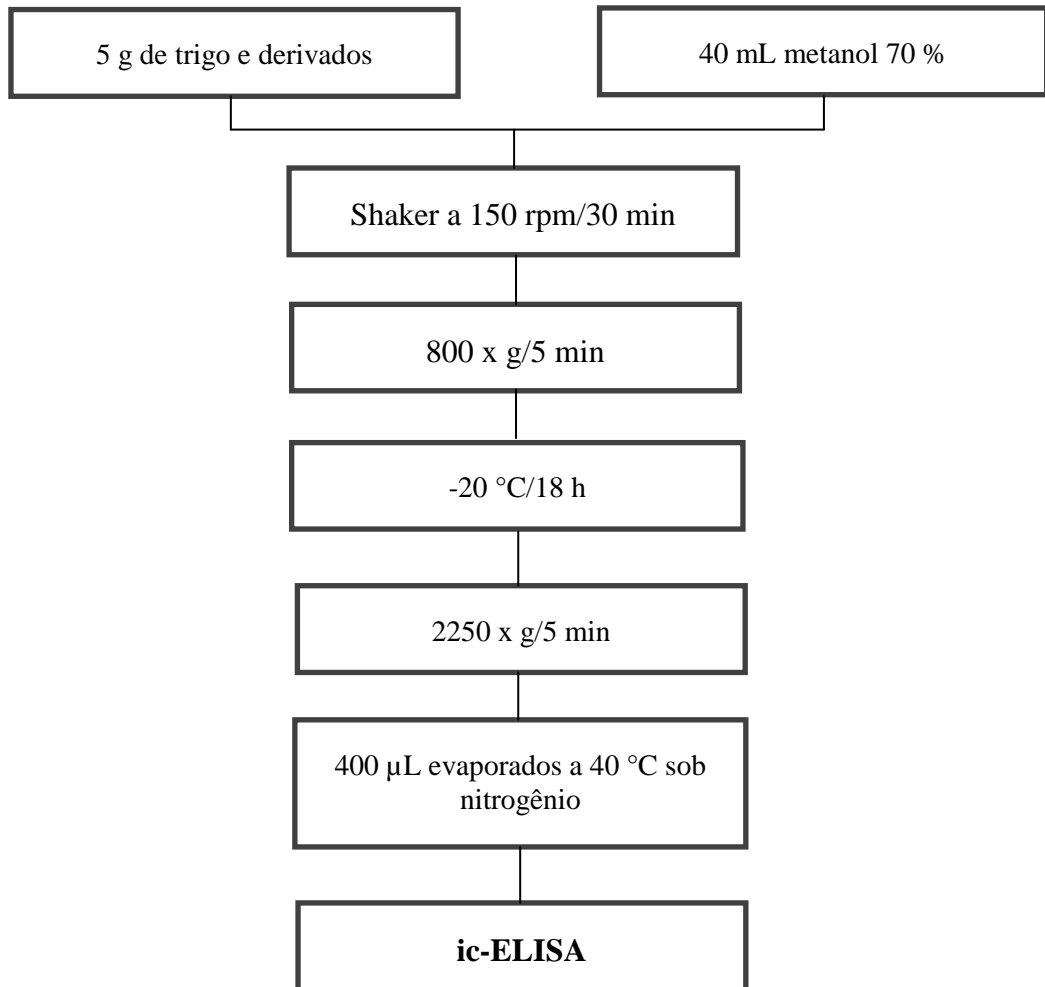


**Figura 1:** Esquema geral do trabalho desenvolvido durante a Tese de Doutorado.

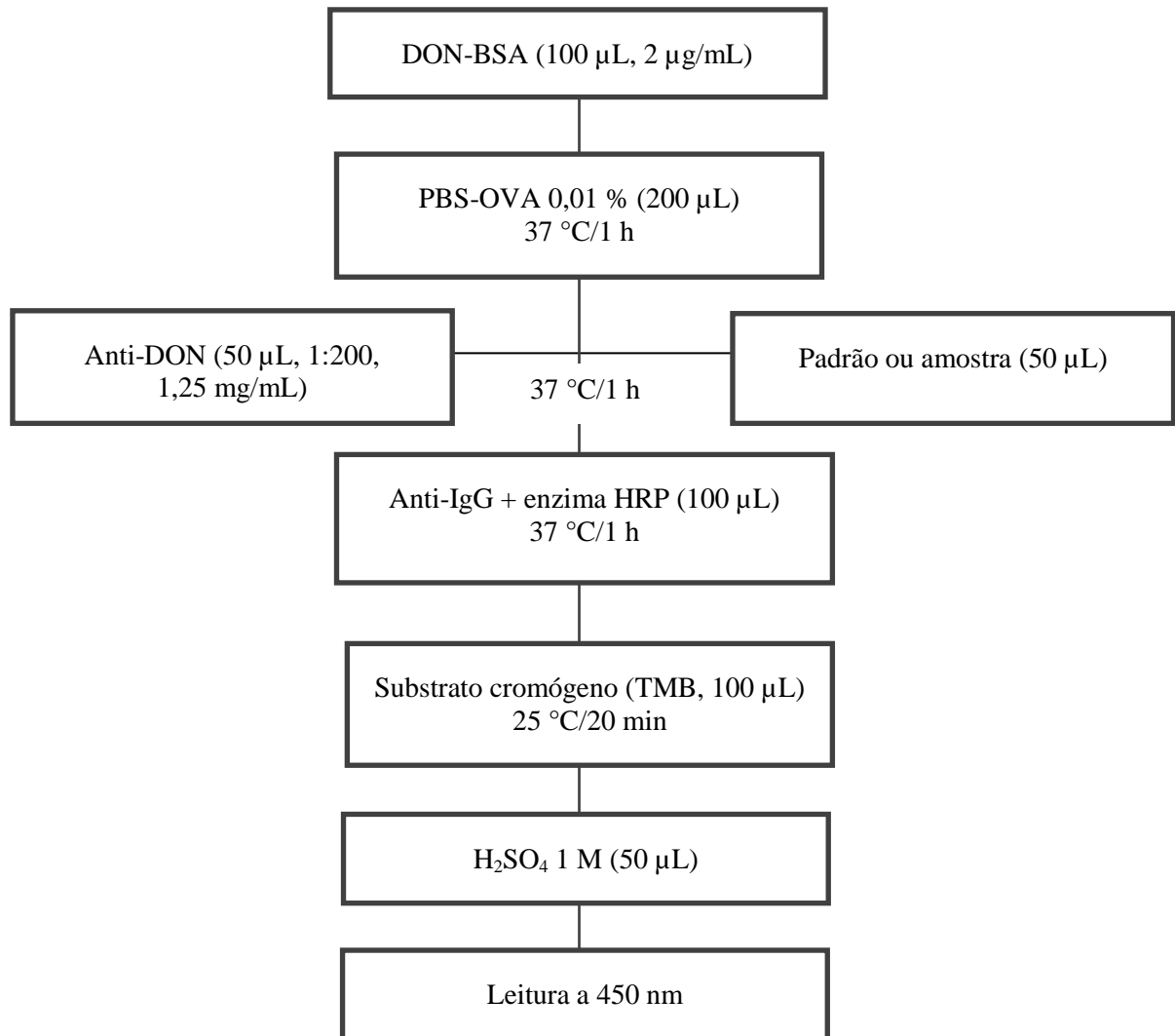




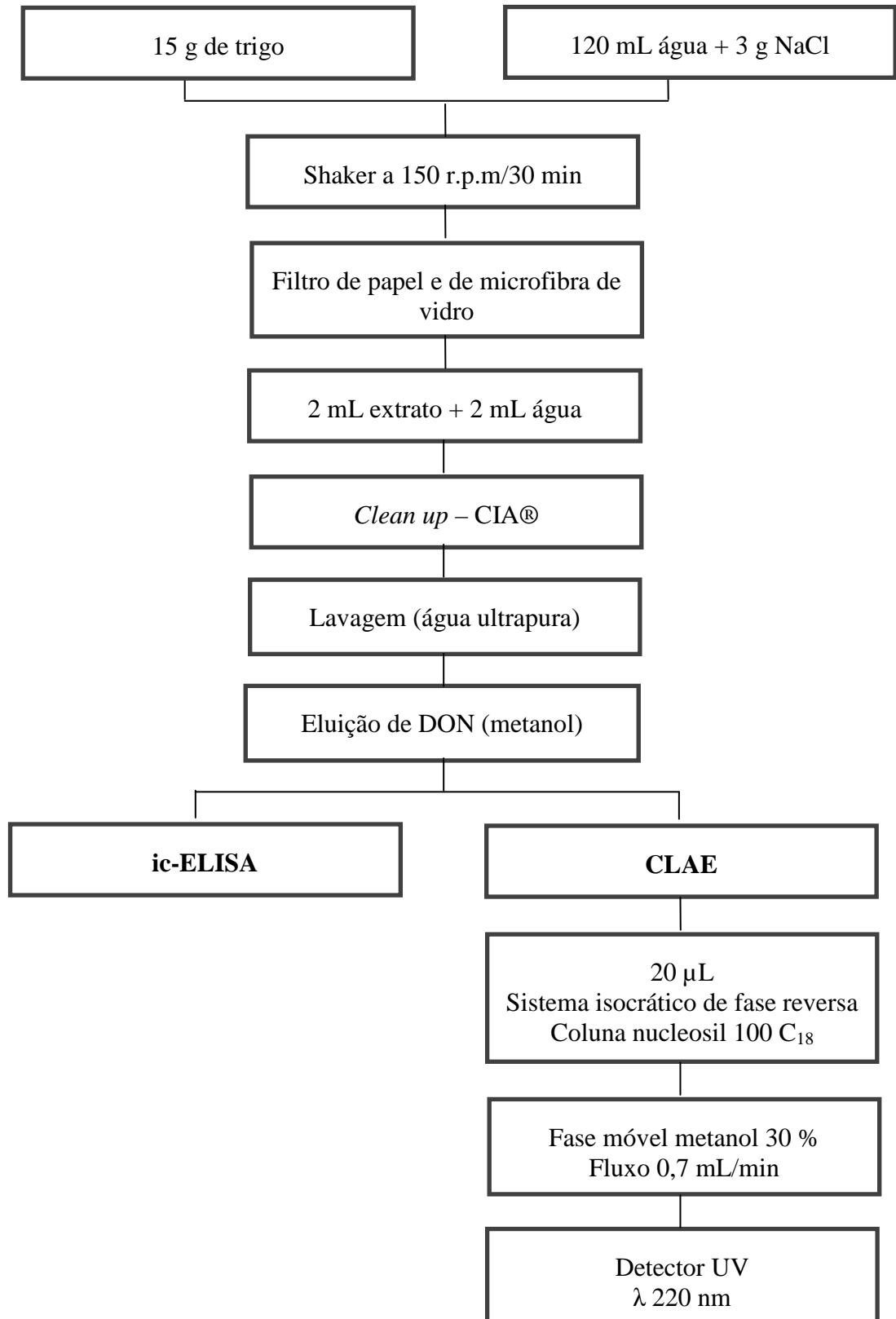
**Figura 2:** Reativação de hibridoma linhagem DON.3 em meio sintético, produção e purificação de anticorpo monoclonal anti-DON (IgG anti-DON).



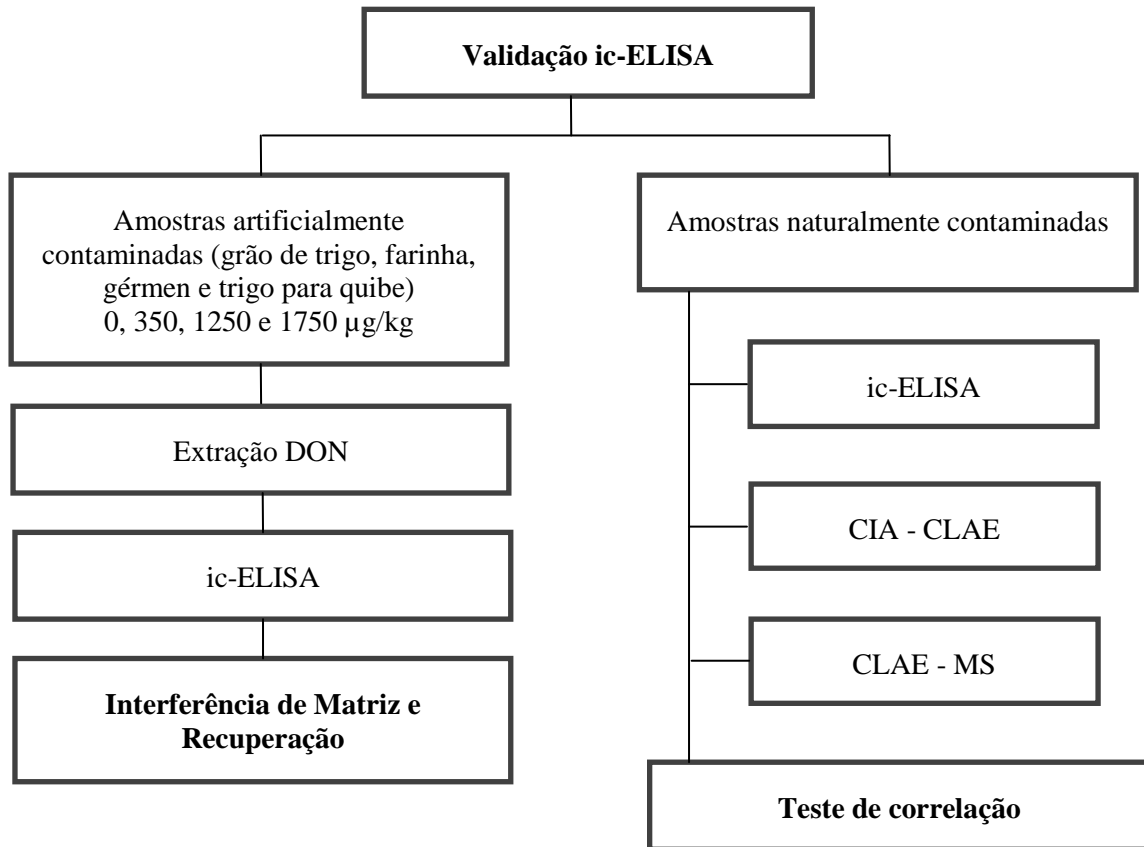
**Figura 3:** Extração de DON para o monitoramento de contaminação natural em amostras de trigo, farinha de trigo, quibe e gérmen de trigo obtidos dos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul.



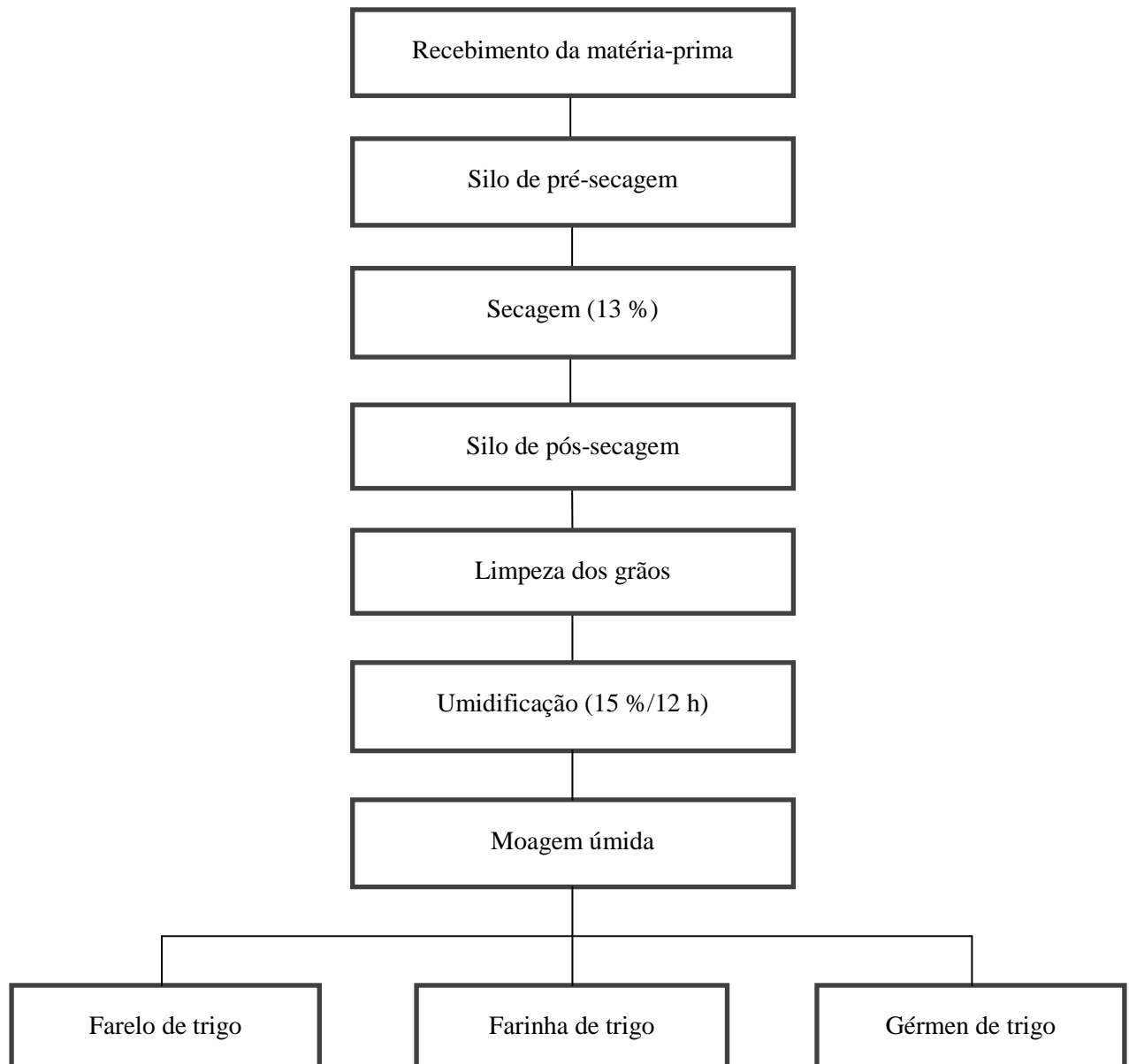
**Figura 4:** ELISA competitivo indireto para quantificação de DON em trigo.



**Figura 5:** Extração de DON através de coluna de imunoafinidade e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência e ic-ELISA.



**Figura 6:** Validação intralaboratorial de ic-ELISA para análise de DON em grão de trigo, farinha, gérmen e trigo para quibe.



**Figura 7:** Processamento de trigo em Moinho.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob forma de capítulos para publicação, listados abaixo:

5.1 Monoclonal antibody-based immunoassay for deoxynivalenol screening in wheat and wheat products

5.2 Avaliação da ingestão de derivados de trigo em Londrina, PR, por meio de Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos

5.3 Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat and wheat products from south Brazil and estimated daily intake by wheat products

5.4 Desoxinivalenol: monitoramento e perigo de exposição por trigo e produtos derivados em Londrina-PR, Brasil

5.5 Testes preliminares para confecção de coluna de imunoafinidade para *clean up* de desoxinivalenol

## 5.1 MONOCLONAL ANTIBODY-BASED IMMUNOASSAY FOR DEOXYNIVALENOL SCREENING IN WHEAT AND WHEAT PRODUCTS

Joice Sifuentes dos SANTOS, Elisabete Yurie Sataque ONO, Eiko Nakagawa ITANO, Carlos Augusto MALLMANN, Osamu KAWAMURA, Elisa Yoko HIROOKA. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Artigo a ser submetido.

### Introduction

Trichothecenes are a structurally related cytotoxic group of secondary metabolites produced mainly by *Fusarium* spp. as field mycotoxin, where such commodities compose the essential human dietary ingredient, as wheat, accounting with 20 % of daily calories. Deoxynivalenol (DON; 2,13-epoxy-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihydroxytrichothec-9-en-8-one) is a type B trichothecene produced by *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum*, and *F. acuminatum* (PITTET, 1998). International Agency for Research on Cancer classified DON in group 3: “not classifiable as to its carcinogenicity to humans” (IARC, 1993). It is also named vomitoxin due to vomiting and digestive disorders effects, decrease in food intake or refusal, with subsequent losses of weight gain mainly in swine, resulting in important economic losses (MILLER, 2008). Besides, trichothecenes are potent protein inhibitors, a basic mechanism of their toxicity. The immune system is extremely sensitive (PESTKA et al., 2004). Exposure to low trichothecene doses induces upregulation of proinflammatory cytokines causing immune stimulation, whereas high doses cause apoptosis in lymphoid tissues resulting in immunosuppression. The maximum level of DON in unprocessed durum wheat is set at 1750 $\mu$ g/kg (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2007). In Brazil, a specific guideline for DON has not been established even for food or feed.

The detection of trichothecenes, initially established using gas chromatography based on electron-capture (KOCH, 2004), advanced to high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet (UV), photodiode array (PDA), fluorescence (FL), or MS detection (KRSKA et al., 2007). Current advance introduced attractive multi-mycotoxin analysis techniques, which allows detection at ng/kg level, with analysis without extensive clean-up step of sample extracts, and minimal use of harmful solvents (KRSKA et al., 2008, LATTANZIO et al., 2009). However, the major problems of those methods are the requirement of highly trained technical staff, costly equipments, which avoids its inclusion in routinely analysis on field or small mills, especially in the food producing countries, sited mainly as developing countries. Thus, it is indispensable the development of fast, reliable and economic methods. In this way, immunoassays such ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), are a valuable tool as screening method for mycotoxin contamination. The ELISA advantages are mainly related with the minimal or not necessary clean up step, besides not



requirement of costly equipment, can be performed with only little experience of the analyst and minimal use of chemicals.

ELISAs for DON have been developed using polyclonal (pAb) and monoclonal antibodies (mAb), prepared against DON-protein conjugates (SINHA et al., 1995, SCHNEIDER et al., 2000, MARAGOS; MCCORMICK, 2000). Various studies screening mycotoxins use ELISAs for the most diverse matrices, like DON in beer (KOSTELANSKA et al., 2009; PAPADOPOULOU-BOURAOUI et al., 2004), T-2 toxin in corn (PRADO et al., 1997), Ochratoxin A in coffee (FUJII et al., 2006), ochratoxin A in wines (FLAJS et al., 2009), fumonisins in corn (ONO et al., 2000; IJIMA et al., 1996), aflatoxin in peanut products (KAWAMURA et al., 1988), aflatoxin M<sub>1</sub> in milk products (PEI et al., 2009).

In the present study, an indirect competitive ELISA (ic-ELISA) based on anti-DON monoclonal antibody was standardized and evaluated in a comparative study with IAC-HPLC and HPLC-MS to reach a reliable analysis.

## **Material and methods**

### *Safety note*

Deoxynivalenol is cytotoxic, and should be handled with extreme care. Mycotoxin-contaminated material should be decontaminated with an aqueous solution of sodium hypochlorite (5 %).

### *Sampling*

During the 2006, 2007 and 2008 crops in the State of Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS), Brazil, wheat samples were taken from Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), units Londrina-PR and Passo Fundo-RS, from field trials carried out to study the yield performance of wheat cultivars in different locations; and from trucks at delivery post of one cooperative (20 producers) located in South-Western Paraná. Thus, 34 samples were analysed by ic-ELISA and IAC-HPLC and 44 samples by ic-ELISA and HPLC-MS. Wheat flour and germ samples were provided by a local mill, while kibbe samples were randomly taken by Health Surveillance Agency (ANVISA) inspectors.

### *Deoxynivalenol standard*

Deoxynivalenol (98 % purity DON) purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) was dissolved in ethyl acetate, and analyzed at 260 nm (extinction coefficient of 1,410; UV-VIS Cintra 20, GMB, Melbourne, Australia). The stock standard solution was dissolved at 1 mg/mL in acetonitrile, and stored at -20 °C. Calibration curve (250, 500, 750, 1000 and 1500 ng/mL) used in

HPLC analysis was prepared in methanol:water (30:70, v/v). Calibration curve (50, 100, 250, 500, 750, and 1000 ng/mL) used in ic-ELISA analysis was prepared in methanol:PBST (1:9, v/v).

#### *Production of anti-DON monoclonal antibody*

Hybridoma cell line DON.3 (KAWAMURA, 2005) was prepared at Kagawa University (Japan). Briefly, the immunogen was prepared reacting 3-acetyl DON (3-ADON) with anhydride hemiglutarate to obtain 3-ADON hemiglutarate (3ADON-HG). Then it was deacetylated, and DON-HG produced was conjugated with bovine serum albumin (BSA) to produce DON-HG-BSA to immunize the mice. The spleen cells of immunized mice were fused with SP2/0-Ag14 myeloma, and DON.3 hybridoma was selected and cloned using HAT medium (0.1 mM hypoxanthine, 0.1 mM aminopterin, and 0.16 mM thymidine). The hybridoma was stored in fetal bovine serum (FBS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) (FBS:DMSO, 9:1, v/v) under liquid N<sub>2</sub>.

Anti-DON monoclonal antibodies (mAb) hybridoma was grown in RPMI 1640 supplemented with 10 % FBS and 2 mM L-glutamine, routinely cultured in a humidified incubator at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>. After a 2-week adaptation time, RPMI was gradually replaced with 25, 50, 75 and 100 % Hybridoma-SFM (serum free medium, H-SFM) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine. Subsequent to cell saturation and death (close to 15 days), cells were removed by centrifugation (2,400 x g, 10 min, 4 °C) and the supernatant was maintained at 4 °C. The mAbs were concentrated by ultrafiltration (Stirred Cell 8400, Millipore, Billerica, United States) and semi-purified from supernatant by ammonium sulfate precipitation (40 % saturation, 243 g/L) and centrifugation (11,000 x g). The precipitates were redissolved in appropriate amounts of 0.1 M PBS pH 7.3, and then dialyzed against PBS followed by ultrapure water (Purelab Elga, Lane End, England). IgG concentrations were determined by absorption at 280 nm, using 1.35 as absorption coefficient (HARLOW; LANE, 1988).

