

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E FUNGOS EM PÃES COMERCIAIS DE CHAPECÓ/SC

E. Sonza<sup>1</sup>, G. L. Girardi<sup>2</sup>, E. R. Favero<sup>3</sup>, D. Martini<sup>4</sup>, J. Pigatto<sup>5</sup>, J. B. da Silva<sup>6</sup>

1 - Faculdade SENAI Chapecó. Serviço - Nacional de Aprendizagem Industrial de Santa Catarina, Graduação Tecnológica em Alimentos - CEP: 89803-800 – Chapecó – SC – Brasil, Telefone: (49) 3321-7300 e-mail: ([elisasonza@edu.sc.senai.br](mailto:elisasonza@edu.sc.senai.br))

2 - Faculdade SENAI Chapecó. Serviço - Nacional de Aprendizagem Industrial de Santa Catarina, Graduação Tecnológica em Alimentos - CEP: 89803-800 – Chapecó – SC – Brasil, Telefone: (49) 3321-7300 e-mail: ([guilherme.luiz@sc.senai.br](mailto:guilherme.luiz@sc.senai.br))

3 - Faculdade SENAI Chapecó. Serviço - Nacional de Aprendizagem Industrial de Santa Catarina - Graduação Tecnológica em Alimentos - CEP: 89803-800 – Chapecó – SC – Brasil, Telefone: (49) 3321-7300 e-mail: ([ellisfavero@gmail.com](mailto:ellisfavero@gmail.com))

4 – 3M do Brasil. Via Anhanguera, s/n - Nova Veneza, Sumaré - SP, 13181-900 Telefone: (49) 3321-7300 e-mail: ([enaiadmartini@gmail.com](mailto:enaiadmartini@gmail.com))

5 - Faculdade SENAI Chapecó. Serviço - Nacional de Aprendizagem Industrial de Santa Catarina - Graduação Tecnológica em Alimentos - CEP: 89803-800 – Chapecó – SC – Brasil, Telefone: (49) 3321-7300 e-mail: ([jocepigatto@gmail.com](mailto:jocepigatto@gmail.com))

6 - Faculdade SENAI Chapecó. Serviço - Nacional de Aprendizagem Industrial de Santa Catarina, Graduação Tecnológica em Alimentos - CEP: 89803-800 – Chapecó – SC – Brasil, Telefone: (49) 3321-7300 e-mail: ([josi@sc.senai.br](mailto:josi@sc.senai.br))

**RESUMO** – Os grãos como o trigo, podem apresentar a presença de fungos, as condições de armazenamento podem aumentar ainda mais os níveis de contaminações e a produção de micotoxinas. A deoxinivalenol (DON), é metabólito secundário produzido por fungos e têm efeitos adversos à saúde do homem. O objetivo do estudo, foi a quantificação de fungos e micotoxinas DON nos pães comercializados na cidade de Chapecó/SC. Analisou-se 42 amostras: pães tradicionais, integral e 12 grãos fatiados, pela técnica de bolores e leveduras AOAC, 997.02 (2012) e a quantificação de DON com kit de teste AgraQuant® da Romer Labs, por leitor ELISA. Os resultados para bolores e leveduras variaram de < 1,00 a 6,20 UFC/g em log<sub>10</sub>, e para o tricoteceno DON entre <200 µg/kg e 1270 µg/kg. Diante dos resultados encontrados, observa-se que o monitoramento de fungos e micotoxinas faz-se necessária para a segurança de alimentos.

**ABSTRACT** – Grains such as wheat, may have the presence of fungi, storage conditions can further increase the levels of contamination and the production of mycotoxins. Deoxynivalenol (DON), is a secondary metabolite produced by fungi and has adverse effects on human health. The objective of the study was the quantification of fungi and mycotoxins DON in breads sold in the city of Chapecó / SC. 42 samples were analyzed: traditional breads, wholegrain and 12 sliced grains, using the AOAC mold and yeast technique, 997.02 (2012) and the quantification of DON with Romer Labs' AgraQuant® test kit, by ELISA reader. The results for molds and yeasts ranged from <1.00 to 6.20 CFU / g in log<sub>10</sub>, and for trichothecene DON between <200 µg / kg and to 1270 µg / kg. In view of the results found, it is observed that the monitoring of fungi and mycotoxins is necessary for food safety.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



[www.officeeventos.com.br](http://www.officeeventos.com.br)

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

PALAVRAS-CHAVE: Deoxynivalenol; Segurança de Alimentos; Contaminação.

