

NÍVEIS DE DEOXINIVALENOL E NIVALENOL EM PÃES ELABORADOS COM FARINHA NATURALMENTE CONTAMINADA

A.C. Lemos¹, V. S. Borba¹, M. D. M. Costa¹, E. B. Furlong¹

1 - Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos – CEP: 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: +55 (53) 3233-6960 – Fax: +55 (53) 3233-8644 – e-mail: andressa.cunhalemos@gmail.com

RESUMO – O preparo de pães à base de farinha contaminada é considerado de pouco risco, pois durante a elaboração desses alimentos, é possível mitigar a contaminação, em função das etapas e condições utilizadas. Nesse estudo, farinha de trigo contaminada naturalmente com as micotoxinas deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV), metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, foi utilizada para a elaboração de pães, com o objetivo de avaliar os níveis destes contaminantes ao final do processo. Os tricotecenos foram determinados na farinha e nos pães, preparados sob condições controladas de tempo em cada etapa e tempo e temperatura na etapa de assamento. Foi utilizado o método de QuEChERS para a extração dos tricotecenos e HPLC-DAD para detecção deles. Após o processo de panificação houve redução de 87,5% de NIV e 39,4% de DON, mostrando que o NIV é uma micotoxina aparentemente mais susceptível ao processo de panificação. No entanto, são necessárias estratégias mais efetivas para mitigar a exposição a DON.

ABSTRACT – The production of bread based on contaminated flour is considered to be of low risk, because during the preparation of these foods it is possible to mitigate the contamination, depending on the steps and conditions used. In this study, wheat flour naturally contaminated with deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) mycotoxins, secondary toxic metabolites produced by fungi of the genus *Fusarium*, was used for the preparation of breads, in order to assess the levels of these contaminants at the end of the process. The trichothecenes were determined in the flour and the breads, prepared under controlled conditions of time in each stage and time and temperature in the baking stage. The QuEChERS method was used for the extraction of the trichothecenes and HPLC-DAD for their detection. After the baking process there was a reduction of 87.5% of IVN and 39.4% of DON, showing that NIV is a mycotoxin apparently more susceptible to the baking process. However, more effective strategies are needed to mitigate exposure to DON.

PALAVRAS-CHAVE: elaboração de massa, fermentação, assamento, tricoteceno.

KEYWORDS: dough processing, fermentation, baking, trichothecene.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de panificação representa 36% de movimentação econômica na indústria alimentícia brasileira (Sebrae, 2017). A elaboração básica do pão é feita utilizando farinha, normalmente de trigo, água e

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

levedura, porém, podem ser utilizados outros ingredientes, como ovos, leite e açúcar (Brasil, 2005; Caballero et al. 2015). A primeira etapa da panificação consiste na mistura dos ingredientes para homogeneizar a mistura para as etapas seguintes (Guerreiro, 2006). Na etapa de fermentação ocorre a conversão do amido em dextrinas, e posteriormente em glicose que é consumida pela levedura, resultando em CO₂ e compostos secundários que contribuem para o desenvolvimento do aroma e sabor (Cauvain e Young, 2009). As condições utilizadas nessa etapa variam muito, e quanto menor o tempo, mais fermento é necessário para que a massa fique na consistência desejada. A temperatura ótima varia entre 26 e 30 °C e umidade relativa entre 75 e 80% enquanto o tempo varia entre 40 e 120 min, dependendo do tipo de pão e sua formulação (Aquarone et al. 2001; Caballero et al. 2015). A etapa de divisão da massa tem como objetivo obter pedaços menores e com peso adequado. A precisão e uniformidade é essencial nessa etapa, visto que o excesso de massa representa perdas econômicas e a falta de peso pode resultar em violação na legislação (Caballero et al., 2015; Cauvain, 2001). O forneamento é a última etapa da panificação e tem como principal objetivo o tratamento térmico do amido e proteína, assim como inativação de enzimas, de micro-organismos, e o desenvolvimento das características sensoriais do produto. É nessa etapa que ocorre formação da crosta, desenvolvimento de aroma e sabor característicos, sendo a cor da crosta resultante da reação de Maillard, que ocorre entre os aminoácidos e açúcares redutores (Caballero et al. 2015; Cauvain e Young, 2009).