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the purified anti-DON mAbs was performed according to Laemmli (1970). The purified mAb was denatured at 100 °C for 5 min in sample buffer (5 % SDS, 5 % 2-mercaptoethanol, 0.5 M Tris-HCl, 50 % glycerol, and 0.05 % bromophenol blue), and applied onto the 3 % stacking gel and resolved in 12% separating gel. Each lane was loaded with 5.4 µg of proteins. Electrophoresis was carried out at constant voltage of 150 V until bromophenol blue marker reached the bottom of the gel. After, the gel was stained with silver nitrate.

#### *Indirect ELISA (i-ELISA)*

Indirect ELISA was used for the determination of antibody titers and activity. In brief, polystyrene microtitre plate wells (Corning, New York, USA) were coated with 100 µL of DON-HG-BSA (2.0 µg/mL) in 0.2 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 at 4 °C overnight. Plates were washed five times after each step of incubation with PBST (PBS with 0.05 % Tween 20). In order to minimize

nonspecific binding, wells were blocked with 200  $\mu\text{L}$  PBS-ovalbumine 0.1% at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Serial dilutions (100  $\mu\text{L}$ ) of anti-DON mAb in PBST were added, and incubation was carried out at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Then, 100  $\mu\text{L}$  Horse Radish Peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (HRP, 1:2000) were added and incubated at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Then 100  $\mu\text{L}$  substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB; Sigma, St. Louis, USA) were added and incubated at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min. The reaction was stopped by adding 50  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and absorbance read at 450 nm (Expert Plus, Asys, Cambridge, United Kingdom).

#### *Indirect competitive ELISA (ic-ELISA)*

DON analysis was carried out according to Kawamura (2005). Briefly, wheat grains (50 g) were ground to 20 mesh in a laboratory mill (A11, Ika, Germany) and 5 g wheat sample were extracted with 40 mL 70 % methanol and shaken at 150 rpm for 30 min. The mixture was centrifuged at 800 x g for 5 min, the supernatant kept at - 20  $^{\circ}\text{C}$ /overnight and centrifuged at 2250 x g for 5 min. Two aliquots (400  $\mu\text{L}$ ) were evaporated to dryness under nitrogen stream at 40  $^{\circ}\text{C}$  and maintained at - 20  $^{\circ}\text{C}$  until analysis.

DON levels were determined by ic-ELISA using anti-DON antibody (1.2 mg/mL). Polystyrene microtitre plate wells were coated and blocked following i-ELISA procedure. After washing, 50  $\mu\text{L}$  DON standard or wheat extracts (8 and 80-fold dilution) and 50  $\mu\text{L}$  anti-DON mAb (200-fold dilution) in PBST were added, and incubation was carried out at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. After washing five times with PBST, 100  $\mu\text{L}$  IgG-HRP (1:2000) were added, incubated at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h, and washed. Then 100  $\mu\text{L}$  substrate solution (TMB, Sigma) were added and incubated at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min. The reaction was stopped by adding 50  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and absorbance read at 450 nm. Average absorbance was calculated from individual absorbance obtained from duplicate wells and results were expressed as percentage of binding:  $\text{Binding (\%)} = A^+/A^- \times 100$ , where  $A^+$  is the mean absorbance in the presence of DON standard or wheat extract sample and  $A^-$  is the mean absorbance in their absence. The detection limit of DON (22.2 ng/mL, corresponding to 177.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) was calculated as 3-fold the standard deviation of absorbance from three replicate wells of zero standard (0 ng DON/well).

#### *DON recovery*

Wheat samples (grain, flour, germ and kibbe) with non-detectable DON levels by HPLC (< 87.75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), were spiked with DON (350, 1250 and 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) dissolved in acetonitrile. The samples were extracted after standing at 25  $^{\circ}\text{C}$  overnight, to allow solvent evaporation prior to the extraction. DON quantification and recovery tests were carried out by ic-ELISA.

#### *DON analysis by IAC-HPLC*

DON extraction was carried out as follows. Fifteen grams of wheat sample, finely ground to 20 mesh, were extracted with 120 mL ultrapure water and 3 g NaCl, by shaking at 150 rpm for 30 min.

The mixture extract was filtered through paper filter followed by a glass microfiber filter (GF/C pore size 1.2  $\mu\text{m}$ , 2.5 cm, Whatman, Maistone, England). Two milliliters (equivalent to 0.25 g sample) of extract was passed through the DON immunoaffinity column Dontest® (Vicom, Watertown, USA) with 2 mL ultrapure water, followed by 17 mL ultrapure water. DON was eluted with 2 mL methanol (J. T. Baker, Xalostoc, Mexico), collected and evaporated to dryness under nitrogen stream at 40 °C. The dried residue was dissolved in 300  $\mu\text{L}$  of methanol:water (30:70, v/v) and filtered through a Millex HV filter (0.45  $\mu\text{m}$ ).

DON (20  $\mu\text{L}$ ) was analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (LC-10AD pump, Shimadzu, Japan) using a Nucleosil 100 C18 column (250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Merck, Germany). UV detection (SPD-10A UV/VIS detector, Shimadzu, Japan) was performed at 220 nm. The mobile phase consisted of methanol:water (30:70, v/v) at 0.7 mL/min flow rate, The detection limit for DON (DL= 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) was calculated as 3-fold standard deviation (SD) of the blank sample obtained from seven repetitions (SOARES, 2006). The quantification limit (QL= 87.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) was calculated as 10-fold SD of the blank sample. Values below QL were assigned as zero in statistical analysis. Calibration curve used for quantitative determination was constructed using five points; the linearity of the method was obtained by the correlation coefficient 0.999. Recovery study was performed in wheat sample spiked with DON levels of 250, 500, 750 e 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Average recovery was 75.4 %, the results for the samples were not corrected for the recovery.

#### *DON analysis by HPLC-MS*

Twenty-five grams of ground sample were extracted with 100 mL acetonitrile:water (84:16, v/v) for 3 min in a high speed blender. The extract was filtered through Whatman paper filter n. 4 and 20-fold diluted in water:methanol:acetonitrile (85:6:9, v/v/v).

LC separation and MS analysis were performed by an Agilent H 1100 LC/MSD system (Agilent Technologies, Palo Alto, United States). A 5  $\mu\text{L}$  volume of the diluted sample was loaded onto a Eclipse XDB-C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm) at 40 °C. The isocratic mobile phase consisted of 5 mM ammonium acetate:water:methanol (80:11:9, v/v/v) with a flow rate of 0.7 mL/min and a run time of 7.5 min. The MS analysis was performed using an electrospray ionization (ESI) interface ( $\text{M}+\text{H}^+=297$ ), capillary temperature, 350 °C, sheath gas flow rate, 12 L/min. The detection limit for DON was 40  $\mu\text{g}/\text{L}$ , the quantification limit was 140  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The average recovery was 84.1 %.

#### *Measurement uncertainty*

Measurement uncertainty is the variability associated to analytical results. For any analytical method, each result is reported as the best estimate for the sample and it is always qualified by a measurement uncertainty, e.g.  $x \mu\text{g}/\text{kg} \pm y \mu\text{g}/\text{kg}$  (SCUDAMORE et al., 2008). For this survey, the measurement uncertainty was calculated following the formula  $U_f = \sqrt{(\text{DL}/2)^2 + (a \times C)^2}$ , where  $U_f$  is the maximum standard uncertainty ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); DL is the detection limit of the method ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );  $a$  is a

constant, numeric factor to be used depending on the value of C; C is the concentration of interest ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), according Commission of the European Communities (2006). In the present work, 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  was selected as the concentration of interest, thus, the uncertainty associated to developed ic-ELISA is 227.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Therefore, the analytical result could be reported as mean  $\pm$  227.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

#### *Correlation analysis of ELISA versus IAC-HPLC and HPLC-MS*

DON concentrations detected by ic-ELISA were compared to both HPLC analysis using Pearson correlation test (Statistica 6.0, Tulsa, USA). The extracts obtained from IAC were evaporated to dryness, resuspended in methanol:PBST (1:9, v/v) and applied to ELISA microplates. The extraction carried out for HPLC-MS vs ic-ELISA was conducted independently.

### **Results and Discussion**

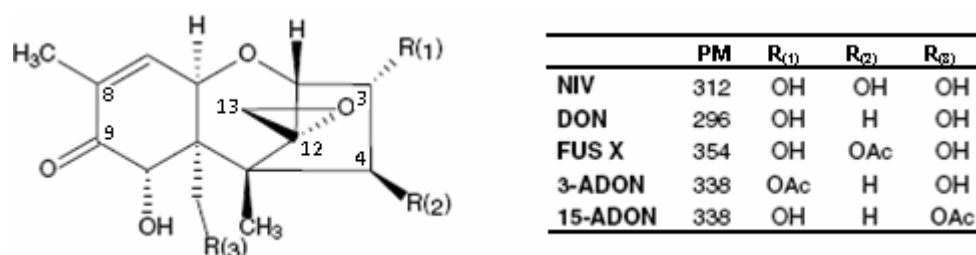
In the present work, anti-DON mAb was produced by *in vitro* cultured hybridoma DON.3 and used to develop an ic-ELISA for DON detection in naturally contaminated wheat samples. Monoclonal antibodies are produced by a single clone of B cells, with special features: antigen-specificity and uniformity, which renders them extremely valuable tool in the development of mycotoxin determination methods in food, feed and human or animal serum, urine, blood, etc

Myeloma and hybridoma cell lines can grow in a broad range of standard tissue culture medium. For routine use, RPMI medium (or other commonly used) is supplemented with fetal bovinum serum (FBS) to a final concentration of 10 %. FBS is normally used because it contains very low concentration of IgG molecules that may interfere in some assays or purifications. Other growth supplements are not required, except when the cells are grown at very low densities ( $10^3$  cell/mL). The ability of hybridomas to grow readily in standard tissue culture medium suggests that these cells have fairly simple growth requirements. The use of serum-free medium has some advantages over serum-containing solutions, like more defined, controlled cell culture environment and avoids animal welfare issues.

Antibodies produced against a hapten-carrier antigen result in antibodies specific for the hapten. The cross-reactivity of anti-DON mAb used in this study was previously evaluated (KAWAMURA, 2005) and the data is shown in Table 1. This cell line exhibit minor cross reactivity with other trichothecenes, except for 15-ADON (333 %). Nevertheless, 15-ADON is more common in North America (OPINION ON FUSARIUM TOXINS, 1999) and the acetylated derivatives are less toxic than DON, thus, this cross reactivity is not a problem to screen DON in samples from South America (Brazil).

Figure 1 shows the structure of DON and related compounds. It is apparent that there are several reactive sites at which to form linkages to carrier proteins. In particular, hybridoma DON.3 was produced using immunogen linkage with R<sub>1</sub>, through 3-ADON. The probable recognition site by

antibody is between C<sub>8,9</sub>. Based on this site of antigen-antibody ligation, there is the cross reactivity with 15-ADON.



**Figure 1:** Structure of DON and related trichothecenes.

**Table 1:** Cross reactivity of anti-DON monoclonal antibody.

Trichothecenes	Cross reactivity (%)*	Trichothecenes	Cross reactivity (%)*
Deoxynivalenol (DON)	100	Tetraacetyl NIV	<0.5
15-acetyl DON	333	Toxin T-2 tetraol	1.2
3-acetyl DON	<0.5	Toxin T-2	<0.5
Nivalenol (NIV)	5	Toxin T-2 acetyl	<0.5
4-acetyl NIV	1.2	Diacetoxyscirpenol	<0.5
3,4-diacetyl NIV	<0.5	Neosolaniol	<0.5

\* Percent of cross reactivity relative DON were calculated as amount of DON required for 50 % inhibition of binding/amount of trichothecenes mycotoxins required of 50 % inhibition of binding x 100. Kawamura, 2005.

The potential of acetylated DONs (ADONs) to contribute for the overestimation of results generated by DON-ELISA tests was discussed by Niessen (1993). Due to the relatively low levels of ADONs commonly occurring in unprocessed cereals, their contribution to DON concentration overestimation is in most cases insignificant (ZACHARIASOVA et al., 2008).

Total volume of culture medium containing anti-DON antibodies produced was 2,320 mL. A resume of protein content is shown in Table 2. The protein recovery after ultrafiltration was estimated at 26 %. Semi-purification was carried out with ammonium sulfate [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], that is one of the most commonly used methods for removing proteins from solution. They form hydrogen bonds with water through their exposed polar and ionic groups. When high concentrations of small, highly charged ions such as ammonium or sulfate are added, these groups compete with the proteins for binding to water, removing the water molecules from the protein and decreasing its solubility, resulting in precipitation. The use of H-SFM is related to facilitate purification of specific mAb, it has an optimized serum-free basal formulation supplemented with trace elements, minerals, and a low amount (20 µg/mL) of defined protein (insulin and transferrin). The use of FCS supplementation (75 % H-SFM) exhibited higher protein concentration (Table 2) and no difference in mAb activity (Figure

2). Bruce et al. (2002) mentioned that small level of FCS supplementation may dramatically improve the level of mAb production for the hybridomas investigated in their work.

**Table 2:** Anti-DON monoclonal antibody protein concentration according Hybridoma-Serum Free Medium (H-SFM) composition from supernatant, after ultrafiltration and after dialysis.

H-SFM content	Supernatant <sup>1</sup>		After ultrafiltration		After precipitation <sup>2</sup> and dialysis <sup>3</sup>	
	V (mL)	Protein (mg)	V (mL)	Protein (mg)	V (mL)	Protein (mg)
0*	150	34.0	40	10.0	15	11.4
25%	230	ND	40	18.6	FP	ND
50%	400	122.4	50	25.5	FP	ND
75%	640	224.6	50	44.8	5.5	22.6
100%	900	410.4	120	121.4	35	37.3
<i>Total</i>	<i>2320</i>	<i>791.5</i>	<i>300</i>	<i>220.4</i>	<i>55.5</i>	<i>ND</i>

H-SFM= Hybridoma Serum Free Medium

V= volume (mL)

ND= not determined

FP= Frozen precipitated, mAb expecting to be dialyzed at the moment of use.

<sup>1</sup> Cell culture medium after cell elimination by centrifugation

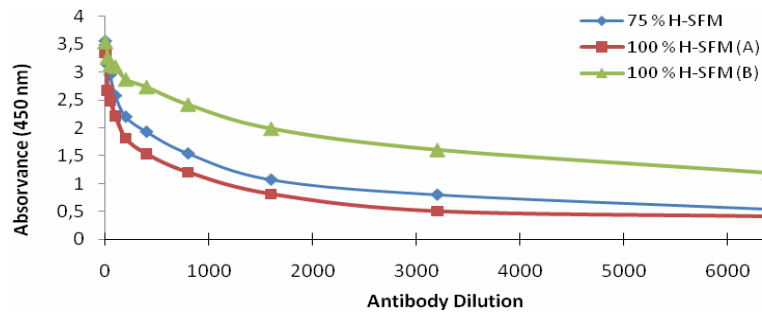
<sup>2</sup> Precipitation with ammonium sulfate

<sup>3</sup> Antibody solution used for i-ELISA and ic-ELISA

\* 90 % RPMI + 10 % FBS

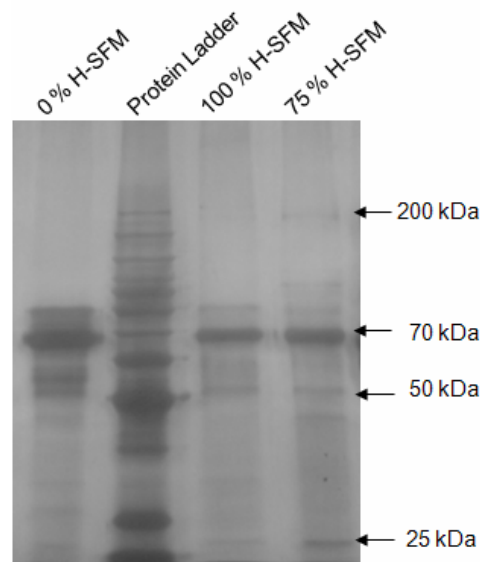
Figure 2 shows antibody titer determination (i-ELISA) according to the culture medium composition. Antibodies used to determine titer were produced from the same batch. The differences are concern H-SFM content and time at 4 °C. mAb from 75 % H-SFM and 100 % H-SFM (A) were stored at 4 °C for 3 months before analysis, while 100 % H-SFM (B) was stored at 4 °C for 3 weeks. The marked difference among them is the higher titer of recent dialyzed mAb solution, evidencing that –20 °C is the best temperature storage, and also the necessity of buffer supplementation with stabilizing compounds, like glycerol, for convenient work solution storage at 4 °C (HARLOW; LANE, 1988). Antibody solutions should not be frozen and thawed repeatedly, as this can lead to aggregation, that can cause the loss of activity by steric interference of the antigen combining site or by generating insoluble material, that is lost during centrifugation or filtration (HARLOW; LANE, 1988).

In the SDS-PAGE profile, anti-DON mAb structural proteins were detected, with estimated molecular weights ranging from 25 to 200 kDa (Figure 3). IgG molecule is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 150 kDa, consisting of two identical light chains (25 KDa) and two heavy chains (50 KDa), held together as a tetramer by disulfide bonds, that can be reduced by mercaptoethanol, for example.



**Figure 2:** Indirect ELISA titer determination of anti-DON monoclonal antibody produced *in vitro* by Hybridoma DON.3.

DON-HG-BSA, anti-DON and anti-IgGHRP antibodies concentration were optimized by comparing dose-response curves obtained using different combinations of antigen (1, 2 and 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anti-DON dilution (1:100, 1:200, 1:400 and 1:800), and anti-IgGHRP (1:1000, 1:2000 and 1:5000). The optimized coating antigen concentration, anti-DON and anti-IgGHRP were 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1:200 and 1:2000, respectively. Quantitation of DON with purified mAb showed that 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was necessary for an accurate estimation of DON concentration. This result is similar to that obtained by Sinha et al. (1995), who reported a requirement of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of mAb.



**Figure 3:** Anti-DON monoclonal antibody sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), stained with silver nitrate.

For use in the quantitative indirect competitive ELISA, mAb obtained from 100 % H-SFM (B) was chosen. The accuracy and precision of ic-ELISA were determined using DON standards at 0 – 1000 ng/mL range, where the assays were evaluated repeatedly in different sets of wells of the same plate (intra-assay), or different plates in different days (inter-assay). Reproducibility and reliability of



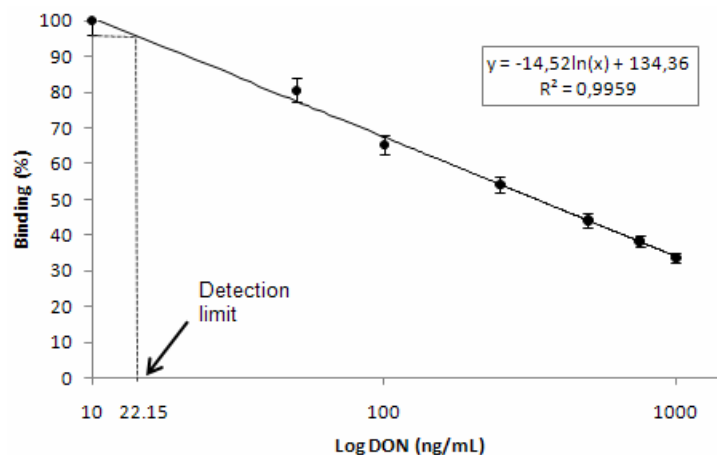
the ELISA were demonstrated by the low relative standard deviations (RSD) of 0.003 – 0.088 % and 6.7 – 11.8 %, respectively. Results are shown in Table 3.

**Table 3:** Intra- and inter-assay variations of ic-ELISA assessed over a range of concentrations of DON standard<sup>a</sup>.

DON standard (ng/mL)	DON found			
	Intraassay (n=3)		Interassay (n=7)	
	Mean ± S.D. (ng/mL)	RSD (%)	Mean ± S.D. (ng/mL)	RSD (%)
50	49.8 ± 0.04	0.088	49.2 ± 4.83	9.8
100	99.4 ± 0.05	0.053	96.7 ± 10.56	10.9
250	249.1 ± 0.03	0.011	270.3 ± 18.04	6.7
500	536.8 ± 0.04	0.007	521.3 ± 44.54	8.5
750	719.3 ± 0.03	0.004	680.7 ± 80.53	11.8
1000	989.9 ± 0.03	0.003	1015.2 ± 79.35	7.8

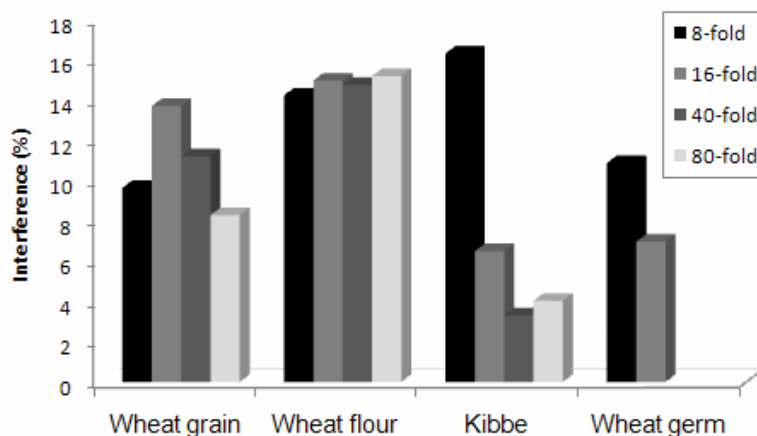
<sup>a</sup> Intra- and inter-assay variations were determined by replicate analysis for each concentration of standards runs in the same plate (n= 3) and by replicate of a set of standards run in different plates on different days (n= 7), respectively. The Relative Standard Deviation (RSD) was calculated as standard deviation/mean x 100.

The ic-ELISA standard curve for DON (0 – 1000 ng/mL) and the linear regression analysis are shown in Figure 4. The detection limit was 22.2 ng/mL, equivalent to 177.1 µg/kg, minimum concentration over 5.9 % inhibition. Schneider et al. (2000) developed the first yolk antibody based immunoassay for DON and found a detection limit (160 µg/kg) similar to the present study.



**Figure 4:** Standard curve of DON detection by ic-ELISA. Circles represent the mean binding from seven standard curves performed on different days over a 1-month period. Bars represent standard deviations. The detection limit was 22.2 ng/mL (117.1 ng/g wheat), which was the minimum concentration over 5.9 % inhibition (mean minus 3-fold SD of 0 ng/mL DON) detected by ic-ELISA.

Wheat grain, wheat flour, kibbe and germ wheat matrices interferences in ic-ELISA were tested using samples with non-detectable DON levels by HPLC-MS (Figure 5). Food matrix interference in immunoassay could be due to non-specific interaction caused by protein, pigments, fat and solvents, or steric hindrance, which would overestimate the real toxin level. Matrix interference in wheat grain and kibbe was overcome by sample dilution. Otherwise, wheat flour did not showed interference difference in the dilutions testes. Wheat germ analysis only was possible with little sample dilution. Maragos and McCormick (2000) extracted wheat samples with a ratio of 10:1 buffer volume to sample mass, and eliminate the dilution step following the sample extraction. Matrix effect could be minimized by sample dilution prior to ELISA analysis (ONO et al., 2000). In our work, a ratio of 8:1 70 % methanol to sample mass was used, and a 10-fold dilution (total of 80-fold dilution) was used in sample analysis.



**Figure 5:** Matrix interference in ic-ELISA: effect of sample dilution (8 to 80-fold) on DON determination in wheat grain, wheat flour, kibbe and wheat germ.

Table 4 shows DON recovery in the different matrices. The recovery of DON in wheat grains ranged from 88 to 122 % (mean 108 %), which was consistent to the recommended recovery (60 – 120 %) by Commission of the European Communities (2006) about DON in foodstuffs, with relative standard deviation (RSD) below 20 %. Wheat flour showed good overall recovery (103.0 %), but the RSD for low DON concentrations was high (36.2 %), while for higher concentrations was adequate (19.0 to 21.5 %). On the other hand, the extraction method was not efficient to extract DON from complex matrix as kibbe and wheat germ, observed by the high RSD in kibbe samples (41.1 to 51.4 %) and low recovery (26.9 %) associated to high RSD (14.8 to 44.5 %) in germ samples. Kibbe is made from germinated wheat, which is firstly cooked, parboiled or steamed; the outer layers of bran are removed, and then grounded into various sized grains. In the germination step, the wheat kernel has increased its nutritional status (MIRANDA, 2006), and consequently matrix complexity. Wheat germ is the core of the wheat kernel, which is removed during the milling of white flour and presents high content of lipids (8 %), vitamins and minerals, specially vitamin E. The low recoveries of wheat

germ can be improved changing the protocol extraction, adding a step of lipid removal, for example. Schneider et al. (2004) suggest DON extraction prior ELISA with pure water or neutral buffer solutions, to avoid sample matrix problems arising from co-extracted fat.

HPLC and ic-ELISA data of natural DON contamination in wheat samples (n= 34) (Table 5) showed correlation coefficient (r) of 0.84 (Figure 6). Such correlation between ic-ELISA and HPLC can demonstrate the effective use of anti-DON mAb-based ic-ELISA in wheat analysis. Immunoassay recorded lower values of DON than HPLC, indicating possible DON degradation in methanol:water extracts over the time between DON IAC-extraction and ic-ELISA analysis. In seven samples (20.6 %) DON was detected by HPLC, but it was not detected by ic-ELISA, probably due to the lower detection limit of HPLC (87.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) when compared to ELISA (177.12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). These results were in accordance with those reported by Ono et al. (2000) for fumonisin immunoassay.