KEYWORDS: Deoxynivalenol; Food Safety; Contamination.

## 1. INTRODUÇÃO

O trigo cultivado no Brasil pertence à espécie *Triticum aestivum*, sendo consumido em maior quantidade. Na colheita os principais cuidados devem ser a umidade dos grãos, observando-se durante a colheita se há áreas com crescimento fúngico (CIÊNCIA RURAL, 2009). No armazenamento, a umidade dos grãos e temperatura são um ponto crítico, visto que a umidade deve ser inferior a 13%, monitorando-se sempre a temperatura no interior dos silos, evitando-se a proliferação de fungos, além de reduzir do metabolismo do grão. A aeração, da massa de grãos permite a renovação do ar e pode controlar temperatura e a umidade (EMBRAPA, 2017). É fundamental manter a integridade dos grãos, pois quando danificado, estes podem hospedar maior número de esporos de fungos e de bactérias, acelerando as perdas (CIÊNCIA RURAL, 2009; EMBRAPA, 2017). Toda a produção e também o que é importado, segue para moinhos, onde é realizado o beneficiamento.

A obtenção da farinha de trigo ocorre pelo processo de moagem do grão, dando origem a dois produtos, a farinha cerca de 75 % e o farelo 25%. No Brasil, segundo Instrução Normativa nº 08 de 2005 do MAPA, as farinhas são classificadas em três tipos, sendo elas: Tipo 1, tipo 2 e integral, de acordo com o teor de cinzas, que nada mais é do que o resíduo mineral fixo. A Tipo 1 é produzida a partir da moagem do miolo do grão com um mínimo de farelo da casca, seu teor máximo de cinzas permitido é 0,8%. A do Tipo 2, é extraída da parte mais externa do grão do trigo, tem seu teor de cinzas máximo fixado em 1,4%, devido à extração maior, apresenta uma coloração mais escura e amarelada, possui grãos mais grossos e absorve menor quantidade de água. Já a farinha integral é feita a partir da moagem do grão completo, por isso tem alta quantidade de fibras que promove maior absorção de água, e o teor máximo permitido de cinzas é de 2,5% (ABITRIGO, 2017).

A qualidade dos pães é muito importante, desde coloração de casca, crocância, maciez, coloração do miolo, tamanho e outras características. Por outro lado, por não ser visual, a contaminação principalmente da matéria-prima seca espalha-se facilmente pela produção. A contaminação microbiológica dá-se por fungos que são oriundos principalmente do ar e dos grãos. O ponto de controle crítico é após o forneamento, onde podem ser recontaminados, já que o calor os elimina (CAUVAIN, 2009).

Cauvain (2009), reitera ainda que a contaminação é mais comum em pães fatiados e embalados, ainda mais se forem acondicionados quentes devido a formação de gotículas, já que o fatiamento expõe o miolo e a embalagem impede a perda de umidade.

Na indústria é importante realizar o monitoramento, seja por controle ambiental ou swabs, pois trata-se de microrganismos que são indicadores da qualidade e segurança dos alimentos (ZANATTA; SCHLABITZ; ETHUR, 2010). De modo geral os fungos são inofensivos à saúde humana e animal, mas em certas ocasiões alguns gêneros de bolores tem a capacidade de produzir micotoxinas. Embora não há correlação direta entre o crescimento fúngico e a síntese de micotoxinas, a prevenção do crescimento dos mesmos é eficaz no acúmulo desses metabólitos tóxicos (ALVES, 2014). A produção de micotoxinas pode estar presente, mesmo que não apresente mais contagens de fungos no alimento (TANIWAKI e SILVA, 2001).