A farinha de trigo pode estar contaminada por tricotecenos, que são uma classe de micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, que infectam os grãos de trigo no campo e durante o armazenamento. Dentre essa classe, o DON é a micotoxina mais encontrada nos grãos de trigo e em produtos derivados, como farinha de trigo e produtos de panificação (Freire e Sant'ana, 2018), e por isto seus níveis aceitáveis são estabelecidos em muitos países, incluindo o Brasil. A ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas causa diversos efeitos tóxicos em animais e humanos. Alguns desses efeitos são imunossupressão, efeito carcinogênico, genotóxico, teratogênico e mutagênico, como resultado da exposição crônica, e náuseas, vômito e rejeição alimentar em caso de exposição aguda (Sobrova et al., 2010; Van Alfen, 2014). Entretanto, o impacto das micotoxinas na saúde depende de diversos fatores como o nível de ingestão, toxicidade do composto ingerido, peso corporal, tipo de micotoxina, tempo de exposição e estado fisiológico do indivíduo (Bhatnagar et al., 2002).

O estudo sobre o destino dos tricotecenos durante o processamento primário e o secundário é importante para a avaliação e gestão de riscos para as populações que consomem produtos à base de trigo (Zhang e Wang, 2014). Segundo a RDC nº 138, o limite máximo de tolerância de DON para trigo e farinha de trigo integral é 1000 µg kg⁻¹ enquanto para farinha de trigo branca e produtos de panificação como biscoitos e pães é de 750 µg kg⁻¹ (Brasil, 2017). É importante ressaltar que essa resolução não inclui NIV nem seus derivados acetilados como o 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) e o 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON), que também contribuem para os efeitos tóxicos dos tricotecenos.

Neste trabalho foi proposto avaliar se as condições utilizadas (tempo de descanso, de fermentação, e tempo e temperatura de assamento) para a elaboração de pães são eficazes para a mitigação da contaminação por NIV e DON presentes simultaneamente em farinha de trigo.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Elaboração dos pães

No comércio local da cidade de Rio Grande – RS foram coletadas 3 amostras de diferentes marcas de farinha branca e então foi verificado nível de contaminação conforme o item 2.2.

Para a elaboração dos pães foi utilizada a farinha de trigo naturalmente contaminada com NIV e DON, levedura, sal, açúcar, gordura e água (Coelho e Salas-Mellado, 2015) na proporção (200:4:4:4:4:120 g/g). Metade da farinha foi misturada com o sal e açúcar em amassadeira por 3 min, após foi adicionada a água morna, o restante da farinha, levedura e gordura por mais 6 min. A massa foi deixada em descanso por 30 min em temperatura ambiente e seguindo-se a passagem por um rolo para massas, dobrando e espichando-a sempre, repetindo esse

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

processo 10 vezes. A massa foi cortada em pedaços menores e moldada para então ser fermentada a 30 °C durante 45 min em estufa de fermentação. A massa fermentada foi assada em forno elétrico a 200 °C por 30 min.

2.2 Extração e quantificação dos tricotecenos

Para a extração dos tricotecenos foi utilizado o método modificado de QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) (dados não publicados). Para isso, foram utilizadas 3,5 g de amostra umidificada com 10 mL de água mili-Q seguido de agitação em mesa orbital por 15 min à temperatura ambiente. Na etapa de extração foram adicionados 10 mL de acetonitrila seguido de agitação em vórtex por 1 min. Na etapa de partição foram adicionados 4 g de MgSO₄ seco e 1 g de NaCl. Essa mistura foi agitada em vórtex por 1 min, seguido de centrifugação a 3220 g por 5 min. Foram recolhidos 2 mL do sobrenadante e adicionado 0,3 g de MgSO₄ seco e 0,15 g de alumina para a limpeza do extrato. O extrato foi recolhido (1 mL) e seco em banho de areia a 60 °C e posteriormente ressuspensionado na fase móvel (água:acetonitrila 7:3).

Para a determinação dos tricotecenos foi utilizado Cromatógrafo Líquido SHIMADZU (Quioto, Japão) equipado com sistema administrador CBM-20A módulo LC-20A5 e detector DAD 2996, conectado em *software LC solution data acquisition*, injetor Rheodyner loop 20 MI, coluna Gemini C₁₈ 5,0 µM (250x4,6 mm) mantida à temperatura ambiente. A fase móvel foi composta de água:acetonitrila 7:3 v/v em modo isocrático com taxa de vazão de 0,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida de 15 min. O comprimento de onda de 220 nm foi utilizado para determinação dos tricotecenos.