**Table 4:** Recovery of deoxynivalenol (DON) in different wheat matrices by ic-ELISA using anti-DON.3 mAb.

Sample	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Recovery (%)	RSD (%)	Mean recovery (%)
	Added	Recovered <sup>a</sup>			
Wheat grains	350	310.4 $\pm$ 43.4	88.7	14.0	108.4 $\pm$ 40.0
	1250	1533.1 $\pm$ 246.2	122.6	16.1	
	1750	1994.1 $\pm$ 232.8	113.9	11.7	
Wheat flour	350	488.7 $\pm$ 176.7	139.3	36.2	103.0 $\pm$ 34.4
	1250	1238.1 $\pm$ 275.8	99.0	21.5	
	1750	1236.4 $\pm$ 234.8	70.6	19.0	
Wheat kibbe	350	347.2 $\pm$ 178.4	99.2	51.4	108.0 $\pm$ 24.9
	1250	1344.0 $\pm$ 664.8	107.5	50.0	
	1750	2028.0 $\pm$ 832.8	115.9	41.1	
Wheat germ	350	111.3 $\pm$ 16.4	31.8	14.8	26.9 $\pm$ 4.4
	1250	289.6 $\pm$ 44.5	23.2	44.5	
	1750	449.9 $\pm$ 79.4	25.7	17.6	

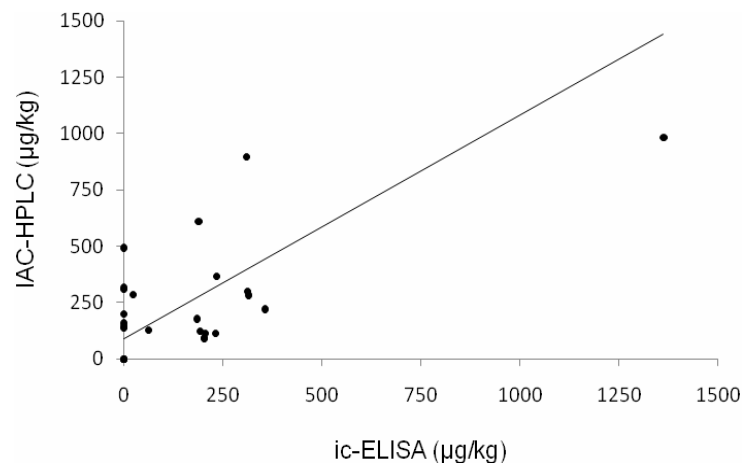
<sup>a</sup> Data represents the mean of six determinations (duplicate spiking, triplicate analysis). Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

RSD= Relative Standard Deviation.

**Table 5:** Natural occurrence of DON in wheat from Rio Grande do Sul and Paraná States evaluated by IAC-HPLC and ic-ELISA.

Locality	n	IAC-HPLC			ic-ELISA		
		Positive samples (%)	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Positive samples (%)	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
			Mean	Range		Mean	Range
<b>PR</b>	21	14 (58.3)	163.0	ND–609.6	9 (42.8)	84.3	ND–313.7
<b>RS</b>	13	10 (76.9)	473.0	ND–1531.5	8 (61.5)	363.9	ND–1362.1
<b>Total</b>	34	24 (70.6)	273.5	ND–1531.5	17 (50.0)	185.78	ND–1362.1

ND= Not detected (below LOQ, HPLC= 87.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; ic-ELISA= 177.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  
n= number of samples



**Figure 6:** HPLC and ic-ELISA correlation data for DON detection in 34 naturally contaminated wheat samples. The correlation coefficient (0.84) was calculated by linear regression equation  $y = 89.218 + 0.099x$ , and ic-ELISA/HPLC ratio was 0.68.

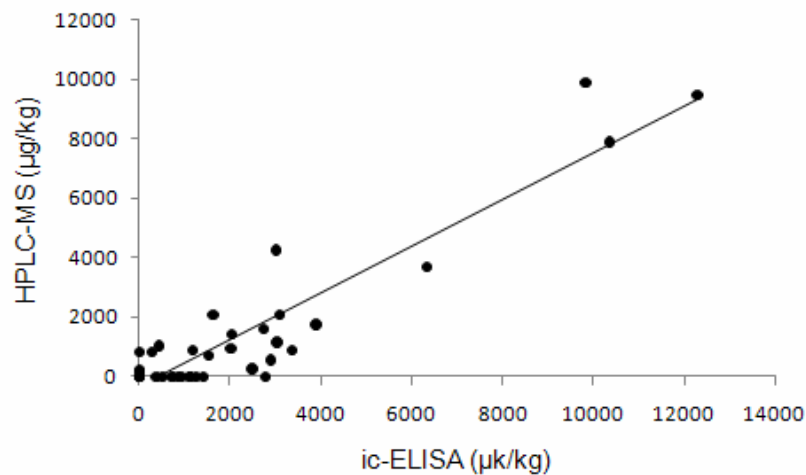
A good correlation ( $r = 0.93$ ) between ic-ELISA and HPLC-MS was observed analyzing 44 samples for DON (37 wheat grain, 1 wheat flour, and 6 wheat kibbes, Figure 7). Immunoassay recorded higher levels of DON than HPLC-MS (Table 6), indicating either recovery losses during sample preparation in HPLC-MS (clean up step) and/or food matrix effect during immunoassay (Pestka et al., 1995). Fujii et al. (2006) also observed overestimation in ic-ELISA developed for ochratoxin A analysis in coffee.

The present anti-DON.3 mAb-based ic-ELISA could be effectively applied for DON screening of wheat, with advantages of simplicity and sensitivity. The small volume of samples and reagents required to perform ELISA could also enable the analysis of higher number of samples using an ecologically safe technique at a relatively low cost.

**Table 6:** Natural occurrence of DON in wheat grain, wheat flour, and kibbe from Rio Grande do Sul and Paraná States evaluated by HPLC-MS and ic-ELISA.

Locality	n	HPLC-MS			ic-ELISA		
		Positive samples (%)	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Positive samples (%)	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
			Mean	Range		Mean	Range
PR	29	10 (34.5)	264.8	ND–2094.2	16 (55.2)	792.9	ND–3033.9
RS	15	12 (80.0)	2995.7	ND–9906.9	15 (100.0)	4168.4	435.3–12291.4
<b>Total</b>	44	22 (50.0)	1195.8	ND–9906.9	31 (70.4)	1943.6	ND–12291.4

ND= not detected (below LOQ. HPLC-MS= 140  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; ic-ELISA= 177.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  
n= number of samples



**Figure 7:** HPLC-MS and ic-ELISA correlation data for DON detection in 44 naturally contaminated wheat. The correlation coefficient (0.93) was calculated by linear regression equation  $y = 0.7863x - 319.02$ , and ic-ELISA/HPLC-MS ratio was 1.64.

### Conclusion

As natural and unavoidable contaminants of important agricultural commodities, mycotoxins have continued to severely impact human and animal health. The MAb-based ic-ELISA may be effectively applied for deoxynivalenol screening in wheat grains and wheat flour, with advantages of simplicity, facility in sample preparation and sensitivity. The results indicate that deoxynivalenol concentration determined by ic-ELISA and IAC-HPLC or HPLC-MS have a very high correlation coefficient.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE DERIVADOS DE TRIGO EM LONDRINA, PR, POR MEIO DE QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

SANTOS, Joice Sifuentes; OLIVEIRA, Tatiane Martins; TOLEDO PIZA, Jayme; ONO, Elisabete Yurie Sataque; HIROOKA, Elisa Yoko  
Avaliação do consumo de trigo e derivados em Londrina, PR, Brasil.  
Submetido à **Revista da Soc. Bras. de Alimentação e Nutrição: Nutrire**. Reapresentado com as correções sugeridas pelos revisores.

### Resumo

O trigo é um dos alimentos mais consumidos na dieta humana, contribuindo com 20 % do total de calorias diárias. A fim de conhecer o hábito de consumo de trigo e seus derivados pela população de Londrina, Paraná, Brasil, e sua correlação com alguns fatores sociais, demográficos e antropométricos, foi utilizado um questionário de frequência de consumo de alimentos (QFCA). O questionário foi aplicado a 270 indivíduos (64,8 % do gênero feminino e 35,2 % masculino, com idade entre 8 e 76 anos). Macarrão (mediana= 150 g/semana) e pão francês (Md= 275 g/semana) foram os alimentos mais consumidos, observando-se correlação entre o consumo de derivados de trigo e dados sócio-demográficos e antropométricos. Quanto ao Índice de Massa Corporal (IMC), 60,4 % dos entrevistados apresentavam peso normal ( $20-24,9 \text{ kg/m}^2$ ), enquanto 20,8 % e 9,8 % apresentavam sobrepeso ( $25,0 < \text{IMC} < 29,9 \text{ kg/m}^2$ ) e obesidade ( $\text{IMC} > 30,0 \text{ kg/m}^2$ ), respectivamente. Observou-se que 37 % dos entrevistados apresentavam ensino superior incompleto, 84,8 % eram não fumantes, 37,8 % dos entrevistados não consumiam bebidas alcoólicas com frequência, 53 % não praticavam atividade física e 79,3 % não estavam em dieta. O QFCA forneceu uma estimativa semi-quantitativa do consumo de derivados de trigo pela população de Londrina.

**Descritores:** consumo de alimentos, inquéritos nutricionais, índice antropométrico.

### Abstract

Wheat is one of the major food components in human diet, accounting for approximately 20 % of total daily calories. With the aim of identifying the intake habits of wheat and wheat products, it was applied a food consumption frequency questionnaire in Londrina, Paraná, Brazil. A total of 270 persons (64.8% female and 35.2% male, from 8 to 76 years old) were interviewed. Pasta (median= 150 g/week) and bread (Md= 275 g/week) were the most consumed food, and a correlation between wheat products intake and social-demographic and anthropometric data were observed. Regarding nutritional status, 60.4 % had body mass index within the normal range ( $20-24.9 \text{ kg/m}^2$ ), while 20.8 % and 9.8% presented overweight and obesity, respectively. It was observed that 37 % of the subjects interviewed presented incomplete graduation, 84.8 % had not the smoking habit, 37.8 % consumed alcoholic drinks, 53 % used not to practice some physical activity, and 79.3 % were not on a diet of food

restriction. The food consumption frequency questionnaire provided semi-quantitative intake estimation of wheat products by Londrina population.

**Key-words:** wheat intake, nutrition surveys, body mass index.

### **Resumen**

Trigo es uno de los alimentos más consumidos en la dieta humana, contribuyendo con más de 20 % de calorías diarias totais. Con el objetivo de conocer los hábitos de consumo de trigo e sus derivados y su correlación con algunos factores sociales, demográficos y antropométricos, fue aplicado un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos a población en Londrina, Paraná, Brasil. Las encuestas fueron sometidas a 270 individuos (35,2 % del género masculino y 64,8 % del género femenino, con edad entre 8 y 76 años). Macarrón (mediana= 150 g/semana) y pan (Md= 275 g/semana) fueron los alimentos más consumidos, observando-se correlación entre el consumo de derivados del trigo y dados socio-demograficos y antropométricos. Con relación al estado nutricional, 60,4 % presentaban el IMC dentro del rango normal (20-24,9 kg/m<sup>2</sup>), mientras 20,8 % y 9,8 % presentaban sobrepeso y obesidad. Fue observado que 37 % de los entrevistados presentaban graduación incompleta, 84,8 % no tenían el habito de fumo, 37,8 % no consumían bebidas alcohólicas, 53 % no practicaban actividad física y 79,3 % no estaban realizando dieta de restricción alimentar. El cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos proporcionó una estimativa semi-quantitativa del consumo de derivados del trigo por la población de Londrina.

**Descriptorios:** Consumo de alimentos, encuestas nutricionales, índice antropométrico.

### **Introdução**

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é originário do Oriente Médio (Ásia), ocupando 20 % da área mundial cultivada, com produção anual de 500 milhões de toneladas. Tem sido cultivado no Brasil desde 1534 pelos portugueses (OSÓRIO, 1992), sendo que o Estado do Paraná contribui com 60 % da produção nacional, seguido pelos Estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso e São Paulo (IBGE, 2009). No Paraná, a região Norte contribui com cerca de 40 % do trigo produzido, sendo o município de Londrina o segundo maior produtor do Estado, responsável pela produção de aproximadamente 50 mil ton/ano. Além de grande importância na produção deste cereal, Londrina se destaca como terceira maior cidade da Região Sul, referência regional na prestação de serviços e indústrias de transformação (IBGE, 2009).

A produção de trigo atingiu 4,7 milhões de toneladas em 2005, com aumento para 5,8 milhões de toneladas na safra de 2008 (CEPEA, 2008), reflexo de uma maior área plantada e melhor produtividade. No entanto, o consumo nacional aproximado de 10 milhões de toneladas ainda requer a importação do produto (CONAB, 2008).

Este cereal é amplamente consumido e difundido na dieta humana, contribuindo com aproximadamente 20 % do total de calorías diárias. Os derivados imediatos consistem de farinha

branca e integral. A produção de farinha branca elimina do produto final as porções externas do grão de trigo (casca e germen), enquanto estes elementos são parte essencial da farinha de trigo integral. A farinha branca possui menor valor nutricional que a farinha integral, pois no processo de extração são eliminadas algumas vitaminas e minerais, e as proteínas remanescentes são deficientes em aminoácidos essenciais. No entanto, há maior consumo de farinha branca, devido ao seu alto conteúdo de glúten, que confere elasticidade as massas produzidas. O trigo pode ser destinado à produção de pão, macarrão, bolo, biscoitos, cereais matinais, pizza, assim como trigoilho para o preparo de quibe, torta de quibe, tabule e outros produtos diversos, fornecendo proteínas de alto valor biológico e carboidratos complexos (amido e fibras), bem como vitaminas do complexo B e ferro (CORNELL; HOVELING, 1998).

A avaliação dietética permite identificar grupos populacionais de risco e estimar a exposição a contaminantes, elaborar programas de intervenção nutricional, assim como prever a adequação alimentar, monitorar tendências na utilização de alimentos e determinar grupos de acordo com os padrões dietéticos (CINTRA et al., 1997). O método 'Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos' (QFCA) apresenta vantagem pelo baixo custo, rapidez na aplicação e eficiência na identificação do consumo habitual de alimentos (SLATER et al., 2003), sendo apontado como o método de avaliação dietética mais apropriado na epidemiologia (WILLET, 1990).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ingestão de derivados de trigo pela população de Londrina, Paraná, e sua correlação com fatores sociais, demográficos e antropométricos, utilizando o método de Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos.

## **Método**

### *Casuística*

Um Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos (QFCA) seletivo e semi-quantitativo foi aplicado a uma amostra da população da cidade de Londrina, Paraná, para avaliar o consumo de trigo e derivados, no período compreendido entre os meses de setembro de 2007 a abril de 2008. O QFCA, com período de referência de uma quinzena, foi auto-preenchido pelos integrantes da amostra, após abordagem explicativa sobre a pesquisa.

O tamanho da amostra foi calculado conforme Barbetta (2001) utilizando a fórmula  $n_0 = 1/E_0^2$ , onde  $n_0$  é a primeira aproximação para o tamanho da amostra e  $E_0$  é o erro amostral tolerado, estabelecido neste trabalho como 6 %. O tamanho da amostra a ser entrevistada ( $n$ ), constituída de 270 indivíduos, foi calculada pela fórmula  $n = N \times n_0 / N + n_0$ , sendo  $N$  o tamanho da população (447.000 habitantes; LONDRINA, 2007). A pesquisa foi autorizada pelo 'Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos' da Universidade Estadual de Londrina, através de Parecer nº 173/07. A participação foi voluntária com consentimento livre e esclarecido, assegurando-se a confiabilidade das informações. O tempo médio de preenchimento foi de quinze minutos.



### *Questionário de frequência de consumo de alimentos*

O questionário consistiu de duas partes, sendo uma contendo perguntas sobre o perfil do indivíduo entrevistado e, outra sobre consumo de trigo e seus derivados. Dados de peso e altura fornecidos pelos entrevistados foram utilizados para calcular o Índice de Massa Corporal (IMC), por meio da fórmula:  $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ .

A quantidade dos alimentos foi avaliada considerando porção alimentar por medida caseira para cada produto (exemplos: 1 unidade, 1 fatia, 4 biscoitos, ½ xícara), segundo ANVISA (2003). Os alimentos utilizados no questionário foram pão francês, pão de forma, pão de forma integral, biscoito água e sal, biscoito *cream craker*, biscoito recheado, biscoito doce, macarrão, macarrão instantâneo, cereal matinal, barra de cereal, bolo a base de farinha de trigo, hambúrguer, cachorro quente e pizza. As frequências de consumo utilizadas neste trabalho foram: “não consumo”, “consumo eventualmente”, “consumo a cada 15 dias”, “1 a 2 vezes por semana”, “3 a 4 vezes por semana”, “5 a 6 vezes por semana”, “consumo 1 vez ao dia” e “consumo 2 vezes ao dia”. A quantidade consumida de cada alimento para um período semanal foi calculada a partir dos dados de tamanho da porção e frequência de consumo.

### *Análise estatística*

A média (M), mediana (Md), primeiro quartil (Q25) e terceiro quartil (Q75) dos resultados foram determinados. Devido à falta de distribuição normal inerente aos dados referentes ao consumo de alimentos, os testes estatísticos realizados foram os não paramétricos: correlação de Spearman, teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis. O *software* utilizado para os testes estatísticos foi o programa Statistica versão 6.0 (Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos).

### **Resultados**

Para algumas das questões abordadas, o número total de observações não alcança 100 %, pois nem todos os entrevistados responderam a todas as questões.

A Tabela 1 apresenta o perfil sócio-demográfico dos entrevistados, sendo a maioria (64,8 %) do gênero feminino, com idade média de 31,2 anos, mediana (Md) de 25 anos (n= 269) e intervalo de 8 a 76 anos (Q25= 21 anos, Q75= 40 anos). Houve correlação negativa entre idade e consumo de biscoito recheado ( $r = -0,23$ ), barra de cereal ( $r = -0,17$ ) e hambúrguer ( $r = -0,19$ ) ( $p < 0,05$ ; correlação de Spearman). Observou-se, também, consumo semanal superior de cachorro quente (Md= 18,75 vs. 12,50 g; intervalo interquartil= 12,5 – 75,0 g vs. 0,0 – 25,0 g) e biscoito recheado (Md= 15,0 vs. 7,5 g; intervalo interquartil= 0,0 – 105,0 g vs. 0,0 – 45,0 g) pelos indivíduos do gênero masculino ( $p < 0,05$ ; teste de Mann-Whitney).

**Tabela 1:** Perfil sócio-demográfico da população entrevistada, no período de setembro de 2007 a abril de 2008, Londrina, PR.

Variável	Classes	N (%)
Gênero	Masculino	91 (31,7)
	Feminino	175 (64,8)
Idade (anos)	Abaixo de 15	10 (3,7)
	16 – 30	154 (57,0)
	31 – 45	56 (20,7)
	46 – 60	36 (13,3)
	Acima de 60	13 (4,8)
IMC*	Baixo peso	23 (9)
	Normal	154 (60,4)
	Sobrepeso	53 (20,8)
	Obesidade	25 (9,8)
Região de origem	Sul	157 (58,1)
	Sudeste	92 (34,1)
	Nordeste	5 (1,9)
	Centro-oeste	3 (1,1)
Ascendência	Multi-étnica	88 (32,6)
	Italiana	51 (18,9)
	Japonesa	18 (6,7)
	Espanhola	13 (4,8)
	Portuguesa	12 (4,4)
	Africana	11 (4,1)
	Indígena	5 (1,9)
	Outras	12 (4,4)

\* IMC = Índice de Massa Corporal. Total de pessoas entrevistadas= 270. Total de habitantes= 447.000. O número total de observações não alcança 100% pois nem todos os entrevistados responderam a todas as questões.

O peso dos entrevistados variou de 32 a 120 kg, com média de 65 kg e mediana de 63 kg (n= 261), enquanto a altura variou de 1,32 a 1,94 m, com média de 1,67 m e mediana de 1,66 m (n= 259). Quanto ao estado nutricional (Tabela 1), 9 % apresentavam baixo peso ( $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ ), 60,4 % peso normal ( $18,6 < IMC < 24,9 \text{ kg/m}^2$ ), 20,8 % sobrepeso ( $25,0 < IMC < 29,9 \text{ kg/m}^2$ ) e 9,8 % obesidade ( $IMC > 30,0 \text{ kg/m}^2$ ). Cabe ressaltar que o consumo de macarrão apresentou correlação positiva com o peso da população estudada ( $r= 0,24$ ;  $p<0,05$ ; correlação de Spearman). Avaliando o consumo de derivados de trigo conforme faixa de IMC, observou-se que houve diferença significativa no consumo de hambúrguer e biscoito doce ( $p<0,05$ ; teste de Kruskal-Wallis). O consumo de hambúrguer foi superior em indivíduos com baixo peso (Md= 75,0 g; intervalo interquartil= 12,5 – 75,0 g), mas inferior em indivíduos com sobrepeso (Md= 12,5 g; intervalo interquartil= 0,0 – 25,0 g). Os grupos que apresentaram peso normal (Md= 12,5 g; intervalo interquartil= 0,0 – 75,0 g) e obesidade (Md= 12,5 g; intervalo interquartil= 0,0 – 25,0 g) não apresentaram diferenças com os demais grupos. Com relação ao consumo de biscoito doce, os grupos com baixo peso (Md= 15,0 g; intervalo interquartil= 7,5 – 45,0 g) e peso normal (Md= 15,0 g; intervalo interquartil= 0,0 – 45,0 g)

apresentaram consumo superior, se comparados ao grupo com excesso de peso (Md= 0,0 g; intervalo interquartil= 0,0 – 7,5 g). O grupo com sobrepeso não diferiu dos demais grupos (Md= 0,0 g; intervalo interquartil= 0,0 – 45,0 g), indicando a tendência de evitar determinados alimentos em grupos com sobrepeso ou obesidade.

Entre os entrevistados provenientes de várias regiões do país (Tabela 1; Sul - 58,1 %, Sudeste - 34,1 %, Nordeste - 1,9 % e Centro-Oeste - 1,1 %), o maior consumo semanal de bolo ocorreu entre aqueles da região Sul (M; Md; Q25 – Q75: 85,5; 25,0; 12,5 – 75,0 g), seguido do Nordeste (50,0; 25,0; 12,5 – 25,0 g), Centro-Oeste (66,7; 25,0; 0,0 – 175,0 g) e Sudeste (45,6; 25,0; 12,5 – 75,0 g) ( $p < 0,05$ ; teste de Kruskal-Wallis).

Quanto à ascendência (Tabela 1), a maioria (32,6 %) relatou ascendência multi-étnica ou brasileira, seguida por italiana (18,9 %), japonesa (6,7 %), espanhola (4,8 %), portuguesa (4,4 %), africana (4,1 %), indígena (1,9 %) e outras (alemã, eslovaca, libanesa, síria, austríaca, holandesa, árabe, polonesa e chinesa; 4,4 %). Cabe registrar que não houve diferença significativa no consumo dos derivados de trigo segundo a ascendência da população ( $p > 0,05$ ).

A Tabela 2 mostra os hábitos de consumo semanal de derivados de trigo, sendo que o macarrão revelou-se como o produto consumido com a maior frequência, fazendo parte da dieta de 91,3 % dos entrevistados, seguido pelo pão francês (89,2 %). Os alimentos menos consumidos foram o cereal matinal (42,2 %) e o pão integral (45,5 %). Com relação à quantidade de alimento consumida, destaca-se o pão francês como o mais consumido (Md= 275 g/semana), seguido pelo macarrão (Md= 150 g/semana).

A Tabela 3 apresenta o consumo de produtos derivados do trigo conforme as faixas etárias dos entrevistados, sendo que alimentos como biscoito recheado, hambúrguer, cachorro quente e pizza são pouco consumidos por indivíduos acima de 60 anos. Foi possível verificar que o maior consumo de biscoito recheado ocorreu entre os indivíduos pertencentes à faixa etária inferior a 30 anos.

A renda familiar da população estudada variou de R\$ 300,00 a R\$ 15.000,00, com média de R\$ 1.860,00 e mediana de R\$ 1.500,00 ( $n = 139$ ). Ocorreu correlação positiva ( $p < 0,05$ ; correlação de Spearman) entre a renda e o consumo semanal de barra de cereal ( $r = 0,18$ ), bolo ( $r = 0,17$ ) e pizza ( $r = 0,28$ ).

Com relação à escolaridade, a maioria dos entrevistados apresentava ensino superior incompleto (37 %). Os demais apresentavam ensino básico incompleto (5,9 %), básico completo (8,9 %), médio incompleto (1,5 %), médio completo (21,1 %), superior completo (15,2 %) e pós-graduação (3,7 %). Houve diferença significativa no consumo de determinados alimentos (pão integral, biscoito recheado, barra de cereal, hambúrguer, cachorro quente e pizza) conforme nível de escolaridade ( $p < 0,05$ ; teste de Kruskal-Wallis). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 2:** Consumo semanal de trigo e subprodutos pela população entrevistada, no período de setembro de 2007 a abril de 2008, Londrina, PR.

Alimento	Consumo (%)	Quantidade (g/semana)	
		Mediana (Média)	1° – 3° quartil
Macarrão	91,3	150,0 (151,0)	50,0 – 150,0
Pão francês	89,2	275,0 (267,54)	75,0 – 350,0
Bolo*	88,9	25,0 (71,2)	12,5 – 75,0
Pizza	87,5	70,0 (125,5)	35,0 – 210,0
Cachorro quente	76,1	12,5 (36,6)	12,5 – 25,0
Pão de forma	68,0	25,0 (123,4)	0,0 – 175,0
Hambúrguer	66,4	12,5 (43,4)	0,0 – 50,0
Biscoito recheado	65,6	15,0 (57,5)	0,0 – 45,0
Macarrão instantâneo	63,8	20,0 (80,1)	0,0 – 120,0
Biscoito água e sal	62,6	10,0 (76,0)	0,0 – 60,0
Biscoito doce	57,4	7,5 (48,9)	0,0 – 45,0
Barra de cereal	52,7	6,25 (34,7)	0,0 – 37,5
Biscoito cracker	47,7	0,0 (54,8)	0,0 – 60,0
Pão integral	45,5	0,0 (79,7)	0,0 – 75,0
Cereal matinal	42,2	0,0 (37,4)	0,0 – 45,0

Total de pessoas entrevistadas= 270. Total de habitantes= 447.000. A coluna *Consumo* refere-se ao consumo pelo menos eventual do alimento. \*Bolo à base de farinha trigo.