O Deoxynivalenol (DON) é um tricoteceno, encontrado com frequência em milho, aveia, cevada, centeio, sementes de girassol e trigo. Os tricotecenos constituem uma família de cerca de 200 metabólitos produzidos principalmente por espécies do gênero *Fusarium* (FARIAS, 2016). Os *F. graminearum* e *F. culmorum* são as principais fontes de DON, ocorrendo predominantemente no milho e cereais. Segundo MURPHY et al. (2006), o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a presença de micotoxinas em grãos de trigo e em seus derivados é comumente observada. Desta forma, o objetivo do trabalho foi realizar a quantificação de fungos e micotoxinas DON nos pães comercializados na cidade de Chapecó/SC.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta das amostras

Os pães amostrados foram coletados em mercados e panificadoras na cidade de Chapecó/SC. Um total de 42 amostras foram coletadas, compreendendo 7 amostras de cada tipo de pães em duplicata (contemplando mesmo lote e marca), totalizando 14 amostras cada tipo: fatiados tradicional, fatiados integrais e fatiados 12 grãos. As amostras foram armazenadas até o quinto dia após a fabricação e/ou 5 dias após a aquisição e ainda respeitando o prazo de validade, para início das análises.

### 2.2 Quantificação de bolores, leveduras e micotoxina DON

Realizou-se análise microbiológica de contagem de bolores e leveduras pela técnica de Petrifilm seguindo metodologia AOAC, 997.02 (2012). Pesou-se  $25 \pm 0,2$  g da amostra, adicionou-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, homogeneizou-se por 60 segundos em homogeneizador tipo stomacher (AES/Smasher) e efetuou-se cinco diluições. Utilizou-se o Petrifilm YM, para bolores e leveduras, dispensando-se 1 mL de inóculo, com posterior incubação em estufa regulada (Binder/FED 056) a  $25 \pm 1$  °C por 5 dias.

Para análise de micotoxinas as amostras de pães foram avaliadas com uso do kit de teste AgraQuant® da Romer Labs, validado pela AOAC Performance Tested certificado n° 110701, por leitor ELISA (Star Fax/4700) de limite de detecção 200 ppb. O kit de teste apresenta um conjunto de 5 padrões, uma solução de lavagem, uma placa de diluição, um conjugado, uma placa revestida de anticorpos, um substrato e uma solução de parada.

A unidade analítica amostrada conforme protocolos desta metodologia foi de 20 g de pão, diluídas em 100 mL de água destilada, homogeneizadas em agitador tipo stomacher por 3 minutos. Filtrou-se em recipiente adequado com auxílio de papel filtro e a partir do filtrado realizou-se uma diluição 1:4 sendo 1 mL do filtrado e 3 mL de água destilada. Pipetou-se 200µL de conjugado dentro dos poços da placa de diluição, adiciona-se 100µL de cada amostra, misturou-se bem e transferiu-se 100 µl do (conjugado/amostra) para poços da placa revestida de anticorpos e aguardou-se por 15 minutos cobrindo-os com folha de alumínio. Descartou-se o conteúdo dos poços, e procedeu-se a lavagem por 5 vezes com solução de lavagem diluída em 500ml de água destilada, bateu-se os poços em papel para deixá-los secos. Adicionou-se 100µL do substrato nos poços de anticorpo, aguardando 5 minutos e em seguida adicionou-se a solução de parada. Após inserir os poços, efetua-se a leitura com leitor ELISA usando filtro de 450 nm e filtro diferencial de 630 nm, obtendo-se os resultados em ppm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para bolores e leveduras estão apresentados na Tabela 01. As amostras dos pães fatiados tradicionais foram as que menos apresentaram crescimento, ou seja, contaminação, seguidos dos integrais e dos 12 grãos.

Tabela 1: Resultados das análises microbiológicas de bolores e leveduras.  
Contagem de Bolores e Leveduras (UFC/g em  $\log_{10}$ )

Tipos de pães	Pão Fatiado Tradicional		Pão Fatiado Integral		Pão Fatiado 12 Grãos	
		4,15	<1,00	4,90	5,08	5,58
	<1,00	2,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00
	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	1,00	1,70

	2,65	<1,00	<1,00	<1,00	1,30	<1,00
	2,96	<1,00	2,40	<1,00	3,60	6,20
	<1,00	<1,00	4,28	5,49	<1,00	<1,00
	<1,00	2,08	2,08	1,60	3,40	<1,00
Média		0,99 <sup>a</sup>		1,85 <sup>b</sup>		1,86 <sup>b</sup>
CV(%)		1,48		1,20		1,17

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor, 2017.