Para o cálculo da contaminação foram utilizadas curvas padrão cujas linearidade foram de 0 a 3 µg mL⁻¹ para DON e NIV. A equação 1 foi utilizada para o cálculo da concentração de DON e a equação 2 para a concentração de NIV.

$$y=37524x-874,9 \quad (1)$$

$$y=15657x+2290 \quad (2)$$

2.3 Análise Estatística

Os níveis de tricotecenos determinados na farinha e nos pães foram analisados pelo software *Statística 7.0 (StatSoft. Inc.)* utilizando teste t a nível de significância de 5 % (p≤0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra o efeito da panificação nos níveis de NIV e DON, aonde se verifica que houve redução significativa nos níveis de tricotecenos da farinha durante a elaboração do pão.

Tabela 1- Efeito da panificação sobre os níveis de NIV e DON originalmente presente na farinha.

Produto	NIV		DON	
	Média ± desvio padrão (µg kg ⁻¹)	Redução (%)	Média ± desvio padrão (µg kg ⁻¹)	Redução (%)
Farinha	7710,85 ± 1275 ^a	-	197,70 ± 15,92 ^a	-
Pão	962,75 ± 165,68 ^b	87,5	119,79 ± 16,55 ^b	39,4

Legenda: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística a 95% de confiança.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

Segundo a legislação vigente (Brasil, 2017) a farinha está apta a ser vendida e consumida, pois o nível de DON está abaixo do que é aceitável ($750 \mu\text{g kg}^{-1}$), salientando-se no entanto, que o NIV não está incluído nessa legislação, mas quando presente em níveis acima do recomendado para DON. A co-ocorrência de DON e NIV foi constatada, assim como em estudo anterior realizado por Del Ponte et al. (2012) sobre a ocorrência de DON e NIV em grãos de trigo no sul do Brasil, com média de concentração de $540 \mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e $337 \mu\text{g kg}^{-1}$ para NIV, níveis estes dentro do estabelecido pela legislação. Em comparação ao atual estudo, a contaminação encontrada pelos autores foi menor, o que pode ser explicado pelas diferentes safras e condições climáticas.

NIV é uma das micotoxinas que necessita de regulação (SCOOP EU, 2003; EFSA, 2013), pois há evidências que NIV inibe a proliferação dos linfócitos humanos, e a interação entre DON e NIV pode resultar em efeitos sinérgicos. Essas informações mostram que são necessários mais estudos sobre a ocorrência de NIV e seus efeitos tóxicos em co-ocorrência com outras micotoxinas, visto que, raramente ele é encontrado sozinho em alimentos.

Segundo Alassane-Kpembé et al. (2013) humanos e animais estão expostos simultaneamente à diversos tricotecenos, e as razões para isso são: 1) a maioria dos fungos do gênero *Fusarium* são capazes de produzir diversas micotoxinas simultaneamente; 2) os alimentos podem ser contaminados por vários fungos simultaneamente ou em uma rápida sucessão de contaminações fúngicas, dependendo das condições climáticas e 3) uma dieta completa inclui diversos tipos de alimentos, podendo todos estarem contaminados por micotoxinas. Também pode ocorrer a exposição à micotoxinas devido ao consumo de alimentos como carne e leite, visto que o animal pode ser alimentado com ração contaminada. Nesse último caso, a micotoxina original pode ser modificada pelo metabolismo animal, chegando ao consumidor em uma forma química diferente da original, porém ainda tóxica. Isso ressalta ainda mais a importância sobre estudos toxicológicos e efeitos sinérgicos dos tricotecenos, e a importância de regulamentar os mais diversos alimentos.