Poucos entrevistados afirmaram ter o hábito de fumar (11,5 %; n= 31), enquanto 84,8 % (n= 229) afirmaram não apresentar o hábito (não-fumantes). Observou-se maior consumo de pão de forma (Md= 25 vs. 0 g; intervalo interquartil= 0 – 175 g vs. 0 – 75 g) e barra de cereal (Md= 6,25 vs. 0 g; intervalo interquartil= 0 – 37,5 vs. 0 – 6,25 g) pelos não-fumantes quando comparado aos fumantes (p<0,05; teste de Mann-Whitney).

Quanto ao consumo de bebida alcoólica, 102 indivíduos entrevistados (37,8%) informaram que tinham esse hábito, enquanto os demais (n= 149) não apresentavam esse costume. Pôde-se observar a ocorrência de um maior consumo de hambúrguer (Md= 12,5 vs. 12,5 g; intervalo interquartil= 0,0 – 75,0 g vs. 0,0 – 25,0 g) e pizza (Md= 70,0 vs. 35,0 g; intervalo interquartil= 35,0 – 210,0 g vs. 35,0 – 70,0 g) entre os consumidores de bebida alcoólica (p<0,05; teste de Mann-Whitney).

Com relação à atividade física, 143 entrevistados (53 %) não eram adeptos, enquanto 123 (45,6 %) afirmaram que praticavam alguma atividade. Os tipos de atividades físicas citadas pelos entrevistados foram caminhadas (15,6 %), ginástica/musculação (11,1 %), futebol (5,2 %), corrida (3,7 %), dança (3 %), hidroginástica e ciclismo (0,7 %), vôlei, handball e teatro (0,4 %). Notou-se maior consumo de biscoito recheado entre aqueles que não praticavam atividade física (Md= 15,0 vs. 7,5 g; intervalo interquartil= 0,0 – 45,0 g vs. 0,0 – 45,0 g), enquanto que um maior consumo de barra de cereal foi observado entre os praticantes (Md= 6,25 vs. 0,0 g; intervalo interquartil= 0,0 – 37,5 g vs. 0,0 – 12,5 g; p<0,05; teste de kruskal-Wallis).

**Tabela 3:** Consumo semanal (em gramas) de produtos à base de trigo, conforme faixa etária de indivíduos entrevistados, no período de setembro de 2007 a abril de 2008, Londrina, PR.

Faixa etária	Pão francês	Biscoito recheado	Biscoito doce	Hambúrguer	Cachorro quente	Pizza
< 15 anos	525,0 (350,0 – 700,0) <sup>a,c</sup>	157,5 (15,0 – 210,0) <sup>a</sup>	15,0 (7,5 – 105,0) <sup>a,b</sup>	18,75 (0,0 – 75,0) <sup>a,e</sup>	25,0 (12,5 – 75,0) <sup>a</sup>	35,0 (35,0 – 35,0) <sup>a,b</sup>
15 a 30 anos	175,0 (75,0 – 350,0) <sup>b</sup>	45 (7,5 – 105,0) <sup>a</sup>	15,0 (0,0 – 45,0) <sup>a</sup>	25,0 (12,5 – 75,0) <sup>a</sup>	12,5 (12,5 – 75,0) <sup>a</sup>	70,0 (35,0 – 210,0) <sup>a</sup>
31 a 45 anos	350,0 (75,0 – 350,0) <sup>a</sup>	3,75 (0,0 – 45,0) <sup>b,c</sup>	7,5 (0,0 – 15,0) <sup>a,b</sup>	0,0 (0,0 – 12,5) <sup>a,d</sup>	12,5 (0,0 – 25,0) <sup>a,b</sup>	35,0 (35,0 – 70,0) <sup>a,b</sup>
46 a 60 anos	75,0 (12,5 – 350,0) <sup>b</sup>	0,0 (0,0 – 7,5) <sup>b</sup>	0,0 (0,0 – 7,5) <sup>b</sup>	0,0 (0,0 – 0,0) <sup>b,d,e</sup>	12,5 (0,0 – 25,0) <sup>a,b</sup>	35,0 (35,0 – 210,0) <sup>a,b</sup>
> 60 anos	350 (175,0 – 350,0) <sup>a,b</sup>	0,0 (0,0 – 0,0) <sup>c</sup>	0,0 (0,0 – 3,8) <sup>a,b</sup>	18,75 (0,0 – 75,0) <sup>c,e</sup>	0,0 (0,0 – 0,0) <sup>b</sup>	0,0 (0,0 – 70,0) <sup>b</sup>

Total de pessoas entrevistadas = 270. Total de habitantes = 447.000. Os valores são apresentados como mediana (1º - 3º quartil). Estão apresentados apenas os dados de consumo dos alimentos para os quais foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes faixas etárias ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4:** Consumo semanal (em gramas) de derivados de trigo segundo a escolaridade dos entrevistados, no período de setembro de 2007 a abril de 2008, Londrina, PR.

Grau de escolaridade	Pão integral	Biscoito recheado	Barra de cereal	Hambúrguer	Cachorro quente	Pizza
Básico incompleto	0,0 (0,0–25,0) <sup>a,b</sup>	0,0 (0,0 – 75,0) <sup>a</sup>	0,0 (0,0 – 6,25) <sup>a,c</sup>	0,0 (0,0 – 6,25) <sup>b</sup>	0,0 (0,0 – 12,5) <sup>b</sup>	35,0 (0,0 – 35,0) <sup>b,c</sup>
Básico completo	0,0 (0,0 – 0,0) <sup>b</sup>	7,5 (0,0 – 45,0) <sup>a,b</sup>	0,0 (0,0 – 12,5) <sup>a,c</sup>	12,5 (0,0 – 25,0) <sup>a,b</sup>	12,5 (0,0 – 25,0) <sup>a,b</sup>	35,0 (0,0 – 35,0) <sup>b,d</sup>
Médio incompleto	0,0 (0,0 – 175,0) <sup>a,b</sup>	105,0 (56,26 – 262,5) <sup>a,b</sup>	0,0 (0,0 – 6,25) <sup>c</sup>	0,0 (0,0 – 37,5) <sup>a,b</sup>	50,0 (12,5 – 212,5) <sup>a,b</sup>	17,5 (0,0 – 35,0) <sup>b,c,d,e</sup>
Médio completo	0,0 (0,0 – 12,5) <sup>a,b</sup>	3,75 (0,0 – 45,0) <sup>a</sup>	0,0 (0,0 – 37,5) <sup>a,c</sup>	12,5 (0,0 – 75,0) <sup>a,b</sup>	25,0 (12,5,0 – 75,0) <sup>a</sup>	70,0 (35,0–210,0) <sup>b,c,d,e</sup>
Superior incompleto	0,0 (0,0 – 75,0) <sup>a,b</sup>	45,0 (7,5 – 45,0) <sup>b</sup>	6,25 (0,0 – 37,5) <sup>b,c</sup>	25,0 (12,5 – 75,0) <sup>a</sup>	12,5 (12,5 – 25,0) <sup>a,b</sup>	70,0 (35,0 – 210,0) <sup>c,e</sup>
Superior completo	12,5 (0,0 – 275,0) <sup>a,b</sup>	0,0 (0,0 – 45,0) <sup>a</sup>	6,25 (0,0 – 37,5) <sup>a,c</sup>	12,5 (0,0 – 25,0) <sup>a,b</sup>	12,5 (12,5 – 25,0) <sup>a,b</sup>	70,0 (35,0–210,0) <sup>a,d,e</sup>
Pós-graduação	75,0 (12,5 – 350,0) <sup>a</sup>	15,0 (0,0 – 15,0) <sup>a,b</sup>	37,5 (12,5 – 87,5) <sup>a,b</sup>	12,5 (0,0 – 25,0) <sup>a,b</sup>	12,5 (12,5 – 25,0) <sup>a,b</sup>	70,0 (70,0 – 70,0) <sup>c,e</sup>

Total de pessoas entrevistadas= 270. Total de habitantes= 447.000. Os resultados são apresentados como mediana (1° - 3° quartil). Estão apresentados apenas os dados de consumo dos alimentos para os quais foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os graus de escolaridade, segundo o teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Durante a entrevista, 79,3 % (n= 214) dos indivíduos informaram não realizar dieta (seja para controle de peso ou relacionada a problemas de saúde), enquanto 17,8 % (n= 48) estavam em dieta. O consumo semanal de pão integral foi superior pelos indivíduos que estavam em dieta, enquanto o consumo de biscoito recheado, hambúrguer, cachorro quente e pizza foi superior pelos indivíduos que não estavam realizando dieta no período da entrevista ( $p < 0,05$ ). Os resultados podem ser observados na Tabela 5. Frequentemente, o surgimento de algumas doenças está diretamente relacionado aos hábitos de alimentação da população. Da população entrevistada para a realização deste trabalho, 57 pessoas (21,1 %) relataram apresentar algum problema de saúde relacionado à alimentação, enquanto a maioria (206; 76,3 %) afirmou não apresentar problemas. Os problemas mais comumente relatados foram hipertensão (25,0 %) e hipercolesterolemia (14,3 %).

**Tabela 5:** Consumo semanal (em gramas) de produtos à base de trigo de acordo com a realização de dieta ou não pelos entrevistados, no período de setembro de 2007 a abril de 2008, Londrina, PR.

	Indivíduos sob dieta		Indivíduos sem dieta	
	Mediana (média)	1° – 3° quartil	Mediana (média)	1° – 3° quartil
Pão integral	75,0 (172,6)	0,0 – 350,0	0,0 (55,3)	0,0 – 25,0
Biscoito recheado	0,0 (22,8)	0,0 – 15,0	15,0 (62,0)	0,0 – 45,0
Hambúrguer	12,5 (15,34)	0,0 – 25,0	12,5 (44,6)	0,0 – 75,0
Cachorro quente	12,5 (13,3)	0,0 – 25,0	12,5 (38,5)	12,5 – 25,0
Pizza	35,0 (91,1)	35,0 – 70,0	70,0 (125,3)	35,0 – 210,0

Total de entrevistados= 270. Total de habitantes= 447.000. Dieta: restrição calórica de alimentos, regime. Apresentados apenas os dados de consumo dos alimentos para os quais foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as pessoas que estavam realizando dieta ou não (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ).

### Discussão

Embora em Nutrição não exista um padrão ouro para os métodos que avaliam o consumo alimentar, o QFCA utilizado forneceu uma estimativa semi-quantitativa do consumo de derivados de trigo pela população do município de Londrina, PR.

Quanto à idade dos participantes da pesquisa, Marinho et al. (2007) obtiveram resultado semelhante em estudo realizado em Brasília, tendo como amostra indivíduos com idade média de 35 anos, mediana de 31 anos e faixa de 15 a 89 anos. Os autores também observaram renda média familiar de R\$ 2.194,00 e mediana de R\$ 1.594,00, semelhantes às do presente trabalho.

Em outro estudo, realizado com população universitária no interior paulista, Maciel e Silva (2008) observaram faixas de Índice de Massa Corporal (IMC) semelhantes, sendo que 23 % das pessoas apresentavam sobrepeso e 10 % apresentavam obesidade.

Marinho et al. (2007) apontaram a substituição de padrões alimentares tradicionais, baseado em cereais, raízes e tubérculos, por alimentação ocidentalizada, rica em gorduras e açúcares como causa

de sobrepeso e obesidade. Aliado a isso, a diminuição de atividades físicas aumenta o risco de doenças crônicas (MONTEIRO et al., 2000). Ainda, é importante comentar sobre o fato de que uma parcela da população desconhece o fator etiológico da alimentação em alguns problemas de saúde. No presente trabalho foi observado que alguns indivíduos afirmaram não apresentar problemas de saúde relacionados à alimentação e posteriormente assinalaram opções como hipercolesterolemia.

Entre os dados obtidos por Marinho et al. (2007), verificou-se que o pão foi o alimento consumido (pelo menos semanalmente) por 89,6 % dos entrevistados, em relação a 76 % de consumidores que mostraram preferência por massas. No Rio de Janeiro, pesquisa realizada por Chiara et al. (2007), tendo como amostra 224 adolescentes do sexo feminino com idade entre 12 e 19 anos, observaram consumo semelhante de pão francês (88,7 %), macarrão (88,7 %), biscoito salgado (76,1 %), pizza (68,6 %), hambúrguer (66 %), biscoito doce (61,7 %) e bolo (61,6 %).

Dados oficiais da Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2003), relacionados à aquisição domiciliar anual de alimentos da população brasileira, revelam que a compra *per capita* anual de farinha de trigo é de 17,9 kg na região Sul e 12,2 kg no Estado do Paraná. Aquisição *per capita* de massas e panificados na região Sul (27 kg/ano) se assemelhou à aquisição de carne (34 kg/ano).

Godoy et al. (2006) observaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no consumo de cereais, pães e raízes por adolescentes de 10 a 19 anos, quando analisaram a escolaridade dos chefes de família (em anos), utilizando Índice de Qualidade da Dieta (IQD). Em Santa Maria, RS, Santos et al. (2006) observaram baixo índice (11,9 %) de fumantes em universitários, resultado semelhante ao obtido no presente estudo. Com relação à prática de atividade física, Castro et al. (2004) observou a prática de atividade física por 50 % dos entrevistados, resultado semelhante ao verificado no presente estudo.

### **Conclusão**

Produtos derivados de trigo são amplamente consumidos em Londrina, PR, com ênfase ao pão francês e ao macarrão. Diferenças significativas foram observadas no consumo de derivados de trigo, quando avaliadas variáveis como faixa etária, Índice de Massa Corporal, escolaridade e procedência de regiões do país, corroborando na diversidade de fatores que influenciam os hábitos alimentares. Somase ainda a diferença no hábito entre os gêneros, atividade física, renda familiar, hábito de fumar, consumo de bebida alcoólica e dieta. A correlação positiva entre peso e a quantidade de macarrão consumida sugere que este alimento pode estar contribuindo para o sobrepeso da população estudada. Alimentos derivados de trigo são importante fonte energética para o organismo, mas é importante manter uma dieta balanceada, com aporte equilibrado de outros nutrientes, como proteínas e vitaminas. O QFCA forneceu uma estimativa semi-quantitativa do consumo de derivados de trigo em Londrina.



### 5.3 NATURAL OCCURRENCE OF DEOXYNIVALENOL IN WHEAT FROM SOUTH BRAZIL AND ESTIMATED DAILY INTAKE BY WHEAT PRODUCTS

Joice Sifuentes dos SANTOS, Elisabete Yurie Sataque ONO, Eiko Nakagawa ITANO, Elisabe Hiromi HASHIMOTO, Miguel MACHINSKI JÚNIOR, Osamu KAWAMURA, Elisa Yoko HIROOKA. **Food Additives and Contaminantes**. Artigo a ser submetido com posteriores modificações.

#### Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the major food, accounting for 20 % of worldwide cultivated area, where the 60 % of annual 500 million ton is produced in Russia, Ukraine, United States, China, India and France (INTERNATIONAL GRAINS COUNCIL, 2009).

The Southern Brazil accounts for 90 % of national wheat production of 5.8 million ton, with emphasis on the State of Paraná and Rio Grande do Sul (IBGE, 2009). However, current production has been unable to supply national demand of 10 million ton, which requests additional input through importation (CONAB, 2009). Brazil searches for self-sufficiency on wheat production. In this way, government elaborates plans about producer's payment and invests on the development of specific cultivars to Brazilian center-western region, reaching good productivity (CEPEA, 2009). Such dependence requires carefulness targeted on food safety control, mainly on undesirable toxic residues produced by mycotoxigenic fungi that frequently contaminates such commodity from the initial food productiveness chain in the field.

*Fusarium* spp. is phytopathogen of relevance on field, causing *Fusarium* Head Blight (FHB) and producing mycotoxins, of inevitable occurrence in vegetable origin food, widely consumed. Among *Fusarium* species, *F. graminearum* pointed out by frequent contamination in wheat and producing trichothecenes. Trichothecenes are extremely potent inhibitors of eukaryotic protein synthesis; different trichothecenes interfere with initiation, elongation, and termination stages. The 12,13-epoxide group is essential for inhibition of protein synthesis; reduction of the 9,10 double bond reduces toxicity (PESTKA; SMOLINSKI, 2005). Deoxynivlenol (DON; 2,13-epoxy-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihydroxytrichotecec-9-en-8one) is a type B trichothecene, classified by International Agency for Research on Cancer in group 3: "not classifiable as to its carcinogenicity to humans" (IARC, 1993).

As a global incidence of *Fusarium* toxins has been reported for cereals, a frequent contamination can be expected for grain-based products. In Germany, Schollenberger et al. (2006) detected DON in 95 % of samples, with a mean level over positive samples of 309  $\mu$ g/kg. Jajic et al. (2008) detected mean contamination of 1235  $\mu$ g/kg in Serbian wheat. Calori-Domingues et al. (2007) detected DON in Brazilian wheat at 332  $\mu$ g/kg (94 % positivity), while in imported wheat from Argentina and Paraguai the levels ranged from 30 to 349  $\mu$ g/kg (46 % positivity). According Lamardo et al. (2006), levels in wheat

flour commercialized in São Paulo, Brazil, where lower (296.3 µg/kg) than levels found in wheat grain (753.2 µg/kg). Oliveira et al. (2002) detected lower levels in bread (78 to 780 µg/kg) when compared to flour (40 to 1205 µg/kg). These results indicate the probable effect of wheat processing in wheat products.

An effective monitoring should be reached through reliable and fast analysis. Increased efforts have been made to develop analytical methods suitable for a rapid screening of mycotoxins, where ELISA kits presents some advantages. They usually provide rapid and sensitive detection, are very cost-effective and easy to use, thus they can be used by non-specialists and under field conditions as well. The assay is mostly performed in a 96-well plate, allowing simultaneous analysis of up to 45 samples in duplicate

Dietary ingestion is the main route of human exposure to DON, as this toxin is frequently detected in agricultural commodities such as wheat, rye, barley, oats, and other cereals (SUDAKIN, 2003). The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives established a Provisional Maximum Tolerable Daily Intake (PMTDI) of DON in 1 µg/Kg body weight/day, although the committee acknowledged that considerable uncertainty exists in the estimates of dietary intake (JECFA, 2001). Besides, experts in pollutant-risk assessment consider mycotoxins to be the most important chronic dietary risk factor, above synthetic contaminants, plant toxins, food additives or pesticide residues (KUIPER-GOODMAN, 1995).

In the present study, an indirect competitive ELISA (ic-ELISA) based on anti-DON monoclonal antibody was applied in a survey of naturally contaminated wheat and wheat products from Paraná and Rio Grande do Sul States, Brazil, as well as used to evaluate the wheat contribution to the dietary DON exposure by the consumers.

## **Material and methods**

### *Safety note*

Deoxynivalenol is cytotoxic, and should be handled with extreme care. Mycotoxin-contaminated material should be decontaminated with an aqueous solution of sodium hypochlorite (5 %).

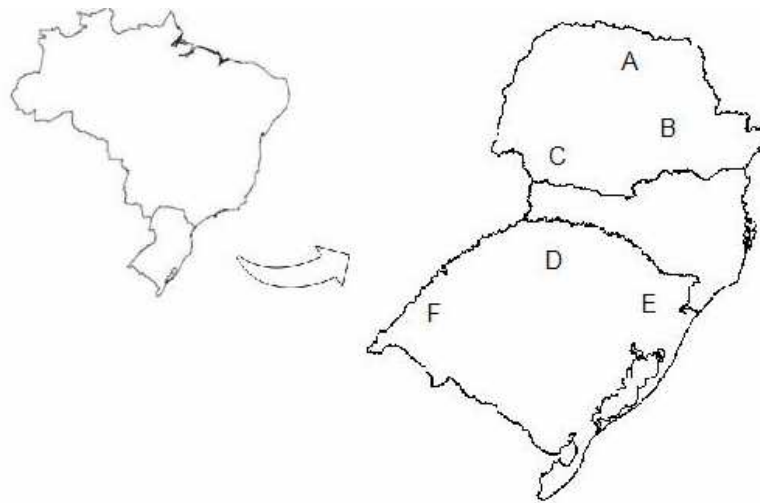
### *Deoxynivalenol standard*

Deoxynivalenol (98 % purity DON) purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) was dissolved in ethyl acetate, and analyzed at 260 nm (extinction coefficient of 1,410; UV-VIS Cintra 20, GMB, Melbourne, Australia). The stock standard solution was dissolved at 1 mg/mL in acetonitrile, and stored at -20 °C. Calibration curve (50, 100, 250, 500, 750, and 1000 ng/mL) used in ic-ELISA analysis was prepared in methanol:PBST (1:9, v/v).

### *Sampling*

Field trial wheat belonging to 2006, 2007 and 2008 crops in the States of Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS), Brazil was collected by Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), unit of Londrina-PR (44 samples, experimental field A and B, Figure 1) and unit of Passo Fundo-RS (60

samples, experimental field D, E and F, Figure 1). Thirty-two samples of 2008 crop were collected from trucks at delivery post in a cooperative involving 20 producers in South-Western Paraná (site C, Figure 1). Further 44 wheat samples were wheat grain (20), clean wheat (2), moist wheat (6), flour (8), germ (4) and bran (4), which were provided by a local mill (site A, Figure 1). Additional 22 commercial wheat kibbe samples were randomly collected by Health Surveillance Agency (ANVISA) inspectors in seven Regions of the Paraná State. Wheat grains (50 g) were ground (20 mesh) in a laboratory mill (A11-Ika, Germany), and kept at 4 °C until analysis.



**Figure 1:** Wheat sampling sites in the state of Paraná (A: Northern, B: Central, C: South-Western) and Rio Grande do Sul (D: North-Western, E: North-Eastern, F: South-Western).

#### *Humid-Milling process*

Wheat grain, clean wheat, moist wheat, flour, germ and bran provided by a local mill (site A, Figure 1) belonged to September/2008 crop. Freshly-harvested grains were directly collected from the trucks at the delivery milling post, following sampling protocol established by Brazilian guideline (Brasil, 2001). This grain was dried (13 % moisture), cleaned through vibrating aspirators (removal of dockage and extraneous material), the humidity was brought to 15.5 %, and the material was allowed to stand for 12 h prior to sampling of moist wheat. Moist wheat was transported directly to the mill, where rollers separated the bran and germ from the endosperm. The endosperm was processed using a cyclical process along double-rolermills and planchisters to obtain flour. Wheat grain, clean wheat, moist wheat, flour, germ and bran samples were collected in paper bags (1 kg) and maintained at 4 °C until analysis analysis of DON as reported below.

#### *Indirect competitive ELISA (ic-ELISA)*

DON levels were determined by ic-ELISA using anti-DON.3 mAb produced by DON.3 hybridoma cell culture, as described by Kawamura (2005). Briefly, the cell culture was carried out in Hybridoma-SFM (serum free medium, Gibco, Life Technologies, New York, United States) until maximum cell

proliferation in a humidified incubator at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, San Bruno, United States). Then, mAb supernatant was centrifugated (2,400 x g, 10 min, 4 °C), concentrated by ultrafiltration (Stirred Cell 8400, Millipore, Billerica, United States) and semi-purified by ammonium sulfate precipitation (40 % saturation, 243 g/L) and centrifugation (11,000 x g). The precipitates were redissolved in appropriate amounts of 0.1 M PBS pH 7.3, and then dialyzed against PBS followed by ultrapure water (Purelab Elga, Lane End, England). IgG concentrations were determined at 280 nm, using 1.35 as absorption coefficient (HARLOW; LANE, 1988).

Ground wheat samples (5 g) were extracted with 40 mL 70 % methanol at 150 rpm/30 min. After centrifugation (800 x g/5 min), the supernatant maintained at – 20 °C/overnight was again centrifuged (2250 x g/5 min), and two aliquots of 400 µL were dried under nitrogen stream at 40 °C, and stored at – 20 °C until analysis. Polystyrene microtitre plate wells (Corning, New York, USA) were coated with 100 µL of DON-HG-BSA (DON-hemiglutarate-bovine serum albumin, 2.0 µg/mL) in 0.2 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 (4 °C/overnight). Microplate was washed with PBST (PBS with 0.05 % Tween 20, 5 times), and the nonspecific binding was blocked with 200 µL PBS-ovalbumine 0.1 % (37 °C/1 h). Then microplate was washed (5 times), and 50 µL of DON standard or diluted wheat extract samples and 50 µL anti-DON.3 mAb (1.25 mg/mL, 200-fold diluted in PBST) were added, and incubation carried out at 37 °C/1 h. After washing five times with PBST, 100 µL of 1:2000 diluted Horse Radish Peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG were added, incubated at 25° C for 1 h, and washed as previously described. Then, 100 µL TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB; Sigma, St. Louis, USA) substrate solution were added. After 20 min at 25° C, the reaction was stopped by adding 50 µL 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorption was estimated at 450 nm (Expert Plus, Asys, Cambridge, United Kingdom). Average absorbance was calculated from individual absorbance obtained from duplicate wells and results were expressed as percentage of binding:  $\text{Binding (\%)} = \frac{A^+}{A^-} \times 100$ , where A<sup>+</sup> is the mean absorbance in the presence of DON standard or wheat extract sample and A<sup>-</sup> is the mean absorbance in their absence. The detection limit of DON (22.15 ng/mL, corresponding to 177.12 µg/kg) was calculated as 3-fold the standard deviation of absorbance (FUJII et al., 2006) from three replicate wells of zero standard (0 ng DON/well). DON concentration was determined using a standard curve (2.5 to 50 ng DON/well; 50 to 1000 ng/mL in methanol:PBST, 1:9), plotting percent binding against the log of DON amount.

#### *DON recovery*

DON recovery was evaluated in uncontaminated ground wheat grain, wheat flour, kibbe and wheat germ (less than 87.7 µg/kg by HPLC). These samples were spiked with DON standard solution (180 µg/mL in acetonitrile) to reach 350, 1250 and 1750 µg/kg of DON, and after standing overnight at 25 °C, the same procedure as described for the samples was carried out for extraction and ic-ELISA quantification. Recovery tests were based on duplicate spiking and triplicate analysis.