Com teste ANOVA com 95% de significância realizado pelo software Excel, pode observar-se que existe diferença estatística entre os grupos de pães fatiados tradicionais e fatiados integrais, e entre os tradicionais e o grupo 12 grãos também há diferença. Já entre o grupo dos pães integral e 12 grãos não há diferença estatística.

Há essa diferença por que os pães tradicionais são fabricados com farinha tipo 1, que é extraída do centro do grão. No entanto os pães integrais são produzidos com farinha integral, e está sendo obtida do grão inteiro apresenta índices maiores de fungos, por que estão principalmente sobre a superfície do mesmo. Já o grupo de pães 12 grãos, por apresentar maior quantidade de cereais (grãos) em sua composição, aumentando as fontes de contaminação fúngica.

Do total das 42 amostras, 10 apresentaram contagens acima 3,00 UFC/g em log<sub>10</sub>, no entanto a legislação vigente RDC n° 12 de 2001 (BRASIL, 2001) não traz limite máximo para bolores e leveduras em cereais e seus derivados.

Resultados próximos aos encontrados nesta pesquisa também foram quantificados por Neves (2014), em pão francês, com média de 2,56 UFC/g em log<sub>10+1</sub> e por Alves (2014), em pão tipo *hot-dog*, onde a média de um de seus resultados também ficou acima de 3,00 UFC/g em log<sub>10</sub>.

Cast (2003) considera que valores superiores a 3,00 UFC/g em log<sub>10</sub> em alimentos são elevados. Caso ocorra um aumento da umidade, os bolores filamentosos e leveduras presentes nos pães podem se desenvolver e ainda, produzir as micotoxinas. Desse modo torna-se o tratamento térmico (cocção) dos pães ineficiente.

Referente as micotoxinas os resultados foram obtidos em ppm e aqui apresentados em µg/kg, unidade utilizada pela legislação vigente. Os 26 resultados encontrados para DON estão dispostos na Tabela 02, e passaram pelo mesmo tratamento estatístico das análises de bolores e leveduras.

Tabela 2: Resultados das análises de micotoxina DON.

Valores de DON em µg/kg

Tipos de pães	Pão Fatiado Tradicional		Pão Fatiado Integral		Pão Fatiado 12 Grãos	
	590	*	380	390	240	590
*	*	*	*	520	430	
360	380	*	*	*	360	
340	710	*	*	610	360	
830	970	1270	730	*	750	
<200	*	840	860	*	*	
590	540	*	*	650	280	
Média		551 <sup>a</sup>		745 <sup>b</sup>		479 <sup>c</sup>
Desvio Padrão		239,28		333,87		170,39
CV(%)		0,44		0,45		0,36

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.






---

\* Resultado inconclusivo.

---

Fonte: Do autor, 2017.

Todas as amostras cujo resultado pode ser concluído, apresentaram algum grau de contaminação por micotoxina DON. O menor resultado foi de  $<200 \mu\text{g}/\text{kg}$  e o maior  $1270 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Perante a legislação (ANVISA, 2017) 5 amostras ficaram acima do limite máximo tolerado que é de  $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Diferença estatística entre os três diferentes grupos de pães foram observadas, demonstrando um percentual maior de DON no grupo de pães integral, seguido pelos pães tradicionais e por último os pães 12 grãos.

No estudo feito na cidade de Ponta Grossa - PR, em pães brancos e integrais todos apresentaram contaminação por micotoxina DON semelhante aos resultados obtidos nesta pesquisa, onde variou de  $49,2$  a  $1294,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ . A média de para os pães brancos foi de  $393,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  e integrais de  $183,8 \mu\text{g}/\text{kg}$  (GOES; AYALA, 2013). Observando o conjunto de dados adquiridos (tabela 1 e 2), parece não haver relação entre crescimento de bolores nos pães e a presença de micotoxinas.

A décima amostra de pão fatiado tradicional não apresentou crescimento de bolores e leveduras, no entanto foi detectada a presença de DON em  $970 \mu\text{g}/\text{kg}$ , e também a décima amostra de pão 12 grãos a contagem de bolores foi de  $6,20 \text{ UFC}/\text{g}$  em  $\log_{10}$  e DON de  $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ , resultado esperado pois a detecção de fungos não implica na presença de micotoxinas. Porque, nem todas as cepas de uma espécie micotoxigênica são capazes de sintetizá-las (GARCIA, 2009).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As práticas sanitárias e controles ambientais são necessárias em toda a cadeia de produção do trigo e seus derivados, devido aos fungos estarem amplamente distribuídos no ambiente e matérias-primas, evitando sua suscetibilidade nas etapas finais de produção do cereal, visto que já se encontra próximo ao consumidor. Com o potencial micotoxigênico desses microrganismos, e os efeitos severos que estes compostos produzidos por eles causam ao homem, é de suma importância realizar análises de monitoramento, mas não somente de DON, como também da quantificação de fungos, visto que o pão é consumido diariamente pela população.