Em relação à mitigação da contaminação durante o processamento, o estudo de Samar et al. (2001) mostrou que ocorria redução de 40% de DON presente em farinha quando era elaborado o pão tipo francês fermentado a 40°C durante 45 min e redução de 36% no pão tipo Vienna quando fermentado a 40°C por 70 min. Esses resultados sugerem que independente do tipo de pão produzido e das condições de preparo utilizados, a concentração inicial de tricotecenos é que vai influenciar a concentração ao final da panificação, e a redução ocorre na etapa de fermentação. No presente estudo, a contaminação só foi verificada após todo o processo de panificação, sendo assim, não é possível identificar se a redução ocorreu durante a fermentação ou assamento. Existe também a possibilidade das micotoxinas analisadas (DON e NIV) terem se convertido em suas formas derivadas, como o 3-ADON e 15-ADON.

Vidal et al. (2015) mostraram a tendência de que quanto maior os níveis iniciais de DON maiores os percentuais de redução atribuindo esta redução a formação de derivados de DON, em geral menos tóxicos. Apesar da semelhança dos nossos resultados, deve-se destacar que o produto estava co-contaminado por DON e NIV, o que gera efeitos sinérgicos, e que se a mesma regulação fosse adotada para o NIV, o produto ainda estaria fora do que atualmente é aceitável pela legislação. Portanto é importante estudar e estabelecer estratégias para minimizar o risco de exposição também ao NIV visto sua toxicidade.

Pacin et al. (2010) ressalta que apesar de seu estudo mostrar baixa exposição da população à DON (6,5 a 0,5%), é preciso lembrar que todos outros alimentos consumidos podem estar contaminados simultaneamente por diversas micotoxinas, portanto é importante estabelecer as melhores condições de preparo do alimento para que a exposição a esses contaminantes seja reduzida.

5. AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento: CAPES e FAPERGS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Alassane-Kpembi, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., Abiola, F.A., Oswald, I.P. & Puel, O. (2013). New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 191-198.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86(2), 412-431.
- Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell Netto, W., & Lima, U. D. A. (2001). Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos.
- Bhatnagar, D.; Yu, J. & Ehrlich, K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology*, 81, 167-206.
- Brasil, Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). *Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação.* (RDC nº 138, de 9 de fevereiro de 2017). Diário Oficial da União.
- Brasil, Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). *Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos.* (RDC nº 262, de 22 de setembro de 2005). Diário Oficial da União.
- Caballero, B., Finglas, P., & Toldrá, F. (2015). *Encyclopedia of food and health.* Academic Press.
- Cauvain, S. P., & Young, L. S. (2009). *Tecnologia da panificação.* Manoele.
- Cauvain, S. P. (2001). Breadmaking. In *Cereals processing technology* (pp. 204-230). Woodhead Publishing.
- Coelho, M. S., & Salas-Mellado, M. M. (2015). Effects of substituting chia (*Salvia hispanica* L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 729-736.
- Del Ponte E. M.; Garda-Bufferon, J. & Badiale-Furlong, E. (2012). Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry*, 132(2).
- EFSA (European food Safety Authority). (2013). *Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed.* EFSA J. 11, 1-119.
- Freire, L. & Sant’ana, A. S. (2018). Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 189-205.
- Guerreiro, L. (2006). Dossiê Técnico: Panificação. *Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas.* Rio de Janeiro.
- Pacin, A.; Bovier, E. C.; Gano, G.; Taglieri, D. & Pezzani, C. H. (2010). Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. *Food Control*, 21, 492-495.
- Samar, M. M.; Neira, M. S.; Resnik, S. L. & Pacin, A. (2001). Effect of fermentation on naturally occurring deoxynivalenol (DON) in Argentinean bread processing technology. *Food Additives and Contaminants*, 18(4), 1004-1010.
- SCOOP European Union. (2003). *Reports on Tasks for Scientific Cooperation* (Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States).
- Sebrae – Serviço de apoio às micro e pequenas empresas Bahia. (2017). Estudo de mercado-indústria: panificação. Disponível em: <https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/BA/Anexos/Ind%20C3%BAstria%20da%20panifica%C3%A7%C3%A3o.pdf>
- Sobrova, P.; Adam, V.; Vasatkova, A.; Beklova, M.; Zeman, L. & Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3, 94-99.
- Van Alfen, N. K. (2014). *Encyclopedia of agriculture and food systems.* Elsevier.
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2015). Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. *Food chemistry*, 178, 276-286.
- Zhang, H. & Wang, B. (2014). Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during wheat milling and Chinese steamed bread processing. *Food Control*, 44, 86-91.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br