### *DON analysis by HPLC-MS*

Twenty-five grams of ground wheat samples were extracted with 100 mL acetonitrile:water (84:16, v/v) for 3 min in a high speed blender. The extract was filtered through Whatman paper filter n. 4, and the filtrate was 20-fold diluted in water:methanol:acetonitrile (85:6:9, v/v/v).

LC separation was performed by an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, United States). A 5  $\mu$ L volume of the diluted sample was loaded onto a Eclipse XDB-C18 column (5  $\mu$ m, 150x4.6 mm) at 40 °C. The isocratic mobile phase consisted of 5 mM ammonium acetate:water:methanol (80:11:9, v/v/v) with a flow rate of 0.7 mL/min and a run time of 7.5 min. The MS analysis was performed using an electrospray ionization (ESI) interface ( $M+H^+=297$ ). The detection limit for DON was 40  $\mu$ g/L, and the quantification limit was 140  $\mu$ g/kg. The average recovery was 84.1 %.

### *DON exposure estimation*

Wheat products ingestion in Londrina – PR (Brazil) was evaluated applying a food Frequency Questionnaire (FFQ) to a random sample of 260 individuals, calculated from total of 447,000 inhabitants from Londrina. The sampling was calculated according Barbetta (2001). The FFQ was designed to collect semi-quantitative information on wheat products intake and information about individuals' profile. A commercial unity of French bread (50 g) or a portion of pasta (100 g) were used as portion size reference to facilitate products recall. Based on this portion size, subjects were asked to express the frequency of wheat products consumption: twice a day, once a day, five to six times a week, three to four times a week, once to twice a week, twice a month, eventually, or not consume. Age, height and weight status, place of birth, smoking and drinking habits were also asked to define the individuals' profile (data not shown). Estimated Daily Intake (EDI,  $\mu$ g/kg body weight/day) was calculated according the formula: Estimate of DON intake ( $\mu$ g/kg b.w./day)= DON concentration x Food intake / individual body weight (PACIN et al., 2010).

Data of bread and pasta contamination were obtained from the contamination evaluated for wheat grain. It was considered the ground to give flour with an extraction rate of about 70 %. Subsequent bread and pasta production was considered to absorb 60 and 30 % of water, respectively. Thus, DON contamination obtained from 76 samples from PR was evaluated, considering the values < detection limit as ½ detection limit (IPCS/GEMS, 1995).

### *Measurement uncertainty*

Measurement uncertainty is the variability associated to analytical results. For any analytical method, each result is reported as the best estimate for the sample and it is always qualified by a measurement uncertainty, e.g.  $x \mu\text{g/kg} \pm y \mu\text{g/kg}$  (SCUDAMORE et al., 2008). For this survey, the measurement uncertainty was calculated following the formula  $U_f = \sqrt{(DL/2)^2 + (a \times C)^2}$ , where  $U_f$  is the maximum standard uncertainty ( $\mu\text{g/kg}$ ); DL is the detection limit of the method ( $\mu\text{g/kg}$ );  $a$  is a constant, numeric factor to be used depending on the value of C; C is the concentration of interest ( $\mu\text{g/kg}$ ),

according Commission of the European Communities (2006). In the present work, 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  was selected as the concentration of interest, thus, the uncertainty associated to developed ic-ELISA is 227.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Therefore, the analytical result could be reported as mean  $\pm$  227.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

### *Statistical Analysis*

Level of DON in producers States and EDI according to the sex were compared by Student t-test. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, when appropriate, was utilized to evaluate difference among the regions of the States, among the crops, the wheat cultivars, the effect of wheat processing and EDI according categories of consumption and age. Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

### **Results and Discussion**

DON in naturally contaminated wheat samples was analyzed by ic-ELISA previously developed using anti-DON.3 mAb (*Capítulo 5.3*). Table 1 shows adequate mean recovery of DON in wheat grain, flour and kibbe (103.0 to 108.4 % range), but not in germ (26.9 %), indicating interference of different matrices of derived products. Commission of the European Communities (2006) recommends that the recovery of DON in foodstuffs should range from 60 to 120 %, and relative standard deviation (RSD) should be below 20 %. Therefore, the recovery in wheat grains ranging from 88 to 122 % (mean recovery of 108.43 %), with adequate RSD (11.68 to 16.06 %). Concerning wheat flour with 103.01 % of DON recovery, the RSD ranged within acceptable level with artificially contaminated at 1250-1750  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  level (19.0-21.5 %), but not at 350  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (36.2 %). Concerning kibbe and germ data, the application of ic-ELISA should be improved mainly at the extraction step, i.e. it was inefficient to remove the complex matrix interferences (Table 1) The high RSD data in kibbe samples (41.1 to 51.4 %) may be associated with processing, where the germinated wheat is cooked, parboiled or steamed, then the outer layers of bran are removed prior to ground into various sized grains (MIRANDA, 2006). The germination process increases the nutritional status of the grain, and further heat-processing can cause additional changes in matrix complexity. The germ samples also showed high RSD (23.2 to 31.8 %), but the low recovery data of 26.9 % (Table 1) definitively required reformulation in the protocol and re-test of the ic-ELISA using anti-DON.3 mAb. The germ is the core of the kernel, which is removed during the milling of white flour. It is characterized by high lipid content (8 %), as well as high vitamins and minerals content, especially vitamin E. The low recoveries of wheat germ can be improved changing the protocol extraction, adding a step of lipid removal, for example. Schneider et al. (2004) suggest DON extraction prior ELISA with pure water or neutral buffer solutions, to avoid sample matrix problems arising from co-extracted fat.

**Table 1:** Recovery of deoxynivalenol (DON) in different wheat matrices by ic-ELISA using anti-DON.3 mAb.

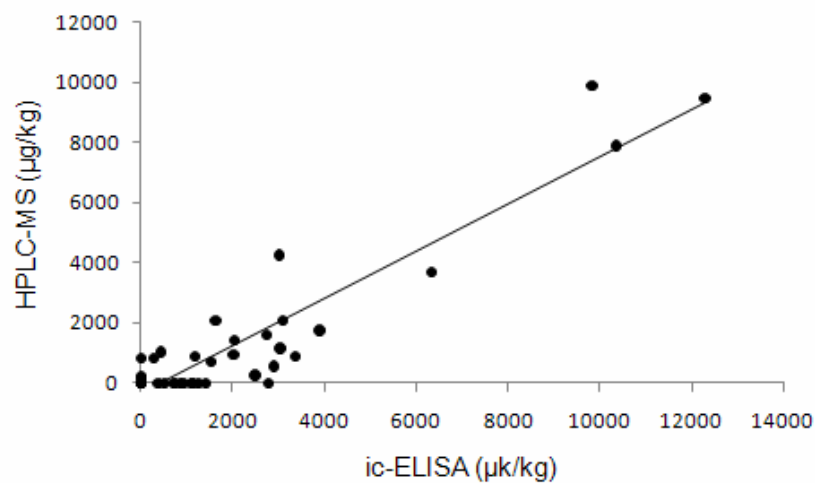
Sample	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Recovery (%)	RSD (%)	Mean recovery (%)
	Added	Recovered <sup>a</sup>			
Wheat grains	350	310.4 $\pm$ 43.4	88.7	14.0	108.4 $\pm$ 40.0
	1250	1533.1 $\pm$ 246.2	122.6	16.1	
	1750	1994.1 $\pm$ 232.8	113.9	11.7	
Wheat flour	350	488.7 $\pm$ 176.7	139.3	36.2	103.0 $\pm$ 34.4
	1250	1238.1 $\pm$ 275.8	99.0	21.5	
	1750	1236.4 $\pm$ 234.8	70.6	19.0	
Wheat kibbe	350	347.2 $\pm$ 178.4	99.2	51.4	108.0 $\pm$ 24.9
	1250	1344.0 $\pm$ 664.8	107.5	50.0	
	1750	2028.0 $\pm$ 832.8	115.9	41.1	
Wheat germ	350	111.3 $\pm$ 16.4	31.8	14.8	26.9 $\pm$ 4.4
	1250	289.6 $\pm$ 44.5	23.2	44.5	
	1750	449.9 $\pm$ 79.4	25.7	17.6	

<sup>a</sup> Spiked with DON standard solution.

<sup>b</sup> Mean data of six determinations (duplicate spiking, triplicate analysis).

<sup>c</sup> Relative Standard Deviation should be < 20 % (Commission of the European Communities Reg. 401/2006).

The ic-ELISA and HPLC-MS correlation was 0.93, when 44 samples were analyzed for DON (37 wheat grain, 1 wheat flour, and 6 wheat kibbes, Figure 2). Immunoassay recorded higher levels of DON than HPLC-MS, indicating either recovery losses during sample preparation in HPLC-MS (clean up step) and/or food matrix effect during immunoassay (PESTKA et al., 1995). Fujii et al. (2006) also observed overestimation in ic-ELISA developed for ochratoxin A analysis in coffee

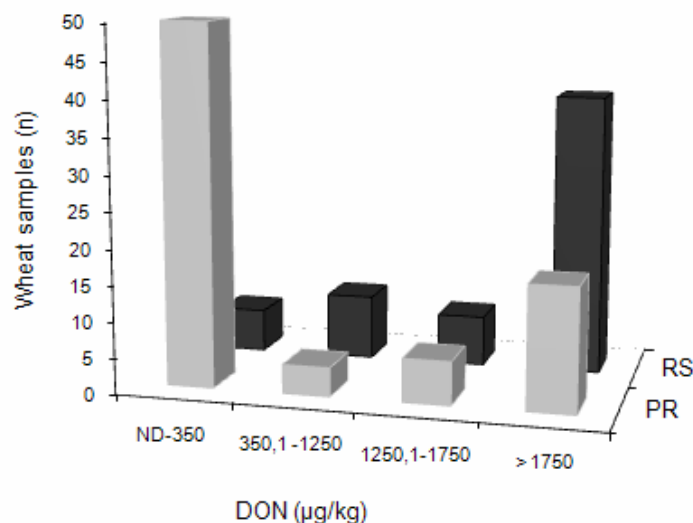


**Figure 2:** HPLC-MS and ic-ELISA correlation data for DON detection in 44 naturally contaminated wheat. The correlation coefficient (0.93) was calculated by linear regression equation  $y = 0.7863x - 319.02$ , and ic-ELISA/HPLC-MS ratio was 1.64.

Table 2 shows natural occurrence of DON in wheat grain by ic-ELISA in 136 wheat samples from the State of Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS). DON was detected in 67.6 % of samples produced in these main producer States, with minimum over positive samples of 206.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , maximum of 16076.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and mean of 2140.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . This frequency was lower than 85 % detected in Argentina (GONZÁLEZ et al., 2008). Levels reported in the present work were dramatically lower to those obtained by Bensassi et al. (2010) in wheat from Tunisia (7,200 to 54,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 83 % positivity). Muthomi et al. (2008) detected lower levels of DON contamination in Kenia (105 to 303  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 67 % positivity), a Tropical country, where the fungus is supposed to not grow well. Pinto et al. (2008) detected levels ranging from 300 to 70,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in Argentina.

PR samples (mean= 845.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) showed lower levels of DON (Table 2) when compared with RS (4460.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ( $p < 0.05$ , Student t Test). Among the regions, a significant difference was detected ( $p < 0.05$ , Tukey's Test), North-Western RS presented the higher levels (4946.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 84.8 % positivity), while Central PR the lower (80.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 25 % positivity). All samples from the South-Western RS were positive for DON (3374.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The differences among the regions can be due to differences in rainfall levels during the crop (May to October in Rio Grande do Sul, and April to September in Paraná). It was observed a tendency of difference between the rainfall in North-Western RS (1032 mm, 3 crops mean) versus Northern (430 mm,  $p = 0.06$ ) and Central PR (474 mm,  $p = 0.08$ ). As shown in Figure 3, levels of DON in PR samples situated in lower levels ( $< 350$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) while majority of samples from RS are situated in upper levels ( $> 1750$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Maximum level of DON recommended by Commission of the European Communities (2005) for unprocessed durum wheat is settled at 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Considering this value, 80 samples (58.8 %) were safe to human consume. Considering cereal flour, the advisory level is 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , and only one wheat flour sample (12.5 %) exceeded this value.



**Figure 3:** Deoxynivalenol (DON) levels in wheat samples of the State of Paraná (n= 76) and Rio Grande do Sul (n= 60) (2006, 2007 and 2008 crops).



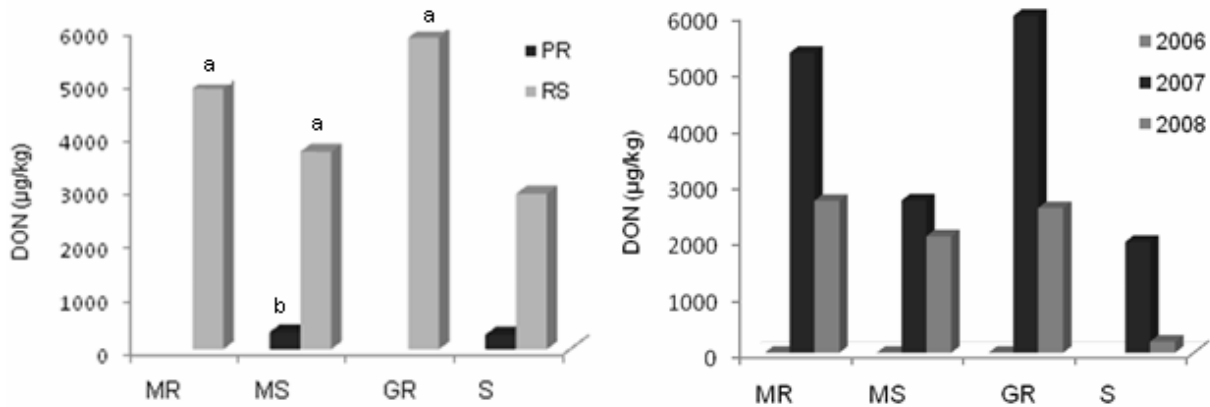
**Table 2:** Deoxynivalenol levels in wheat grain by ic-ELISA from Paraná and Rio Grande do Sul States, Brazil (2006, 2007 and 2008 crops).

State	Region	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					Rainfall (mm)*
		Samples		Positive samples			
		n	Mean	n	Mean	Range	
<b>Paraná</b>	Northern	40	556.4 <sup>b,c</sup>	12	1854.5	222.6 – 4262.4	430
	South-Western	32	1329.5 <sup>c</sup>	25	1701.7	206.3 – 4651.3	831
	Central	4	80.1 <sup>b,c</sup>	1	320.5	320.5 – 320.5	474
	<i>Total</i>	76	845.7	38	1713.6	206.3 – 4651.3	578.3
<b>Rio Grande do Sul</b>	North-Western	33	4946.7 <sup>a</sup>	28	5830.0	715.2 – 16076.5	1032
	North-Eastern	23	2139.7 <sup>b,c</sup>	22	2236.9	273.4 – 7263.8	836
	South-Western	4	3374.0 <sup>a,b,c</sup>	4	3374.0	2052.5 – 5317.2	766
	<i>Total</i>	60	3829.6	56	4184.2	273.4 – 16076.5	878
<b>Total</b>		<b>136</b>	2140.2	<b>92</b>	<b>3163.8</b>	<b>206.3 – 16076.5</b>	<b>728.1</b>

Values within the same column that have no common superscript are significantly different by Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

\* Mean rainfall data considering the months from planting to harvesting period (May to October in RS, and April to September in PR), 2006, 2007 and 2008 crops.

Seventy two samples with identified cultivar belonged to 23 types, which differed according *Fusarium* Head Blight (FHB) susceptibility: susceptible (*S*, 12 samples), moderately susceptible (*MS*, 35), moderately resistant (*MR*, 15) and good resistance (*GR*, 8). Any statistical difference in DON contamination was observed, as DON mean level in *S* cultivar was 1527.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 2232.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in *MS*, 3910.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in *MR*, and 4382.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in *GR*. However, the evaluation according the State origin indicated lower DON level in cultivar *MS* of PR State (22.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), when compared with samples of RS State (*MS*= 3705.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , *MR*= 4887.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , *GR*= 5008.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $p < 0.05$ ), as shown in Figure 4. Intercultivar differences in susceptibility to FHB have been reported by authors who have attempted to find a source of resistance. In Argentina, Lori et al. (2009) detected differences in FHB values in cultivars Buck Ponto and Buck Brasil in the second year of study. The difference could be due to the fact that B. Ponto cultivar reached anthesis earlier than B. Brasil, and during this period, there was constant rainfall. The authors also observed differences in DON content (B. Pronto= 15600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and B. Brasil= 8400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). However, also in Argentina, González et al. (2008) observed that the wheat cultivars studied did not influence significantly the DON level contamination.



**Figure 4:** Deoxynivalenol levels in wheat according to cultivar (MR= moderately resistente, MS= moderately susceptible, GR= good overall resistance, S= susceptible). (A) DON levels in different cultivars from Paraná and Rio Grande do Sul State. (B) DON levels in different cultivars from 2006, 2007 e 2008 crops. Different superscript are significantly different by Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

Regard DON levels in the latest three crops (Table 3), 2007 and 2008 crops from Rio Grande do Sul presented the higher levels of DON (3865.1 and 3603.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively). 2006 crop from Paraná presented the lowest levels (ND). Climatic data from these regions can explain the differences observed. The accumulate rainfall data from the months from May to October in Rio Grande do Sul State in 2007 was around 1000 mm, with mean temperature 15.5  $^{\circ}\text{C}$ . In Paraná, from April to September, rainfall ranged from 430.9 to 701.0 mm for 2006 and 2008 crops, respectively, and mean temperature 18.6  $^{\circ}\text{C}$ .

Table 4 shows previous results on DON levels over the wheat processing in a flour-mill. Wheat grain (raw material) exhibited the higher levels of DON (1056.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $p < 0.05$ , Tukey's Test) along wheat processing. DON level in moist wheat, after cleaning for extraneous material remotion, decreases DON in 3.3-fold, and DON levels in flour decreases in 5.7-fold. It was observed that DON remains in flour, not being detected in germ or bran portions. Despite not detected levels in germ and bran, it is worth reminded that extraction of germ was not efficient, and methodology for bran was not validated until this moment. Improvements and further analysis are necessary to better understand the behavior of DON in wheat processing. Besides, the few samples analyzed are not representative of total wheat processed in the mill.

**Table 3:** Deoxynivalenol (DON) levels in wheat by ic-ELISA from Paraná and Rio Grande do Sul States, Brazil in 2006, 2007 and 2008 crops.

State	Crop	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					Rainfall* (mm)	T* ( $^{\circ}\text{C}$ )
		Total samples		Positive samples				
		n	Mean	n	Mean	Range		
Paraná	2006	8	ND <sup>b</sup>	0	ND	ND	430.9	18.6
	2007	8	27.8 <sup>b</sup>	1	222.6	222.6 – 222.6	504.7	19.0
	2008	60	1076.3 <sup>b</sup>	37	1753.9	206.3 – 4651.3	701.0	18.4
	<i>Total</i>	76	845.7	38	1713.6	206.3 – 4651.3	545.5	18.6 <sup>a</sup>
Rio Grande do Sul	2006	0	NE		NE	NE	623.2	16.7
	2007	51	3865.1 <sup>a</sup>	46	4285.2	273.4 – 16076.5	1034.1	15.5
	2008	8	3603.6 <sup>a</sup>	8	3603.6	2019.5 – 6325.4	979.6	15.6
	<i>Total</i>	60	4460.5	54	4858.7	273.4 – 16076.5	878.9	15.9 <sup>b</sup>
<b>Total</b>		<b>136</b>	<b>2140.2</b>	<b>92</b>	<b>3163.78</b>	<b>206.3 – 16076.5</b>	<b>712.2</b>	<b>17.2</b>

Values within the same row that have no common superscript are significantly different by Tukey's Test ( $p < 0.05$ )

ND= not detected ( $<$  Detection Limit, 177.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). NE= not evaluated

\* Mean rainfall and Temperature data considering the months from planting to harvesting period (May to October in RS, and April to September in PR).

Schollenberger et al. (2005) analyzed 5 wheat germ and 5 wheat bran from Germany and detected DON in all samples, ranging from 31 to 95  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to germ and 319 to 389  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to bran. Lamardo et al. (2006) also find lower levels of DON in wheat flour (82 to 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) when compared to wheat grain (166 to 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in samples commercialized in São Paulo, Brazil. Visconti et al. (2004) evaluated the reduction of DON during durum wheat processing and spaghetti cooking. They observed a consistent reduction of DON during the processing steps from uncleaned durum wheat to cooked spaghetti. After cleaning step, DON levels dropped 33 %, while increased 59 % in bran fraction. Neira et al. (1997) observed reduction of DON contamination with the increase of baking time on DON-contaminated products, as well as percentage of DON reduction increases with the initial level of DON contamination. Thus, previous works point out for the effect of wheat processing on DON levels.

Milling usually resulted in a higher concentration of DON in outer parts of kernel. Distribution of DON in the various milling fractions of wheat depends to a large extent on the degree of fungal penetration of the endosperm (NOWICKI et al., 1988), i.e., milling grain in which the DON contamination is located predominantly at the surface of the kernel would result in flour with a low DON concentration. Trigo-Stockli et al. (1996) observed highest levels of DON in bran (3400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) when compared to whole wheat (2800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and flour (1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), the high level of toxin in the bran may be attributed to the prevalence of the *F. graminearum* in the aleurone and pericarp tissues.

**Table 4:** Effect of wheat processing in deoxynivalenol levels in wheat and wheat products.

Sample type	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	Total samples		Positive samples		
	N	Mean	N	Mean	Range
<b>Wheat grain</b>	20	1056.2 <sup>a</sup>	8	2640.5	1154.9 - 4262.4
<b>Clean wheat</b>	2	1271.8 <sup>b</sup>	2	1271.8	1126.3 – 1417.2
<b>Moist wheat</b>	6	319.3 <sup>b</sup>	3	638.7	221.3 – 930.2
<b>Flour</b>	8	184.0 <sup>b</sup>	3	353.8	253.0 – 865.1
<b>Germ</b>	4	ND <sup>b</sup>	0	ND	ND
<b>Bran</b>	4	ND <sup>b</sup>	0	ND	ND

Values within the same raw that have no common superscript are significantly different by Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

ND= not detected ( $<$  Detection Limit, 177.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Wheat kibbe DON contamination is shown in Table 5. Levels ranged from not detected to 507.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mean 166.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . No difference was observed among the regions of sample

collection ( $p>0.05$ ). None sample exhibited a value of DON superior than maximum recommended by Commission of the European Communities (2005).

**Table 5:** Deoxynivalenol in wheat kibbe/bulgur samples determined by ic-ELISA.

	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	Total samples		Positive samples		
	n	Mean	n	Mean	Range
<b>Western</b>	4	269.9	3	359.8	237.9 – 450.5
<b>South-Western</b>	4	196.4	2	392.8	339.4 – 446.1
<b>North</b>	8	193.6	4	387.2	216.2 – 507.1
<b>North-Western</b>	2	ND	0	ND	ND
<b>South</b>	1	ND	0	ND	ND
<b>South-Eastern</b>	1	ND	0	ND	ND
<b>Central</b>	2	120.1	1	240.2	240.2 – 240.2
<b>Total</b>	22	166.1	10	365.4	216.2 – 507.1

ND= not detected (< Detection Limit, 177.12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

The consumption of wheat products by individuals in Londrina, PR, Brazil ( $n = 260$ ; age = 31.2, 8–76 years; height = 1.67, 1.32–1.94 m; weight = 65, 32–120 kg) was surveyed. Among the surveyed individuals 91.3 % and 89.2 % consumed pasta and bread at least once a month, respectively. Londrina inhabitants consumed 21.4 g and 39.3 g of pasta and bread per day, respectively. Determination of the exposure degree is one of the most important parameters of the risk assessment of chemical compounds. The Estimated Daily Intake (EDI) of DON from pasta and bread (Table 6) was calculated from the average concentration of DON in wheat grain, considering a factor of processing (1.10 for pasta and 0.89 for bread), the consumption of wheat products, and the individual body weight of the surveyed persons.

It was decided to use the NOAEL (0.1 mg/kg b.w./day) of the chronic dietary study with mice with the application of an uncertainty factor of 100. A Provisional Tolerable Daily Maximum Intake (PTDMI) of 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w. was derived. The PTDMI is made temporary because it is noted that DON belongs to the group of several trichothecenes with a common basic chemical structure which are produced by *Fusarium* fungi (e.g. T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol). According to present knowledge they also share common mechanisms of toxic action (OPINION ON FUSARIUM TOXINS, 1999).

Levels of DON in wheat were calculated according to the suggestion of the IPCS/GEMS criteria adopted to estimate the trichothecene contamination when values less than the DL are observed. The criteria are as following: When all observations are over the DL then the true mean is calculated; when the proportion of observations less than DL is lower than or equal to 60%, the mean is calculated replacing those observations by DL/2 and when the proportion is

over 60%, two estimates are informed: one obtained replacing those observations by 0 and the other replacing them by DL. In present study, lower than 60 % of observations were less than DL, the mean was calculated replacing those observations by DL/2. Evaluating DON contamination of samples from Paraná, the EDI in Londrina was 0.50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w./day regard bread consumption and 0.33  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w./day regard pasta consumption (Table 6). Considering EDI by the two foodstuffs investigated, the mean value was 0.82  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , amounting to 82 % of the PTMDI, ranging from zero to 4.23  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w./day, 175 individuals (67.3 %) are within PTMDI.

**Table 6:** Chronic dietary exposure assesment of deoxynivalenol in Londrina, PR, Brazil from the consumption of wheat-based products.