Diante dos resultados encontrados ressalta-se que o trigo e seus derivados, cereais e outros alimentos estão sujeitos a contaminação por fungos e micotoxinas. Então sugere-se um estudo mais amplo em relação aos fungos e micotoxinas em pães e outros derivados do trigo englobando a cadeia toda de produção ao qual possa determinar melhor a sua ocorrência.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abitrigo - Associação brasileira da indústria do trigo. *Trigo. O trigo na história*. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/trigo.php>. Acesso em: 17 fev. 2020.

Alves, Verbena Carvalho. *Aspectos micológicos e micotoxicológicos de pães tipo hot-dog influenciados pela qualidade da farinha de trigo*. 2014. N° páginas 59. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, 2014.

AOAC, Official Method 997.02 *Yeast and Mold Counts in Foods Dry Rehydratable Film* (Method Petrifilm TM) 19th Edition. 2012 p. 19.

AOAC, Certification AOAC® Performance Tested. Certificate N°.: 110701. The AOAC Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit known as: AgraQuant® Deoxynivalenol (DON) Assay.

Brasil. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC n° 138 de 08 de fevereiro de 2017*. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 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.

Cast - Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems*. Task Force Report n 139, Ames, Iowa, USA, 2003.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

## 7º Simpósio de Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Cauvain, Stanley P. *Tecnologia da panificação*. 2. ed. São Paulo (SP): Manole, 2009. 418 p.  
Ciência Rural, Santa Maria, v.44, n.4, p.699-705, abr, 2014.
- Embrapa Trigo - *Sistema de Produção do trigo*. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/publicacoes/sist-prod/trigo-sul02/trigo9-3.htm>. Acesso em: 05 fev. 2020.
- Farias, Chaiane Quevedo de. *Avaliação do risco relacionado à exposição a micotoxinas através do consumo de derivados de trigo*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade federal do rio grande do Sul faculdade de medicina graduação em nutrição, Porto Alegre, 2016.
- Garcia, D. et al. *Predicting mycotoxins in foods: a review*. Food Microbiology, v. 26, n. 8, p. 757-769, 2009.
- Gimeno, A.; Martins, M. L. *Micotoxinas e Micotoxicosis em Animales y humanos*. 3 eds. USA: Especial Nutrients Inc, 2011. 130 p. Disponível em: <http://www.specialnutrients.com/pdf/book/3%20edicion%20MICOTOXINAS%20LR20Secure.pdf> Acesso em: 10 fev. 2020.
- Goes, Márcia Mayer de; Ayala, Luis Alberto Chavez. *Determinação de Micotoxina Desoxinivalenol (Don) em Pães Brancos e Integrais Comercializados na Cidade de Ponta Grossa – Pr.* 2013. Disponível em: [http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/110\\_20142111\\_02-02-47\\_3012.pdf](http://eventos.abrapos.org.br/anais/paperfile/110_20142111_02-02-47_3012.pdf). Acesso em: 15 fev. 2020.
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C. M. *Food Mycotoxins: An Update*. Journal of food science. v. 71, p. 51-65, 2006.
- Neves, Josyanne Araújo. *Interferência da farinha de trigo na qualidade micológica e micotoxicológica do pão tipo francês*. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Teresina - PI, 2014.
- Taniwaki, M. H.; Silva, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas, ITAL, Núcleo de Microbiologia, p. 82, 2001.
- Zanatta, Caroline Lima; Schlabit, Cláudia; Ethur, Eduardo Miranda. *Avaliação físico-química e microbiológica de farinhas obtidas a partir de vegetais não conformes à comercialização*. Alim. Nutr. Araraquara v.21, n.3, p.459-468, jul./set. 2010.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



[www.officeeventos.com.br](http://www.officeeventos.com.br)