Source	Estimated daily intake ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day)		
	Bread	Pasta	TEDI
Mean	0.50 (0.00 – 2.48)	0.33 (0.00 – 3.01)	0.82 (0.00 – 4.23)
Gender			
Male	0.45 <sup>A</sup> (0.00 – 1.80)	0.36 <sup>A</sup> (0.00 – 3.01)	0.80 <sup>A</sup> (0.00 – 4.23)
Female	0.52 <sup>A</sup> (0.00 – 2.48)	0.32 <sup>A</sup> (0.00 – 1.96)	0.83 <sup>A</sup> (0.00 – 2.75)
Consume*			
HC	1.34 <sup>a</sup> (0.83 – 2.48)	2.35 <sup>a</sup> (1.63 – 3.01)	
MC	0.56 <sup>b</sup> (0.21 – 1.02)	1.33 <sup>b</sup> (0.83 – 1.96)	
LC	0.11 <sup>c</sup> (0.01 – 0.18)	0.30 <sup>c</sup> (0.03 – 1.26)	
Age			
<20	0.60 <sup>a</sup> (0.00 – 2.48)	0.37 <sup>a</sup> (0.00 – 3.01)	0.97 <sup>a</sup> (0.00 – 4.23)
21-30	0.45 <sup>a,b</sup> (0.00 – 1.93)	0.35 <sup>a</sup> (0.00 – 1.63)	0.80 <sup>a</sup> (0.00 – 2.47)
31-40	0.65 <sup>a</sup> (0.00 – 1.52)	0.24 <sup>a</sup> (0.00 – 0.79)	0.88 <sup>a</sup> (0.09 – 1.73)
41-50	0.46 <sup>a,b</sup> (0.00 – 1.80)	0.29 <sup>a</sup> (0.00 – 1.36)	0.73 <sup>a</sup> (0.00 – 2.28)
>51	0.32 <sup>b</sup> (0.00 – 1.32)	0.36 <sup>a</sup> (0.00 – 2.42)	0.67 <sup>a</sup> (0.03 – 2.42)

\* Individuals were divided into categories according their consumption of bread and pasta. HG= High Consumers (indicated ingest the item twice a day; bread – 700 g/week; pasta 1400 g/week); MC= Medium Consumers (indicated ingest bread between 175 and 350 g/week and pasta between 550 and 700 g/week); LC= Low Consumers (indicated ingest bread between 12.5 and 75 g/week and pasta between 25 and 350 g/week).

Values within the same column that have no common superscript are significantly different by Student t Test or Tukey's Test ( $p < 0.05$ ).

TEDI= Total Estimated Daily Intake

Analyzing EDI by male (1.92 g/kg b.w./day) and female (2.00 µg/kg b.w./day), no statistical difference was observed ( $p>0.05$ , Table 6). EDI from high consumers of bread (3.21 µg/kg b.w./day) and pasta (5.66 µg/kg b.w./day) was higher than medium (bread= 1.34 µg/kg b.w./day, pasta= 3.21 µg/kg b.w./day) and low consumers (bread= 0.26 µg/kg b.w./day, pasta= 0.73 µg/kg b.w./day, Table 6). When EDI was analyzed by different age groups, individuals < 20 years old (1.44 µg/kg b.w./day) and between 31 and 40 years old (1.55 µg/kg b.w./day) presented higher EDI from bread than others groups ( $p<0.05$ ). EDI from pasta (0.58 to 0.90 µg/kg b.w./day) and total EDI (1.60 to 2.34 µg/kg b.w./day) not presented differences with respect to the age groups (Table 6).

In United Kingdom, Turner et al. (2008) detected DON in 296 of 300 (98.7 %) urine samples. Wholemeal bread was associated with the greatest percent increase in urinary DON per unit of consumption, but white bread contributed approximately twice as much as wholemeal bread to the urinary DON levels because it was consumed in higher amounts. Schothorst and Egmond (2004) affirmed that wheat and wheat containing products represent the major source of intake for DON and other trichothecenes.

### **Conclusion**

This study provides information on deoxynivalenol present on wheat in the main production areas in Brazil during 2006, 2007 and 2008 crops. As natural and unavoidable contaminants of important agricultural commodities, DON has severely impact human and animal health. The risk is well recognized, but at present it has not been quantified accurately. Exposure assessment can be a valuable tool in assessing risk to humans from mycotoxins in the food chain.

DON contamination from ND to 16076.5 µg/kg in DON grains samples for human consumption was found in 67.6 % of the samples analyzed in the States of Paraná and Rio Grande do Sul, Brazil, and 22.3 % of samples from Paraná and 63.3 % from Rio Grande do Sul were contaminated with DON levels > 1750 g/kg, the maximum limit suggested to be safe for wheat destined for human consumption. DON levels in these samples are a matter of concern, since the acute effects on human health are known. It is important analyze that the reduction of mycotoxin contamination is at the field level prior to the harvesting of grain. An important level of DON reduction occurs during wheat processing, that account for 30 % in flour relative to the uncleaned wheat. Majority of population studied consumes safe levels of DON through bread and pasta intake.

Levels of DON detected in the present work are target of concern, once wheat products are extensively consumed by local population. Otherwise, levels of DON in wheat products used to be lower than in wheat grains, and should be broad analyzed in further investigation.

#### 5.4 DESOXINIVALENOL: MONITORAMENTO E PERIGO DE EXPOSIÇÃO POR TRIGO E PRODUTOS DERIVADOS EM LONDRINA-PR, BRASIL

Joice Sifuentes dos SANTOS, Tatiane Martins de OLIVEIRA, Jayme Toledo PIZA FILHO, Elisabete Hiromi HASHIMOTO, Manuel Carlos BASSOI, João Leonardo PIRES, Martha Zavariz MIRANDA, Sandra GARCIA, Elisabete Yurie Sataque ONO, Osamu KAWAMURA, Elisa Yoko HIROOKA. Artigo submetido à revista **Semina Ciências Agrárias**.

##### Resumo

O trigo é um dos alimentos mais consumidos na dieta humana, contribuindo com 20 % de calorias diárias. Considerando a predominância de *Fusarium graminearum* neste grão, a contaminação por desoxinivalenol (DON) foi avaliada em trigo dos Estados do Paraná (n= 21) e Rio Grande do Sul (n= 15), assim como estimou-se o risco da sua ingestão diária no município de Londrina-PR, Brasil. Utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, DON foi detectado em 72,2 % das amostras, variando de não detectável a 1592,2 µg/kg, nível médio 321,6 µg/kg (limite de quantificação= 87,7 µg/kg). Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos foi aplicado a 260 indivíduos (8-76 anos, 64,8 % do gênero feminino e 35,2 % do masculino) para calcular a Ingestão Diária Estimada (IDE) de DON. Macarrão (151 g/semana) e pão francês (267 g/semana) foram os derivados mais consumidos, e baseado nesses alimentos, a IDE média de DON foi de 0,31 µg/kg peso corporal/dia, sendo que dois indivíduos apresentaram IDE (1,03 e 1,58 µg/kg p.c./dia) superior a Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória (IDMTP) recomendada de 1 µg/kg p.c./dia. A importância de contínuo monitoramento da exposição a DON é evidente, devendo-se regulamentar os níveis máximos em trigo no Brasil.

**Palavras-chave:** consumo de trigo, exposição estimada, desoxinivalenol.

##### Abstract

Wheat comprises one of the main ingredients in human diet, accounting approximately 20 % of daily calories. Concerning the predominant frequency of deoxynivalenol (DON) producing *Fusarium graminearum* in wheat, DON occurrence in the state of Paraná (n=21) and Rio Grande do Sul (n=15) samples, as well as the risk assessment of daily intake of DON in Londrina-PR, Brazil were evaluated. DON was detected in 72.2 % samples by high performance liquid chromatography (HPLC), which ranged from non-detectable to 1,592.2 µg/kg, with average of 321.6 µg/kg (limit of quantification= 87.7 µg/kg). A total of 260 persons (64.8 % female and 35.2 % male, from 8 to 76 years-old) were interviewed, using a Food Frequency



Questionnaire to calculate the estimated daily intake (EDI) of DON. Pasta (151 g/week) and bread (267 g/week) were the main food ingested, and based on these foods, the average estimated daily intake (EDI) of DON was 0.31 µg/kg body weight/day. This EDI was lower than Provisional Tolerable Daily Maximum Intake settled in 1 µg/kg b.w./day, although two persons showed estimated DON ingestion of 1.03 and 1.58 µg/kg b.w./day. The data evidences the importance of continuous monitoring and risk assessment targeted on DON exposure, and guideline should be established in wheat in Brazil.

**keywords:** wheat intake, estimated exposure, deoxynivalenol.

### **Introdução**

O trigo (*Triticum aestivum* L.) ocupa 20 % da área mundial cultivada, com produção anual de 500 milhões de toneladas. A produção nacional de trigo atingiu 6 milhões de toneladas na safra de 2008, sendo 53 % produzido pelo Estado do Paraná, seguido pelo Rio Grande do Sul (30 %). No entanto, o consumo interno de 10 milhões de toneladas ainda requer importação do produto (IBGE, 2009). Este cereal contribui com 20 % das calorias diárias, além de fornecer proteínas de alto valor biológico e carboidratos complexos (amido e fibras), bem como vitaminas do complexo B e ferro.

*Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Giberella zeae* Shw.) causa giberela ou fusariose, doença de ampla ocorrência em trigo, cuja produção de desoxinivalenol (DON ou vomitoxina) em nível de campo depende de condição climática, práticas agrícolas e susceptibilidade de cultivar. DON é tricoteceno do grupo B, que além de dupla ligação nas posições C<sub>9,10</sub> e um anel epóxido na posição 12,13, caracteriza-se por carbonila no C<sub>8</sub>. A exposição a DON pode desencadear vômito, perda de peso, dores abdominais, diarreia e imunossupressão, é classificado pela *International Agency for Research on Cancer* no Grupo 3, i.e., não carcinogênico para humanos (IARC, 1993).

A literatura aponta diversas patologias relacionadas ao consumo de cereais contaminados por *Fusarium* spp, desde leucemia tóxica alimentar (*alimentary toxic aleukia*) na Rússia (STEYN, 1995) a puberdade precoce, câncer cervical e hiperplasias (BRIONES-REYES et al., 2007). No Brasil, os escassos trabalhos limitam-se à ocorrência de tricotecenos em trigo e derivados (CALORI-DOMINGUES et al., 2007; LAMARDO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002).

Salienta-se que DON tem sido toxina de *Fusarium* spp. mais frequentemente reportada no mundo, assim como detectada em maior concentração, sendo considerada como “indicadora” de contaminação por este fitopatógeno (PRANGE et al., 2005).

Micotoxinas constituem toxinas naturais de ocorrência inevitável em alimentos, apontada pela avaliação de risco (*risk assessment*) como perigo crônico na dieta, somando-se a

contaminantes sintéticos, aditivos alimentares e resíduos de pesticidas. A avaliação de risco e exposição estimada são importantes ferramentas para avaliar os riscos de micotoxinas na cadeia alimentar a humanos e a animais, devido ao efeito dependente da dose consumida, toxicidade do composto, peso corporal e condição física do indivíduo, além da presença de outras micotoxinas e fator dietético, capazes de aumentar ou diminuir sua toxicidade (KUIPER-GOODMAN, 1988).

No presente trabalho procedeu-se avaliação preliminar de DON em trigo com enfoque aos dois principais Estados produtores, Paraná e Rio Grande do Sul, bem como estimou-se a exposição a DON através do consumo de derivados de trigo em amostra populacional de Londrina-PR.

## **Material e Métodos**

### *Amostragem*

Um total de 36 amostras de trigo em grão (*Triticum aestivum* L.) foram coletadas nas regiões Norte (Londrina e Sertanópolis, entre 23°19' e 23°50' de Latitude Sul e entre 21°22' e 51°30' de Longitude Oeste) e Sudoeste do Paraná (Dois Vizinhos, 25°45' S e 53°03' O), além de Noroeste (Passo Fundo e Três de Maio, entre 27°46' e 28°30' O e entre 54°14' e 50°53' O) e Nordeste do Rio Grande do Sul (Vacaria, 28°30' S e 50°56' O). As 15 amostras de Norte Paranaense pertenceram a safras 2006, 2007 e 2008, cultivadas em campos experimentais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Unidade Londrina (EMBRAPA – CNPSo, 11 amostras) e fornecidas por Empresa processadora de trigo de Sertanópolis (4 amostras). Seis amostras recém-colhidas de Sudoeste (safra 2008) foram adquiridas na Cooperativa armazenadora de grãos. As amostras do Rio Grande do Sul consistiram de 7 amostras cultivadas na região Noroeste e 8 na região Nordeste (safras 2006, 2007 e 2008), pertencentes a campos experimentais da EMBRAPA Unidade Passo Fundo – CNPT. A amostra (500 g) foi quarteada e, 100 g trituradas a 20 *mesh*, acondicionadas em frasco plástico e mantidas a -20 °C até a determinação. As contra-amostras foram armazenadas a 4 °C.

### *Determinação de desoxinivalenol*

DON com 98 % de pureza (Sigma, St Louis, Estados Unidos) foi suspenso em acetato de etila e quantificado a 260 nm, empregando absorvidade molar de 1410 (UV-VIS Cintra 20, GMB, Melbourne, Austrália), conforme preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Quinze gramas de amostra foram adicionadas de 3 g de NaCl e 120 mL de água ultrapura (Purelab Elga, Lane End, Inglaterra), agitadas a 150 r.p.m. por 30 min (Marconi, Piracicaba, Brasil) e filtrada em filtro de papel, seguida de microfibras (GF/C poro 1,2 µm, Whatman, Maistone, Inglaterra). Coluna de imunoafinidade (Dontest®, Vicam, Watertown,

Estados Unidos) foi utilizada para pré-limpeza de 2 mL do extrato, lavada com 20 mL de água ultrapura, seca e o eluato obtido com 2 mL de metanol (grau HPLC, J. T. Baker, Xalostoc, México) e seco sob fluxo de N<sub>2</sub> a 40 °C. A película foi ressuspensa em 300 µL de fase móvel (metanol:água, 30:70, v/v) e 20 µL analisados em duplicata em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (LC-10AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) dotado de coluna nucleosil 100 C18 (5 µm; 250 x 4 mm; Merck, Darmstadt, Alemanha) sob fluxo de 0,7 mL/min e detector de arranjo de fotodiodo (PDA) na faixa entre 180 e 400 nm (SPD-10A UV/VIS, Shimadzu, Kyoto, Japão), sendo o comprimento de onda de absorção máxima 220 nm.

A curva de calibração foi confeccionada nas concentrações de 250, 500, 750, 1000 e 1500 ng/mL em metanol:água (30:70, v/v), correspondente a níveis entre 150 e 1800 µg/kg de DON em trigo. Trigo artificialmente contaminado com 250, 500, 750 e 1000 µg/kg de DON apresentou recuperação média de 75,4 % (faixa de 53,1 a 118,7 %). Os limites de detecção (LD= 0,28 µg/kg, correspondente a 3xDP) e quantificação (LQ= 87,7 µg/kg, 10xDP) foram calculados baseados em branco da amostra. Valores inferiores ao LQ foram considerados como zero e incluídos nos cálculos.

Todos os procedimentos envolvidos foram conduzidos conforme protocolo de segurança e descontaminação descritos para análise de micotoxinas (IAL, 2008).

#### *Análise bromatológica*

A composição química, determinada em porcentagem, consistiu de umidade (g %) e proteínas, lipídios e resíduos minerais em base seca (g %), conforme descrito em Normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). A porcentagem de carboidratos em base seca (g %) foi obtida por diferença.

#### *Avaliação da frequência do consumo de produtos a base de trigo*

O consumo de produtos a base de trigo no município de Londrina-PR foi avaliada, aplicando Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos (QFCA) a 260 indivíduos. Além de informação sobre o consumo, também foram coletados dados como sexo, peso, altura, entre outros. A quantidade ingerida foi determinada baseada na porção alimentar por medida caseira para cada produto (ANVISA, 2003) e frequência de consumo (“não consumo”, “eventualmente”, “cada 15 dias”, “1-2 vezes/semana”, “3-4 vezes/semana”, “5-6 vezes/semana”, “1 vez/dia” e “2 vezes/dia”).

#### *Exposição estimada a DON*

O cálculo de Ingestão Diária Estimada (IDE) requer informação perante contaminação e consumo do alimento. Portanto, níveis de DON em trigo obtidos neste monitoramento foram

associados aos resultados do QFCA, para determinar o consumo local de produtos à base de trigo. Valores de DON em trigo abaixo do LQ foram assumidos como  $\frac{1}{2}$  LQ para o cálculo de IDE (IPCS/GEMS, 1995). Considerando a quantificação de DON em grãos de trigo, para o cálculo de provável nível em farinha incorporou-se o fator de processamento de 70 % (extração de farinha a partir de trigo *in natura*). Neste valor obtido, para panificação assumiu-se adição de 60 % de peso devido à absorção de água e outros ingredientes, i.e. 100 g de grão transformado em 112 g de pão. Para a produção de macarrão assumiu-se o valor de 30 % de peso adicional, i.e. 100 g de grão transformado em 91 g de macarrão. A IDE individual foi calculada excluindo os indivíduos que não informaram peso, bem como dados sobre quantidade consumida, segundo a fórmula:

$$\text{IDE } (\mu\text{g/kg peso corporal/dia}) = \frac{\text{DON em trigo } (\mu\text{g/kg}) \times \text{consumo do alimento } (\text{kg/dia})}{\text{peso do indivíduo } (\text{kg})}$$

#### *Análise estatística*

O nível de DON nos Estados produtores foi comparada utilizando teste t de Student. A análise de variância seguida de teste de Tukey foi utilizada para avaliar a diferença entre as regiões dos dois Estados e no peso e Ingestão Diária Estimada de DON a partir de pão francês e macarrão, considerando as categorias de idade dos consumidores. A análise foi realizada empregando o programa Statistica versão 6.0 (Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos).

#### **Resultados e Discussão**

Empregando trigo artificialmente contaminado com DON, a coluna CIA Dontest® (Vicam) atingiu recuperação média de 75,4 %. Os valores variaram dependendo de nível adicionado, com menor recuperação em maiores teores (250  $\mu\text{g/kg}$ , recuperação de 118 %; acima de 750  $\mu\text{g/kg}$ , recuperação de 55 %), provavelmente pela saturação de anticorpo imobilizado na CIA com analito, indicando necessidade de aumentar o fator de diluição antes da aplicação na coluna. Klötzel et al. (2005) obtiveram recuperação de DON entre 27 e 95 % com coluna Vicam e entre 95 e 98 % com DONPrep (R-Biopharm Rhone, Darmstadt, Alemanha), atribuindo diferença ao menor volume e diâmetro interno da coluna Vicam.

Conforme a Tabela 1, a umidade nas amostras de trigo analisadas variou entre 10,5 a 14,2 g %, com oito amostras apresentando nível superior a 13 %, recomendado para conservação e empacotamento (BRASIL, 2001). Cinzas, proteínas, extrato etéreo e carboidratos apresentaram-se consistentes com a literatura (FUJITA; FIGUEROA, 2003), não ocorrendo correlação entre níveis de DON e composição bromatológica de trigo ( $p > 0,05$ ). Ono et al. (2006) também não observaram correlação entre os níveis de fumonisinas e conteúdo protéico e lipídico de milho paranaense. Todavia, Vieira et al. (1999) procedendo análise de contrastes, obtiveram

correlação entre umidade e cinzas com níveis de aflatoxina, ocratoxina e zearalenona em farinha de trigo do Rio Grande do Sul. Conforme a Tabela 1, o teor de cinzas do trigo paranaense apresentou-se superior ao riograndense ( $p < 0,05$ ), podendo a diferença ser atribuída a fatores como cultivar, condições climáticas e solo.

**Tabela 1:** Composição bromatológica de trigo cultivado nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul (safra de 2006, 2007 e 2008).

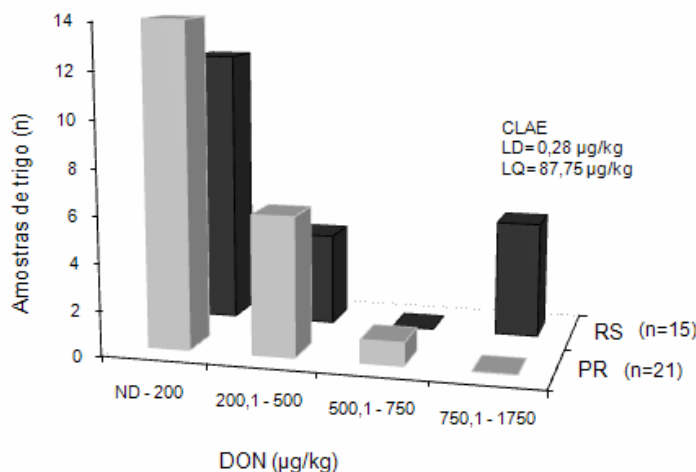
Composição (g % *)	Localidade			
	Paraná (n= 21)		Rio Grande do Sul (n= 15)	
	Média	Faixa	Média	Faixa
Umidade	12,5 <sup>a</sup>	10,5 – 14,2	12,9 <sup>a</sup>	11,4 – 14,2
Cinzas*	1,4 <sup>a</sup>	1,2 – 1,74	1,2 <sup>b</sup>	0,8 – 1,6
Proteínas*	11,4 <sup>a</sup>	5,2 – 15,5	10,9 <sup>a</sup>	8,9 – 12,2
Extrato etéreo*	1,3 <sup>a</sup>	0,7 – 2,2	1,3 <sup>a</sup>	0,9 – 2,3
Carboidratos*	73,4 <sup>a</sup>	66,8 – 81,0	73,7 <sup>a</sup>	71,3 – 75,7

\* em base seca.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa segundo o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 2 avalia DON em trigo cultivado nos dois principais Estados produtores do Brasil. Dez amostras (27,8 %) exibiram contaminação inferior ao limite de quantificação (87,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Houve diferença nos níveis de DON entre os dois Estados, sendo o nível médio de DON nas amostras do Paraná 163,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e do Rio Grande do Sul 543,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0,05$ ). As amostras de trigo provenientes da região Nordeste do Rio Grande do Sul apresentaram contaminação média de 741,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , enquanto região Noroeste apresentou 317,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , superior aos valores detectados na região Norte (195,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e Sudoeste (90,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) do Paraná ( $p < 0,05$ ). A contaminação de DON em 95,2 % em trigo cultivado no Paraná situaram-se entre 0 e 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , enquanto aproximadamente 35 % das amostras do Rio Grande do Sul apresentaram-se entre 750,1 e 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 1). Este resultado ocorreu devido à condição climática do Estado Gaúcho, com maior índice pluviométrico e temperaturas mais baixas (1032,7 mm, 14,5 °C, média dos anos 2006, 2007 e 2008, nos meses de maio a outubro, quando as amostras foram coletadas), se comparado ao Paraná (581,4 mm, 17,8 °C, média dos anos 2006, 2007 e 2008, nos meses de abril a setembro), favorecendo a multiplicação de *F. graminearum* e conseqüente produção de fusariotoxinas. Outrossim, estes valores foram inferiores ao limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia para cereais não-processados de 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para trigo e aveia (COMUNIDADE EUROPÉIA, 2007). A Legislação brasileira e o Mercosul ainda não determinaram limite máximo permitido para DON em trigo ou qualquer outro alimento destinado ao consumo humano ou animal. Na Legislação da Comunidade Européia, além de

máximo permitido em cereais não transformados, existem valores máximos para farinha de cereais (750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), pães, produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para refeições (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), massas alimentícias secas (750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e alimentos destinados a lactentes e crianças (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



**Figura 1:** Distribuição dos níveis de DON em trigo cultivado nos Estados do Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS) das safras de 2006, 2007 e 2008.

Calori-Domingues et al. (2007) detectaram 94 % de positividade em trigo brasileiro, com contaminação média (332  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) semelhante ao nosso trabalho, analisando 50 amostras provenientes de cooperativas ou empresas processadoras de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, enquanto em trigo proveniente da Argentina e Paraguai, detectaram níveis de 30 a 349  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (46 % de positividade, 50 amostras). Lamardo et al. (2006), analisando 28 amostras de trigo comercial no Estado de São Paulo, detectaram DON em 50 % de farinha, com média em amostras positivas de 296,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , enquanto em trigo em grão com 33 % de positividade, a média foi 753,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , superior ao presente trabalho. Oliveira et al. (2002), analisando farinha de trigo e produtos de panificação comercializados em cidades de Minas Gerais, detectaram níveis de 40 a 1205  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em farinha, 78 a 780  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em pão de sal, 113 a 289  $\mu\text{g}/\text{kg}$  em pão de forma e não-detectado em panetone. Pinto et al. (2008) detectaram 80 % de positividade de DON em trigo na Argentina, com níveis superiores ao presente trabalho, variando de 300 a 70.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , média de 9873,33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Em contraste, Muthomi et al. (2008) detectaram níveis inferiores de DON em trigo produzido no Quênia, país de clima Tropical e baixa frequência de *F. graminearum*, com valores variando de 105 a 303  $\mu\text{g}/\text{kg}$  na safra de 2004 (48 amostras, positividade 75 %).

**Tabela 2:** Níveis de desoxinivalenol (DON) em trigo cultivado nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul (safras de 2006, 2007 e 2008).

Localidade	Região	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
		Total		Amostras positivas		
		N	Média	N (%)	Média	Faixa
Paraná	Norte	15	195,1 <sup>b,c</sup>	10 (66,6)	288,2	112,7 – 609,6
	Sudoeste	6	90,3 <sup>b,c</sup>	4 (66,6)	135,5	92,9 – 200,3
	<i>Total</i>	<i>21</i>	<i>163,0</i>	<i>14 (66,6)</i>	<i>244,5</i>	<i>92,9 – 609,6</i>
Rio Grande do Sul	Noroeste	7	317,0 <sup>a,c</sup>	4 (57,1)	554,7	89,4 – 1592,2
	Nordeste	8	741,8 <sup>a</sup>	8 (100,0)	741,8	122,0 – 1531,5
	<i>Total</i>	<i>15</i>	<i>543,6</i>	<i>12 (80,0)</i>	<i>679,5</i>	<i>89,5 – 1592,2</i>
<b>Total</b>		<b>36</b>	<b>321,6</b>	<b>26 (72,2)</b>	<b>445,3</b>	<b>89,5 – 1592,2</b>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Limite de quantificação = 87,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Um aumento de positividade e níveis de DON tem sido observado em trigo brasileiro nos últimos anos (CALORI-DOMINGUES et al., 2007; LAMARDO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002). Todavia, a contaminação por DON depende de condição climática, causando variações entre diferentes safras, devido a condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Salienta-se a importância de contínuo monitoramento e desenvolvimento de métodos de fácil execução e alta sensibilidade, para garantir a qualidade de alimentos.

A Tabela 3 mostra o consumo de pão francês e macarrão e Ingestão Diária Estimada (IDE) de DON de acordo com 5 grupos etários. Observou-se diferença de peso entre os grupos etários, sendo que os grupos com idade entre 31 e 40 anos, entre 41 e 50 anos e superior a 51 anos apresentaram peso mais elevado ( $p < 0,05$ ). Com relação ao consumo de pão, observou-se ingestão inferior pelo grupo com idade superior a 51 anos ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença significativa no consumo de macarrão entre os grupos etários (Tabela 3). A IDE de DON considerando pão francês foi superior no grupo de 31 a 40 anos com média de 0,17  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , enquanto IDE inferior ocorreu no grupo de 41 a 50 anos, com média de 0,12  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  ( $p < 0,05$ , Tabela 3). A IDE de DON considerando consumo de macarrão variou de 0,09 a 0,14  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , não observando diferença significativa entre faixas etárias ( $p > 0,05$ , Tabela 3).

A Tabela 4 apresenta a IDE média de DON através do consumo de pão francês e macarrão, comparando a estimativa obtida considerando para o cálculo a contaminação global (Paraná e Rio Grande do Sul; média de DON de 333,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , total de 36 amostras, incluindo os valores não-detectados como  $\frac{1}{2}$  LQ) *versus* amostras provenientes do Paraná (21 amostras, 177,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Salienta-se que o Paraná é o maior produtor de trigo brasileiro, contribuindo com

53 % de produção, assim como a coleta de dados de consumo foi conduzida em região que conta com diversas indústrias processadoras. No grupo considerando contaminação global (333,8 µg/kg), a Ingestão Diária Estimada (IDE) de DON variou de zero a 158,6 % da Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória (IDMTP) para DON, sendo que dois indivíduos ultrapassaram a IDMTP de DON de 1 µg/kg p.c./dia estabelecida pela JECFA (2001). O consumo de pão francês contribuiu com 18,7 % de IDMTP, enquanto o consumo de macarrão contribuiu com 12,5 % de IDMTP. Os indivíduos classificados como “alto consumidor” (relataram consumir estes alimentos 2 vezes ao dia) apresentaram IDE de DON a partir de pão 2,7 vezes superior ao consumidor médio, em relação a 7,1 vezes superior a partir de macarrão. Direcionando o cálculo de IDE considerando a contaminação das amostras do Paraná (média de 177,7 µg/kg), nenhum indivíduo ultrapassou a IDMTP, com os valores variando de 6,6 % a 84,4 %. A IDE considerando contaminação global foi 1,8 vezes superior ao valor considerando as amostras paranaenses ( $p < 0,05$ , teste t).

Salienta-se que o pão francês e o macarrão não são os únicos alimentos responsáveis pela ingestão de DON na dieta, embora sejam os maiores contribuintes. Os relatos também apontaram que altos consumidores excederam a IDMTP na França e Alemanha, conforme dados da ocorrência de toxinas de *Fusarium* spp. e avaliação da ingestão diária pela população Européia (SCHOTHORST; EGMOND, 2004). Turner et al. (2008) analisando urina de 300 indivíduos no Reino Unido, obtiveram positividade de 98,7 % de DON, com média geométrica de 9,4 µg/dia (ND-65,9 µg/dia), sendo os cereais mais consumidos o pão, macarrão, bolos e cereais matinais, com nível de DON urinário associado a quantidade consumida ( $p < 0,0005$ ). Embora a IDE calculada seja de 0,319 µg/kg p.c./dia, 4 indivíduos (1,3 %) ultrapassaram a IDMTP, sendo este valor superior ao nosso trabalho (0,31 µg/kg p.c./dia, Tabela 4).

As Tabelas 3 e 4 apresentam a avaliação inicial de IDE de DON através dos derivados de trigo no país, estando em andamento estudo englobando maior amostragem. Outrossim, a Ingestão Diária Máxima Provável (IDMP) estimada de 0,95 µg/kg p.c./dia de fumonisina (FB<sub>1</sub>) no milho paranaense pelo nosso grupo (MORENO et al., 2009) está abaixo da Ingestão Diária Máxima Tolerável de 2 µg/kg p.c./dia, denotando segurança do produto nacional perante saúde do consumidor e favorecendo a competitividade no agronegócio globalizado. Caldas et al. (2007) observaram que a IDMP pela população geral e por consumidores de milho e derivados representou 9 % e 159 %, respectivamente, da IDMT (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>) no Distrito Federal. Amaral et al. (2006) estimaram ingestão de 14 ng/kg p.c./dia de AFB<sub>1</sub> a partir de fubá brasileiro. Quanto a aflatoxinas, não se calcula Ingestão Diária Tolerável, devido a sua carcinogenicidade comprovada, classificada no grupo 1 pela IARC (1993).



**Tabela 3:** Ingestão Diária Estimada de desoxinivalenol (DON) através do consumo de pão francês e macarrão considerando diferentes faixas etárias em Londrina-PR.

Faixa etária	N	Peso	Consumo (g/semana)		Ingestão Diária Estimada de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg p.c./dia}$ )				% IDMTP
					Pão francês		Macarrão		
			Pão francês	Macarrão	Média	Faixa	Média	Faixa	
< 20 anos	55	58,8 <sup>b</sup>	285,5 <sup>a,b</sup>	156,2 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a,b</sup>	0,0 – 0,93	0,14 <sup>a</sup>	0,0 – 1,13	36,5
21 – 30 anos	103	64,2 <sup>b,c</sup>	245,5 <sup>a,b</sup>	154,2 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a,b</sup>	0,0 – 0,73	0,13 <sup>a</sup>	0,0 – 0,61	29,9
31 – 40 anos	38	67,2 <sup>a,c</sup>	361,5 <sup>a</sup>	107,9 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,0 – 0,57	0,09 <sup>a</sup>	0,0 – 0,30	33,0
41 – 50 anos	31	69,5 <sup>a,c</sup>	273,4 <sup>a,b</sup>	150,9 <sup>a</sup>	0,17 <sup>b</sup>	0,0 – 0,68	0,11 <sup>a</sup>	0,0 – 0,51	27,4
> 51 anos	34	72,2 <sup>a</sup>	190,1 <sup>b</sup>	185,2 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a,b</sup>	0,0 – 0,50	0,14 <sup>a</sup>	0,0 – 0,90	24,9

Total de indivíduos entrevistados= 260. Total de habitantes= 447.000.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

% IDMTP= porcentagem de Ingestão Diária Estimada em relação à IDMTP (Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória= 1  $\mu\text{g}/\text{Kg p.c./dia}$ ).

**Tabela 4:** Ingestão diária estimada de desoxinivalenol (DON) considerando consumo de pão francês e macarrão em Londrina-PR.

Alimento	Ingestão Diária Estimada de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg p.c./dia}$ )					
	Todas as amostras*			Amostras do Paraná**		
	Média	Faixa	Alto consumidor***	Média	Faixa	Alto consumidor***
Pão francês	0,19	0,0–0,93	0,50 (0,31 – 0,93)	0,10	0,0–0,49	0,27 (0,17 – 0,49)
Macarrão	0,12	0,0–1,13	0,88 (0,61 – 1,13)	0,07	0,0–0,60	0,47 (0,32 – 0,60)
<b>Total</b>	<b>0,31<sup>a</sup></b>	<b>0,0–1,58</b>		<b>0,17<sup>b</sup></b>	<b>0,01–0,84</b>	

\* Cálculo de IDE considerando contaminação média de DON de 333,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (análise de 36 amostras provenientes de Rio Grande do Sul e Paraná)

\*\* Cálculo de IDE considerando contaminação média de DON de 177,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (21 amostras provenientes do Paraná)

\*\*\* Indivíduo que relatou consumir o alimento 2 vezes ao dia

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa, segundo o teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

### Conclusão

Níveis de DON em trigo cultivado nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul apresentaram-se abaixo do limite máximo estabelecido pela Comunidade Européia para trigo não processado, apontando garantia dos produtos derivados. Pão francês e macarrão foram os principais derivados consumidos em Londrina-PR. Dois indivíduos ultrapassaram a Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória (IDMTP) considerando o consumo de pão e macarrão. O contínuo monitoramento de DON em grãos *in natura*, bem como o efeito de processamento industrial em resíduos tóxicos constituem assuntos prioritários na segurança de alimentos. Além disso, a regulamentação governamental quanto aos níveis de micotoxinas abrangendo maior número de produtos agrícolas é necessária, promovendo melhoria no abastecimento de alimentos seguros.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, UGF-Fundo Paraná da SETI-PR pelo apoio financeiro, assim como a CNPq, CAPES e Fundação Araucária pela bolsa aos Pós-graduandos, Iniciação Científica e Produtividade aos integrantes do grupo. Ao Depto de Estatística da Universidade Estadual de Londrina pela assessoria estatística concedida.

## 5.5 TESTES PRELIMINARES PARA CONFECÇÃO DE COLUNA DE IMUNOAFINIDADE PARA CLEAN UP DE DESOXINIVALENOL

Joice Sifuentes dos SANTOS, Cássia Reika TAKABAYASHI, Eiko Nakagawa ITANO, Osamu KAWAMURA, Elisa Yoko HIROOKA.

### Material e métodos

#### *Desenvolvimento de coluna de imunoafinidade CIA-DON*

Coluna de imunoafinidade (CIA) para *clean up* de DON foi desenvolvida utilizando suporte ativado Affi-Gel 10 (Bio-Rad, Estados Unidos) e anticorpo monoclonal (AcM) anti-DON produzidos a partir de cultivo de hibridoma linhagem DON.3 (*Capítulo 5.3*).

O suporte Affi-Gel (éster de N-hidroxisuccinimida) foi lavado três vezes com três vezes o seu volume de água ultrapura a 4 °C. Após a lavagem, adicionou-se ao gel solução de AcM (10,5 – 42,2 mg) em tampão PBS e incubou-se a 4 °C/18 h sob agitação orbital e lenta. O sobrenadante contendo AcM não acoplado ao gel foi removido por centrifugação e os sítios ativos não acoplados foram bloqueados com etanolamina-HCl 1 M pH 8 a 4 °C/2 h. A solução pós-bloqueio foi removida por centrifugação e o gel lavado dez vezes com tampão PBS (3 vezes o volume de gel). O gel acoplado foi ressuspenso em PBS-azida 0,02 % e mantido a 4 °C até montagem da coluna.

#### *Eficiência de acoplamento de AcM ao gel*

A eficiência do acoplamento de AcM ao suporte Affi-Gel foi determinada por quantificação de proteínas remanescentes no sobrenadante após etapa de acoplamento do AcM ao gel e após bloqueio com etanolamina.

A concentração de proteínas nestes sobrenadantes foi feita através do método de Bradford (1976). A curva padrão foi confeccionada empregando albumina de soro bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) nas concentrações de 31,25; 62,5; 125; 175; 200 e 250 µg/mL, utilizando PBS como branco de reação. A reação de cor foi realizada com 10 µL de amostra ou padrão e 100µL de reativo de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), incubando-se por 15 min e leitura a 650 nm (Expert Plus, Asys, Cambridge, Reino Unido).

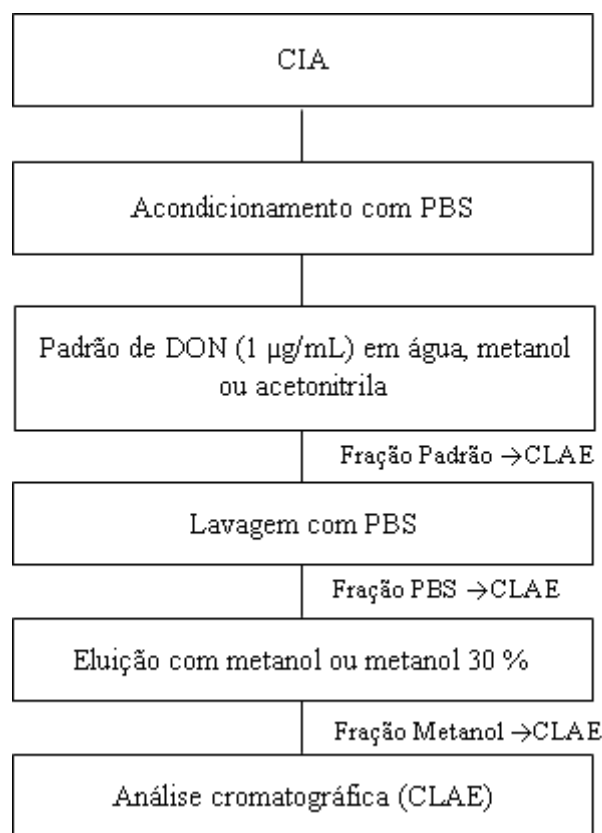
A eficiência de acoplamento foi estimada empregando a seguinte equação:

$$\text{Eficiência de acoplamento (\%)} = \frac{(\text{Proteína Total} - \text{Proteína Sobrenadante})}{\text{Proteína total}} \times 100$$

#### *Determinação da capacidade de retenção de DON em CIA*

A capacidade de retenção de DON na coluna de imunoafinidade foi testada utilizando 1 mL de solução de DON 1 µg/mL em água, metanol 10 % e acetonitrila 4,5 %. O gel contendo AcM anti-

DON (0,5 – 1,5 mL de gel) foi acondicionado em colunas de polipropileno (Muromac Columns, Japão) e lavado com 10 mL de tampão PBS 0,1 M pH 7,3. Em seguida, adicionou-se solução padrão de DON e CIA foi lavada com PBS (10 mL). A toxina foi eluída com metanol 30% ou metanol (1 – 2 mL; grau HPLC, JT Baker, México). As frações eluídas pela coluna (padrão, PBS e metanol) foram coletadas; as frações padrão e metanol foram secas a 40 °C sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 300 µL de metanol 30 % e filtradas (0,45 µm). A fração PBS foi apenas filtrada (0,45 µm). Estas frações foram utilizadas para quantificação de DON por cromatografia líquida de alta eficiência (Capítulo 5.2). Na Figura 1 pode-se observar um fluxograma exemplificando o *clean up* de DON utilizando as CIAs confeccionadas.



**Figura 1:** Uso de coluna de afinidade imune anti-DON para teste de recuperação.

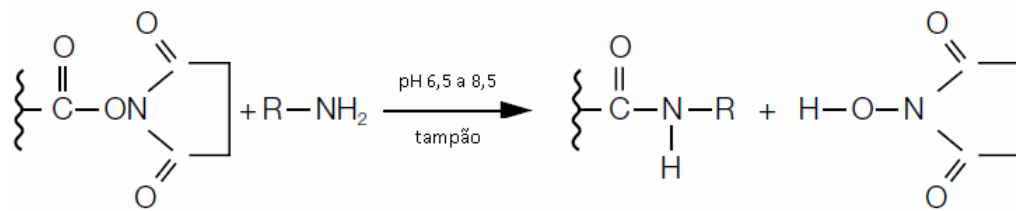
### Resultados e Discussão

A separação por cromatografia de afinidade imune baseia-se no reconhecimento de epítopos de um antígeno por anticorpos. A alta especificidade e sensibilidade dos anticorpos para com os seus antígenos torna a cromatografia de afinidade imune uma importante ferramenta para separação de um composto de uma matriz complexa.

A performance de uma CIA é em grande parte determinada pela qualidade do Ac em termos de especificidade (e reação cruzada), habilidade de ligação (avidéz) e capacidade da coluna (quantidade total de Ac que pode ser ligado ao recheio da coluna) (SENYUVA; GILBERT, 2009). A reatividade cruzada do AcM utilizado neste trabalho é de 333 % com 15-acetil DON (15ADON), <0,5 % com 3-

acetil DON e inferior a 5 % com nivalenol, toxina T-2 e seus derivados (KAWAMURA, 2005). No entanto, a reatividade com 15-ADON não seria interferência na detecção de DON no Brasil, pois é mais comumente encontrado na América do Norte.

O suporte Affi Gel 10 promove ligação com a molécula via aminas primárias (BIO-RAD, 2000). Depois da adição do IgG, a porção N-hidroxisuccinimida é deslocada e uma ligação amida estável é formada. Como o éster reativo está imobilizado no gel e apresenta alta seletividade para grupos amina primários, falsas reações com o ligante (i.e., ligação cruzada ou outras modificações na solução) são eliminadas (Figura 2).



**Figura 2:** Reação de acoplamento de AffiGel 10 com um ligante contendo grupos amino livres.

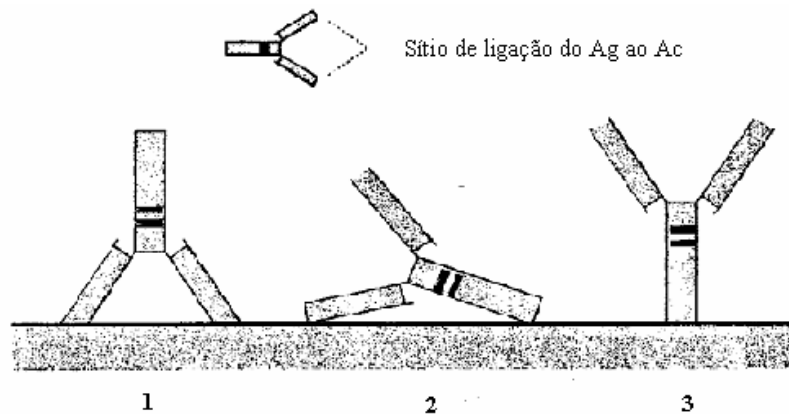
**Tabela 1:** Nível de anticorpo adicionado ao gel, anticorpo imobilizado e eficiência de acoplamento de anti-DON em suporte ativado Affi Gel 10.

CIA	IgG adicionado (mg)	Volume de gel (mL)	IgG/mL de gel	Eficiência de acoplamento (%)
1	15,4	1	15,4	74,6
2	14,4	2	7,7	13,0
3	10,5	1	10,5	78,6
4	42,2	2,5	16,9	54,9

A Tabela 1 apresenta os níveis de AcM adicionados a coluna e sua respectiva eficiência de acoplamento. Observou-se que o preparo da CIA 2 resultou em baixa eficiência de acoplamento (13 %). O fato pode ter acontecido devido a baixa concentração de AcM em solução (7,7 mg/mL de gel) para um maior volume de gel (2 mL), dificultando a ligação do anticorpo aos sítios ativos do gel. Eficiência de aproximadamente 55 % foi alcançada na confecção da CIA 4, quando foi utilizado um pool de anticorpos liofilizados, alcançando uma concentração de anticorpo de 16,9 mg/mL de gel. Assim como uma baixa concentração de IgG promoveu uma baixa eficiência de acoplamento, concentrações elevadas de AcM também não promovem boa eficiência de acoplamento. Para o preparo de coluna de imunoafinidade utilizando anti-DON, a concentração ideal de AcM em solução seria entre 10 e 15 mg de anticorpo/mL de gel.

Brenn-Struckhova et al. (2007, 2009) elaboraram coluna de imunoafinidade utilizando vidro silicato e AcM anti-DON (1 mg/mL). Os autores afirmam que o mecanismo de ligação utilizado

(entrapping) apresenta diversas vantagens com relação à ligação covalente de Ac ao suporte sólido, que pode ocasionar desnaturação dos anticorpos, diminuindo a afinidade pelo Ag. No entanto, a absorção física do Ac à fase sólida não permite a determinação da orientação do Ac imobilizado, havendo a possibilidade de que uma fração significativa das regiões de ligação do Ac a Ag estejam estericamente escondidas (BARTOLINI; RIBELA, 2005). Acoplamento químico sítio dirigido do Ac atinge capacidade de ligação do Ag 2 a 8 vezes maior, em razão da possibilidade de obter melhor acessibilidade estérica aos sítios ativos de ligação. Na Figura 3, podem ser observadas as diferentes posições possíveis de acoplamento do Ac ao suporte de CIA. No caso de suporte ativo Affi Gel 10, ocorre ligação não dirigida. No entanto, devido à cadeia de 10 C de Affi Gel 10, é possível que o espaço ocupado por estes átomos permita uma liberdade conformacional suficiente para que o anticorpo encontre a demanda espacial do antígeno (VANKOVÁ et al., 1998).



**Figura 3:** Possíveis posições dos sítios de ligação ao Ag em uma imobilização randômica do Ac: 1) não expostos à fase móvel; 2) parcialmente expostos à fase móvel; 3) totalmente expostos à fase móvel (BARTOLINI; RIBELA, 2005).

Após a confecção das colunas, estas foram testadas em relação a sua capacidade de retenção e recuperação da toxina (Tabela 2). CIA 1 foi testada utilizando solução padrão de DON diluída em 10 % de metanol. Observou-se que não houve recuperação de DON na fração eluída com metanol (as outras frações, padrão e PBS, não foram testadas). Durante o segundo uso de CIA 1, padrão de DON foi diluído em 4,5 % de acetonitrila. Observou-se a presença da toxina na fração padrão (67 %) e PBS (13 %). Desta maneira, concluiu-se que a eluição da toxina não deve ser realizada utilizando solvente orgânico, pois influenciou a interação entre Ag e AcM imobilizado na coluna. Brenn- Struckhofova et al. (2007, 2009) também observaram que retenção de DON só pode ser alcançada quando soluções aquosas puras são utilizadas nas colunas de imunoafinidade. Watanabe et al. (2001) notaram que a concentração de metanol na solução de eluição afetou a afinidade entre imazalil e AcM anti-imizalil, optando por eluição com metanol 40 %. Senyuva e Gilbert (2009) afirmam que, em geral, o extrato deve estar em solução aquosa, pois solventes orgânicos podem danificar o Ac e interferir com a

interação Ag-Ac. A força de ligação com o Ag (avidéz) irá influenciar sua recuperação durante a fase de extração.

O gel obtido para CIA 2 foi dividido em duas colunas (CIA 2a e 2b). CIA 2a foi eluída utilizando-se metanol puro e CIA 2b metanol 30 %. Devido a agressividade do metanol a ligação do AcM com o gel, a utilização de uma solução contendo menos metanol poderia permitir o reuso da coluna. A eluição de metanol foi mais rápida quando comparada a eluição com metanol 30 %. Também observou-se que o aspecto da coluna é drasticamente modificado pelo metanol puro, havendo a formação de bolhas no gel, conferindo aspecto granular. Para a coluna CIA 2a, 42,8 % de DON foi quantificado diretamente na eluição da solução padrão e 35,7 % foi eluído na fração metanol, enquanto 38,8 % de DON foi determinado na solução padrão de CIA 2b e 44,2 % foi recuperada na fração metanol 30 %.

Na CIA 3, não foi possível a detecção de DON em nenhuma das frações coletadas.

Quanto a CIA 4, 65 % de DON foi eluído na fração de lavagem com PBS e 6 % na fração de metanol. Nesta coluna, com maior quantidade de Ac acoplado ao gel, foi possível observar retenção do Ag pelo Ac, causada por elevada constante de associação existente entre estas moléculas. No entanto, ligações fortes, como as que ocorrem entre Ag e Ac, deveriam necessitar de condições drásticas para sua dissociação, como valores extremos de pH ou uso de solventes orgânicos, o que não ocorreu com a CIA 4, uma vez que 65 % de DON foi eluído durante lavagem com PBS.

AcM anti-DON, produzidos a partir da linhagem DON.3 já foram utilizados com sucesso como ferramenta ic-ELISA (KAWAMURA, 2005; presente Tese). No entanto, ainda não foram matéria-prima para confecção de coluna de imunoafinidade. No presente trabalho, observou-se que o anticorpo não apresentou boa interação com o seu antígeno, demonstrada pelos valores de DON presentes na fração Padrão e na fração PBS, utilizada para lavagem da coluna.

**Tabela 2:** Recuperação de desoxinivalenol (DON) utilizando *clean up* por CIA confeccionada com suporte Affi Gel 10 e anticorpo monoclonal anti-DON e quantificação por CLAE.

CIA	Uso	Volume de gel na coluna (mL)	Solvente do padrão	Recuperação	
				Fração	DON (%)
1	1°	0,5	meOH 10 %	metanol	0
	2°			padrão	67,0
				PBS	13,0
Sub-total		80,0			
2a	Único	1,0	H <sub>2</sub> O	padrão	42,8
				metanol	35,7
				Sub-total	78,5
2b	Único	1,0	H <sub>2</sub> O	padrão	38,8
				metanol 30 % (1 <sup>a</sup> )	42,8
				metanol 30 % (2 <sup>a</sup> )	1,3
				Sub-total	83,0
3	Único	1,5	H <sub>2</sub> O	metanol	0
4	Único	1,0	H <sub>2</sub> O	PBS	65,0
				metanol (2 <sup>a</sup> )	6,0
				Sub-total	71,0

### Conclusão

A possibilidade de produção de reagentes imunológicos em países agropecuários é fundamental para garantir a competitividade de insumos básicos. Visando o desenvolvimento de coluna de imunoafinidade para determinação de DON a nível nacional, utilizando AcM obtido a partir de hibridoma linhagem DON.3, são necessários novos testes dirigidos a definir concentração de anti-DON para promover boa retenção da toxina, assim como estratégia de limpeza da coluna e eluição de toxina que permitam desfazer a ligação Ag-Ac apenas na etapa de eluição.



## 6 CONCLUSÕES

O cultivo de hibridoma linhagem DON.3 permitiu produção de anticorpos monoclonais anti-DON em quantidade e especificidade suficientes para desenvolvimento com êxito de ensaio ELISA competitivo indireto para detecção de desoxinivalenol (DON) em grãos de trigo e farinha de trigo.

O ensaio desenvolvido apresentou confiabilidade e eficiência equivalentes à CLAE ( $r=0,84$ ) e CLAE-EM ( $r=0,93$ ). A simplicidade, facilidade no preparo da amostra, uso reduzido de solventes tóxicos e a não necessidade de equipamento sofisticado apontaram o imunoenensaio desenvolvido como alternativa promissora no controle de DON em trigo. Níveis de DON em trigo produzido nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul variaram de não detectado a 16076,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sendo que 80 amostras (58,8 %) apresentavam níveis abaixo do limite máximo permitido para DON em cereais. Foram observadas diferenças nos níveis de DON de acordo com a região de cultivo das amostras e safra, em razão das condições climáticas.

A pequena amostragem realizada e a interferência de matriz detectada para gérmen e farelo de trigo não permitiram uma conclusão efetiva sobre o efeito do processamento do trigo nos níveis de DON encontrados em derivados.

O consumo de pão francês pela população de Londrina, PR entrevistada foi de 267 g/semana, enquanto o de macarrão foi de 151 g/semana. Outros alimentos derivados de trigo amplamente consumidos foram bolo, pizza, cachorro-quente e biscoitos. Houve correlação positiva entre o consumo de derivados de trigo e variáveis sócio-antropométricas, faixa etária, índice de massa corporal, escolaridade e procedência dos indivíduos entrevistados.

A Ingestão Diária Estimada (IDE) de DON pela população de Londrina estudada variou de zero (pessoas que não consumiam os alimentos investigados) a 4,73  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/dia. O consumo de pão colaborou com 60,9 % da IDE e o de macarrão com 39,1 %. Oitenta e cinco indivíduos (32,7 %) ultrapassaram a Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória fixada em 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/dia. IDE de DON variou de acordo com o sexo, idade e categoria de consumo dos indivíduos.

O desenvolvimento de coluna de imunoafinidade empregando anticorpos anti-DON não apresentou bom desempenho na retenção de DON. Dessa maneira, novos testes devem ser realizados no sentido de viabilizar a produção desta imunoferramenta.

O anticorpo produzido no presente trabalho poderá ser utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de imunossensores, aprofundando em inovações emergentes capazes de agilizar a análise. É oportuna a realização de novas pesquisas para o aperfeiçoamento de técnicas de processamento do grão de trigo, uma vez que já foram constatados níveis de contaminação de DON menores em derivados de trigo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI Jr, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.336-342, 2006.
2. AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.1283–1290, 2004.
3. BARBETTA, P.B. **Estatística aplicada às ciências sociais**. Florianópolis: Editora da UFSC, 4 ed., 2001. 338p.
4. BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. Cromatografia de Imunoafinidade. In: Adalberto Pessoa Jr, Beatriz Vahan Kilikian (Org.). **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1 ed. Barueri, SP: Editora Manole Ltda, 2005, v. 1, p. 248-260.
5. BENSASSI, F.; ZAIED, C.; ABID, S.; HAJLAOUI, M.R. BACHA, H. Occurrence of deoxynivalenol in durum wheat in Tunisia. **Food Control**, v.21, p.281-285, 2010.
6. BETINA, V. Thin layer chromatography of mycotoxins, **Journal of Chromatography A**, v.334, p.211-276, 1985.
7. BIO-RAD LABORATORIES. **Activated Immunoaffinity Supports**. Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, 2000.
8. BIRZELE, B.; MEIER, H.H.; KRÄMER, J.; DEHNE, H.W. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.667-673, 2002.
9. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.
10. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999**. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos. 1999.
11. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003**. Aprova o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. 2003.
12. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 7, de 15 de agosto de 2001**., publicada no Diário Oficial da União em 21/08/2001, Seção 1. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade do Trigo. 2001.
13. BRENN-STRUCKHOFOVA, Z.; CICHNA-MARKL, M.; BÜHM, C.; RAZZAZI-FAZELI, E. Selective sample cleanup by reusable sol-gel immunoaffinity columns for determination of deoxynivalenol in food and feed samples. **Analytical Chemistry**, v.79, p.710-717, 2007.
14. BRENN-STRUCKHOFOVA, Z.; FÜREDER, C.; CICHNA-MARKL, M.; RAZZAZI-FAZELI, E. Co-isolation of deoxynivalenol and zearalenone with sol-gel immunoaffinity columns for their determination in wheat and wheat products. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.5828-5837, 2009.
15. BRIYONES-REYES, D.; GOMÉZ-MARTINEZ, L.; CUERVA-ROLÓN, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, México. **Food Chemistry**, v.100, p.693-698, 2007.

16. BRUCE, M.P.; BOYD, V.; DUCH, C.; WHITE, J.R. Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 264, p. 59-68, 2002.
17. BULLERMAN, L.B.; SCHOEREDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.
18. CALDAS, E.D.; SILVA, A.C.S. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7974-7980, 2007.
19. CALORI-DOMINGUES, M.A.; ALEMIDA, R.R.; TOMIWAKA, M.M.; GALLO, C.R.; GLORIA, E.M.; DIAS, C.T.S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.181-185, 2007.
20. CÁNOVAS, A.D.; SÓ e SILVA, M.; BRAZ, A.J.B.P. **Avaliação do Valor de Cultivo e Uso de Genótipos de Trigo Irrigado no Estado de Goiás – 2002**. Documentos on line nº37, EMBRAPA. In: [www. http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do37\\_7](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do37_7). Acesso em 12 de outubro de 2009. Dezembro de 2004.
21. CASA, R.T.; REIS, E.M.; BLUM, M.M.C.; BOGO, A.; SCHEER, O.; ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.289-293, 2004.
22. CASTRO, M.B.T.; ANJOS, L.A.; LOURENÇO, P.M. Padrão dietético e estado nutricional de operários de uma empresa metalúrgica do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n.4, p.926-934, 2004.
23. CAVALIERE, C.; D'ASCENZO, G.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. **Food Chemistry**, v.92, p.559-568, 2005.
24. CEPEA – Centro de Estudos e Pesquisas Econômicas Avançadas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. **TRIGO: Produção de trigo deve aumentar 35% este ano**. In: <http://www.cepea.esalq.usp.br/imprensa>. Publicado em 11/06/2008.
25. CEPEA – Centro de Estudos e Pesquisas Econômicas Avançadas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. [www.cepea.esalq.usp.br](http://www.cepea.esalq.usp.br). 2009.
26. CETIN, Y.; BULLERMAN, L.B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.755-764, 2005.
27. CHAMPEIL, A.; FOUBERT, J.F.; DORÉ, T.; ROSSIGNOL, L. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. **Crop Protection**, v.23, p.531-537, 2004.
28. CHIARA, V.L.; BARROS, M.E.; COSTA, L.P.; MARTINS, P.D. Redução de lista de alimentos para questionário de frequência alimentar: questões metodológicas na construção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.10, n.3, p.410-420, 2007.
29. CINTRA, I.P.; VON DER HEYDE, M.E.D.; SCHIMITZ, B.A.S.; FRANCESCHINI, S.C.C.; TADDEI, J.A.A.C.; SIGULEM, D.M. Métodos de inquéritos dietéticos. **Caderno de Nutrição**, v.13, p.11-23, 1997.
30. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 70, p. 12-34, 2006.
31. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) N° 1126/2007 of 28 September 2007, **amending Regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products**. 2007.

32. CONAB – Companhia nacional de abastecimento. **Indicadores agropecuários, 2009**. In: [www.conab.gov.com](http://www.conab.gov.com).
33. KONKOVÁ, E.; LACIAKOVÁ, A.; KOVÁČ, G.; SEIDEL, H. Fusarial toxins and their role in animal diseases. **The Veterinary Journal**, v.165, p.214-220, 2003.
34. CORNELL, H.J.; HOVELING, A.W. **Wheat: Chemistry and utilization**. Lancaster: Technomic Publishing CO., INC, 1998, 426 p.
35. EPA. US Environmental Protection Agency. **Guidelines for Exposure Assessment**. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 1992.
36. FAO/WHO. **Risk Management and Food Safety**, Report of a Joint FAO/WHO Consultation, Rome, Italy, 27 to 31 January 1997.
37. FLAJS, D.; DOMIJAN, A.M.; IVIC, D.; CVJETKOVIC, B.; PERAICA, M. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. **Food Control**, v.20, p.590-592, 2009.
38. FUJII, S.; RIBEIRO, R.M.R.; SCHOLZ, M.B.DOS S.; ONO, E.Y.S.; PRETE, C.E.C.; ITANO, E.N.; UENO, Y.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y. Reliable indirect competitive ELISA for ochratoxin A survey in green coffee from the North of Paraná State, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.12, p. 902-909, 2006.
39. FUJITA, A.H.; FIGUEROA, M.O.R. Composição centesimal e teor de  $\beta$ -glucanas em cereais e derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.116-120, 2003.
40. GAAG, B.; SPATH, S.; DIETRICH, H.; STIGTER, E.; BOONZAAIJER, G.; OSENBRUGGEN, T.; KOOPAL, K. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. **Food Control**, v.14, p.251-254, 2003.
41. GEMS/Food EURO. **Second workshop on reliable evaluation of low level contamination of food**. Kulmbach, Germany, 26–27 May 1995.
42. GODOY, F.C.; ANDRADE, S.C.; MORIMOTO, J.M.; CARANDINA, L., GOLDBAUM, M.; BARROS, M.B.A.; CESAR, C.L.G.; FISEBERG, R.M. Índice de qualidade da dieta de adolescentes residentes no distrito do Butantã, município de São Paulo, Brasil. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.663-671, 2006.
43. GONZÁLES, H.H.L.; MOLTÓ, G.A.; PACIN, A.; RESNIK, S.L.; ZELAYA, M.J.; MASANA, M.; MARTÍNEZ, E.J. Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires Province, Argentina. **Mycopathologia**, v.165, p.105-114, 2008.
44. HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726 p.
45. HERMAN, J.L.; YOUNES, M. Background to the ADI/TDI/PTWI. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.30, p.109-113, 1999.
46. IJIMA, K.; KAWAMURA, O.; WANG, D.S.; LIANG, Y.X.; CHEN, G.; YU, S.Z.; CHAU, N.T.; UENO, Y. Development of highly sensitive immunosorbent assay for fumonisins and its application for contaminated corn. **Mycotoxins**, v. 42, p. 63– 66, 1996.
47. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020 p.
48. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores Agropecuários**. In [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). 2009.
49. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares POF 2002 – 2003. **Aquisição alimentar domiciliar per capita anual**. In: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002aquisicao/tab15.pdf>. 2003.

50. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances, food items and constituents. **Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**, vol.56. World Health Organization, Lyon, France, p.397-444, 1993.
51. INTERNATIONAL GRAINS COUNCIL. **Grain Market Report No. 393**, 24 September 2009.
52. INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. IPCS/GEMS. **Food Euro workshop on reliable evaluation of low level contamination of food**, Appendix 5, Kulmbach, Germany, May 1995.
53. JAJIC, I.; JURIC, V.; ABRAMOVIC, B. First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia. **Food Control**, v.19, p.545-550, 2008.
54. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. JECFA. Safety evaluation of certain mycotoxins in food, prepared by the fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, **WHO Food Additives Series 47** (WHO Geneva). 2001
55. KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin A in peanut products. **Mycotoxin Research**, v.4, p.75-87, 1988.
56. KAWAMURA, O. Production of monoclonal antibodies against deoxynivalenol and development of a high sensitive ELISA using enzyme amplification. **Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University**, v.57, p.27-33, 2005.
57. KLÖTZEL, M.; SCHIMIDT, S.; LAUBER, U.; THIELERT, G.; HUMPL, H.U. Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC method. **Chromatographia**, v.62, p.41-48, 2005.
58. KOCH, P. State of the art of trichothecenes analysis. **Toxicology Letters**, v.153, p.109-112, 2004.
59. KOS, G.; LONNGER, H.; KRŠKA, R. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. **Vibrational Spectroscopy**, v.29, p.115-119, 2002.
60. KOSTELANSKA, M.; HAJŠLOVA, J.; ZACHARIASOVA, M.; MALACHOVA, A.; KALACHOVA, K.; POUŠTKA, J.; FIALA, J.; SCOTT, P.M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R. Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.3187-3194, 2009.
61. KROES, R.; MULLER, D.; LAMBEC, J.; LOWIK, M.R.H.; VAN KLAVEREN, J.; KLEINER, J.; MASSEY, R.; MAYER, S.; URIETA, I.; VERGER, P.; VISCONTI, A. Assessment of intake from the diet. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.327-385, 2002.
62. KRŠKA, R. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. **Journal of Chromatography A**, v.815, p.49-57, 1998.
63. KRŠKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.241-264, 2007.
64. KRŠKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; MOLINELLI, A.; SULYOK, M.; MACDONALD, S.; CREWS, C. Mycotoxin analysis: an update. **Food Additives and Contaminants**, v.25, p.152-163, 2008.
65. KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. **Toxicology Letters**, v.82/83, p.853-859, 1995.
66. KUIPER-GOODMAN, T. **Risk assessment of mycotoxins**. In: A collection of invited papers presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. p.257-264, 1988.

67. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
68. LAGANA, A.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DE LEVA, I.; FABERI, A.; PASTORINI, E. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification of trichothecenes in maize. **Rapid Communications in mass Spectrometry**, v.17, p.1037-1043, 2003.
69. LAMARDO, L.C.A.; NAVAS, S.; SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p.32-35, 2006.
70. LATTANZIO, V.M.T.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p.758-768, 2009.
71. LEMKE, S.L.; GRANT, P.G.; PHILLIPS, T.D. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3789-3796, 1998.
72. LI, H.-P.; WU, A.-B.; ZHAO, C.-S.; SCHOLTEN, O.; LÖFFLER, H.; LIAO, Y.-C. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, p.505-511, 2005.
73. LONDRINA. Prefeitura Municipal. [home.londrina.pr.gov.br/planejamento/perfil/perfil\\_2007](http://home.londrina.pr.gov.br/planejamento/perfil/perfil_2007).
74. LORI, G.A.; SISTERNA, M.N.; HAIDUKOWSKI, M.; RIZOO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiology Research**, v.158, p.29-35, 2003.
75. LORI, G.A.; SISTERNA, M.N.; SARANDON, S.J.; RIZZO, I.; CHIDICHIMO, H. *Fusarium* head blight in wheat: impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. **Crop Protection**, v.28, p.495-502, 2009.
76. MA, Y.U.; GUO, H.W. Mini-review of studies on the carcinogenicity of deoxynivalenol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.25, p.1-9, 2008.
77. MACIEL, É.S.; SILVA, M.V. Qualidade de vida e consumo alimentar: comportamentos de acordo com o gênero de indivíduos de comunidade universitária. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, v.33, n.2, p.47-62, 2008.
78. MARAGOS, C.M.; MCCORMICK, S.P. Monoclonal Antibodies for the Mycotoxins Deoxynivalenol and 3-Acetyl-Deoxynivalenol. **Food and Agricultural Immunology**, v.12, p.181-192, 2000.
79. MARINHO, M.C.S.; HAMANN, E.M.; LIMA, A.C.C.F. Práticas e mudanças no comportamento alimentar na população de Brasília, Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materna e Infantil**, Recife, v.7, n.3, p.251-261, 2007.
80. MATEO, J.J.; MATEO, R.; HINOJO, M.J.; LLORENS, A.; JIMÉNEZ, M. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. **Journal of Chromatography A**, v.955, p.245-256, 2002.
81. MILLER, J.D. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p.219-230, 2008.
82. MIRANDA, M.Z. Resposta Técnica, **Trigo para quibe**. 2006. In [www.sbprt.ibict.br](http://www.sbprt.ibict.br).
83. MONTEIRO, C.; MONDINI, L.E.; COSTA R. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Revista de Saúde Pública**, v.34, p.251-258, 2000.
84. MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220-226, 2009.

85. MUTHOMI, J.W.; NDUNG'U, J.K.; GATHUMBI, J.K.; MUTITU, E.W.; WAGACHA, J.M. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. **Crop Protection**, v.27, p.1215-1219, 2008.
86. NAS. US National Academy of Science. **Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process**. National Academy Press, Washington. 1993.
87. NEIRA, M.S.; PACIN, A.M.; MARTINEZ, E.J.; MOLTO, G.; RESNIK, S.L. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.21-25, 1997.
88. NIESSEN, L.; BOEHM-SCHARAML, M.; VOGEL, H.; DONHAUSER, S. Deoxynivalenol in commercial beer—screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. **Mycotoxin Research**, v.9, p.99-109, 1993.
89. NOWICKI, T.W. ; GABA, D.G.; 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**, v.8, p.189-202, 1988.
90. NURYONO, N.; NOVIANDI, C.T.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. **Food Control**, v.16, p.65-71, 2005.
91. OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do Estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.61, n.1, p.1-6, 2002.
92. ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M.; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Fumonisin in Corn: Correlation with *Fusarium* sp. Count, Damaged Kernels, Protein and Lipid Content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.1, p.63-71, 2006.
93. ONO, E.Y.S.; KAWAMURA, O.; ONO, M.A.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. A Comparative Study of Indirect Competitive ELISA and HPLC for Fumonisin Detection in Corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, v.12, p.5-14, 2000.
94. ONO, E.Y.S.; MENDES, A.M.; MEIRELLES, P.G.; HIROOKA, E.Y.; ONO, M.A. Micotoxinas em alimentos – Progressos na imunodeteção. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.32, p.69-80, 2004.
95. ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; FUJII, S.; ONO, M.A.; HIROOKA, E.Y. Advances in immunochemical methods for mycotoxin/mycotoxigenic fungi detection in the agri-food system. **Fungi: Multifaceted Microbes** ed. New Delhi: Anamaya Publishers, 2006, p. 275-293.
96. OPINION ON FUSARIUM TOXINS. **Part 1: Deoxynivalenol (DON) Scientific Committee On Food**. SCF/CS/CNTM/MYC/19 Final. 09/12/99. Annex VI to the minutes of the 119th Plenary meeting, 1999.
97. OSÓRIO, E.A. **A cultura do trigo**. São Paulo: Globo, 1992, 218 p.
98. PACIN, A.; BOVIER, E.C.; CANO, G.; TAGLIERI, D.; PEZZANI, C.H. Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by the deoxynivalenol and exposure estimate. **Food Control**, v.21, p.492-495, 2010.
99. PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A.; VRABCHEVA, T.; VALZACCHI, S.; STROKA, J.; ANKLAM, E. Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Food Additives and Contaminants**, v.21, p.607-617, 2004.
100. PARRY, D.W.; JENKINSON, P.; MCLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. **Plant Pathology**, v.44, p.207–238, 1995.
101. PEI, S.C.; ZHANG, Y.Y.; EREMIN, S.A.; LEE, W.J. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food Control**, v.20, p.1080-1085, 2009

102. PESTKA, J.J.; ABOUZIED, M.N.; SUTIKNO, T. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, v. 49, n. 2, p. 120-128, 1995.
103. PESTKA, J.J.; SHOW, H.-R.; MOON, Y.; CHUNG, Y.J. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicology Letters**, v.153, p61-73, 2004.
104. PESTKA, J.J.; SMOLINSKI, A.T. Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, v.8, p.39-69, 2005.
105. PETERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, v.14, p.229-232, 2003.
106. PINTO, V.E.F.; TERMINIELLO, L.A.; BASILICO, J.C.; RITIENI, A. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.157-162, 2008.
107. PITTEP, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. **Revue de Médecine vétérinaire**, v. 149, p.479-492, 1998.
108. PLACINTA, C.M.; D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* micotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v.78, p.21-37, 1999.
109. PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; FERREIRA, S.O.; CORRÊA, T.B.S.; AFFONSO, B.R.R. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.259-262, 1997.
110. PRANGE, A.; BIRZELE, B.; KRÄMER, J.; MEIER, A.; MODROW, H.; KÖHLER, P. *Fusarium*-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. **Food Control**, v.16, p.739-745, 2005.
111. QUIROGA, N.; RESNIK, S.; PACIN, A.; MARTÍNEZ, E.; PAGANO, A.; RICCOBENE, I.; NEIRA, S. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. **Food Control**, v.6, p.201-204, 1995.
112. REUNIÃO DA COMISSÃO CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 19, Londrina, PR. **Informações Técnicas das Comissões Centro-Sul Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale para a Safra de 2004**. 218 p. 2004.
113. RILEY, R.T.; NORRED, W.P. **Mechanisms of mycotoxicity**. In: Howard, D.H., Miller, J.D. (Eds.), *The Mycota*, vol VI, Springer, Berlin, pp. 194–195, 1996.
114. ROMER, T.R. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxin in food and feeds. **Journal of AOAC International**, v.69, p.699-703, 1986.
115. ROSENBERG, E.; KRŠKA, R.; WISSIACK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI, E.; GRASSERBAUER, M. High-performance liquid chromatography – atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v.819, p.277-288, 1998.
116. SABINO, M.; OCHIKAWA, A.H.; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L.C.A. Determinação de desoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.49, n.2, p.155-159, 1989.
117. SANTOS, J.S.; XAVIER, A.A.O.; RIES, E.F.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Consumo de produtos de origem animal por universitários em Santa Maria – RS. **Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 13-24, 2006.
118. SCHNEIDER, E.; CURTUI, V.; SEIDLER, C.; DIETRICH, R.; USLEBER, E.; MARTLAUBER, E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. **Toxicology Letters**, v.153, p.113-121, 2004.



119. SCHNEIDER, L.; PICHLER, H.; KRŠKA, R. An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat based on chicken egg yolk antibodies. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.367, p.98-100, 2000.
120. SCHOLLENBERGER, M.; MULLER, H.-M.; RUFLE, M.; SUCHI, S.; PLANK, S.; DROCHNER, W. Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.317-326, 2005.
121. SCHOLLENBERGER, M.; MULLER, H.M.; RUFLE, M.; SUCHY, S.; PLANK, S.; DROCHNER, W. Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. **Mycopathologia**, v.161, p.43-52, 2006.
122. SCHOTHORST, R.C.; JEKEL, A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. **Food Chemistry**, v.73, p.111-117, 2001.
123. SCHOTHORST, R.C.; VAN EGMOND, H.P. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states". **Toxicology Letters**, v.153, p.133-143, 2004.
124. SCUDAMORE, K.A.; GUY, R.C.E.; KELLEHER, B.; MACDONALD, S.J. Fate of the fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, during extrusion of wholemeal wheat grain. **Food Additives and Contaminants**, v.25, p.331-337, 2008.
125. SENYUVA, H.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: a review. **Journal of Chromatography B** (2009), doi:10.1016/j.jchromab.2009.05.042.
126. SINHA, R.C.; SAVARD, M.E. LAU, R. Production of monoclonal antibodies for the specific detection of deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.1740-1744, 1995.
127. SLATER, B.; PHILIPP, S.T.; MARCHIONI, D.M.L.; FISBERG, R.M. Validação de Questionários de Frequência Alimentar - QFA: considerações metodológicas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, n.3, p.200-208, 2003.
128. SNIJDERS, C.H.A. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. **Toxicology Letters**, v.153, p.37-46, 2004.
129. SOARES, L.V. **Curso Básico de Instrumentação Para Analistas de Alimentos e Fármacos**. Barueri: Ed. Manole, 2006. 337p.
130. STEYN, P.S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, v.82/83, p.843-851, 1995.
131. STROKA, J.; SPANJER, M.; BUECHLER, S.; BAREL, S.; KOS, G.; ANKLAM, E. Novel sampling methods for the analysis of mycotoxins and the combination with spectroscopic methods for the rapid evaluation of deoxynivalenol contamination. **Toxicology Letters**, v.153, p.99-107, 2004.
132. SUDAKIN, D.L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v.143, p.97-107, 2003.
133. TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.23-28, 2000.
134. TRIGO-STOCKLI, D.M.; DEYOE, C.W.; SATUMBAGA, R.F.; PEDERSEN, J.R. Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled fractions of wheat. **Cereal Chemistry**, v.73, p.388-391, 1996.
135. TURNER, P.C.; ROTHWELL, J.A.; WHITE, K.L.M.; GONG, Y.; CADE, J.E. WILD, C.P. Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. **Environmental Health Perspectives**, v.16, n.1, p.21-25, 2008.
136. TUTELYAN, V.A. Deoxynivalenol in cereals in Russia. **Toxicology Letters**, v.153, p.173-179, 2004.

137. VANKOVÁ, R.; GAUDINOVÁ, A.; SÜSSENBEKOVÁ, H.; DOBREV, P.; STRNAD, M.; HOLÍK, J.; LENFELD, J. Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins. **Journal of Chromatography A**, v. 811, p. 77-84, 1998.
138. VIEIRA, A.P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M.L.M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.16, p.221-225, 1999.
139. VISCONTI, A.; HAIDUKOWSKI, E.M.; PASCALE, M.; SILVESTRI, M. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. **Toxicology Letters**, v.153, p.181-189, 2004
140. WATANABE, E.; YOSHIMURA, Y.; YUASA, Y.; NAKAZAWA, H. Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits. **Analytica Chimica Acta**, v.433, p.199-206, 2001.
141. WHO. World Health Organization. Global Environmental Monitoring System. **Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processes agricultural commodities**. Geneva; 1998.
142. WILLET, W. **Nutritional Epidemiology**. New York: Oxford University Press, 1990.
143. ZACHARIASOVA, M.; HAJŠLOVA, J.; KOSTELANSKA, M.; POUŠTKA, J.; KRPLOVA, A.; CUHRA, P.; HOCHÉL, I. Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography couple to tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.625, p.77-86, 2008.
144. ZHENG, M.Z.; RICHARD, J.L.; BINDER, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia**, v.161, p.261-273, 2006.
145. ZINEDINE, A.; SORIAN, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MANÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.1-18, 2007.
146. ZÖLLNER, O.; MAYER-HELM, P. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1136, p.123–169, 2006.
147. ZÖLLNER, P.; JODLBAUER, J.; LIDNER, W. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. **Journal of Chromatography A**, v.858, p.167-174, 1999.

# 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](#)