



FURG

Tese de Doutorado

**MICOTOXINAS EM INSUMO E PRODUTO CERVEJEIRO:
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO E
APLICAÇÃO DE ADSORVENTES ALTERNATIVOS**

Elisa Rosa Seus Arraché

Eng.^a MSc. em Química Tecnológica e Ambiental

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

MICOTOXINAS EM INSUMO E PRODUTO CERVEJEIRO: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO E APLICAÇÃO DE ADSORVENTES ALTERNATIVOS

por

Elisa Rosa Seus Arraché

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2019

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

**MICOTOXINAS EM INSUMO E PRODUTO CERVEJEIRO:
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO E
APLICAÇÃO DE ADSORVENTES ALTERNATIVOS**

elaborada por

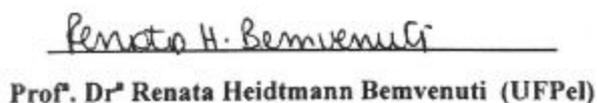
Elisa Rosa Seus Arraché

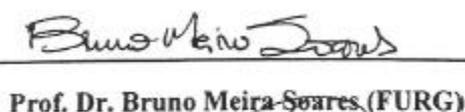
Como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Química

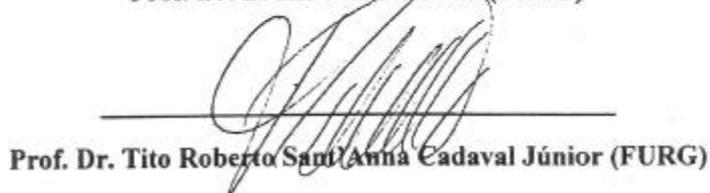
COMISSÃO EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Jaqueline Garda Buffon (FURG)
(Presidente-Orientadora)


Prof.^a Dr.^a Juliane Elisa Welke (UFRGS)


Prof.^a Dr.^a Renata Heidtmann Bemvenuti (UFPEl)


Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG)


Prof. Dr. Tito Roberto Sant'Anna Cadaval Júnior (FURG)

Rio Grande, 10 de julho de 2019.

*Dedico à minha filha Ana Laura,
com todo o meu amor!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Udo** e **Lígia**, ao meu marido **Maicon** e ao meu irmão **Vinícius**, pelo apoio, dedicação, carinho e confiança em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional. Essa vitória é por vocês!!

Aos demais familiares pelo apoio e incentivo!

À minha orientadora professora **Jaqueline Buffon**, profissional dedicada, obrigada por tudo durante estes 6 anos de convivência: pelas orientações, pelas conversas, pela amizade, pelo incentivo e ensinamentos durante o trabalho. És um exemplo para mim!!!

À professora **Eliana Furlong** agradeço pela receptividade no laboratório, por toda a ajuda durante o desenvolvimento do trabalho e os ensinamentos durante toda a minha trajetória acadêmica.

Aos professores **Renata Bemvenuti**, **Tito Roberto** e **Bruno Meira** pelas valiosas e importantes sugestões no exame de qualificação. Obrigada!

Aos membros da banca, prof^a. **Juliane Welke**, prof^a. **Renata Bemvenuti**, prof. **Tito Roberto** e prof. **Bruno Meira** por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

Aos colegas e professores do **Laboratório de Geoquímica (IO – FURG)** meu agradecimento especial, sem o apoio de vocês eu não conseguiria realizar esse trabalho. Obrigada especialmente ao prof. **Nicolai Mirlean**, prof. **Paulo Baisch**, **Guilherme**, **Márcio** e **Larissa** por toda a ajuda, amizade, conversas e incentivo nos momentos bons e ruins. Obrigada!!

Aos meus colegas e amigos **Maicon**, **Diean** e **Carmem**, agradeço por toda a ajuda, dedicação e amizade de vocês!!! Sem vocês eu não teria conseguido!! Muito obrigada!!!! Saibam que guardarei para sempre essas lembranças!

Às amigas **Ana**, **Sabrina**, **Milena**, **Karen**, **Kelly**, **Priscila**, **Naralice** e **Anelise** pela amizade, pelas conversas descontraídas e por toda ajuda nos experimentos e nos trabalhos! Obrigada gurias!!

À **Maristela** pelas palavras de carinho, pela dedicação ao laboratório e pela troca de experiência!

Aos demais colegas de laboratório, **Wesclen**, **Marcy**, **Verônica**, **Keven**, **Xicão**, **Larine**, **Gabi**, **Tai**, **Eliza**, **Cíntia**, **Rafaela**, **Frã** e **Carol** agradeço pela ótima convivência!!

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental – FURG pela convivência, disponibilidade e ensinamentos desenvolvidos ao longo do curso.

À **Rosane**, secretária do PPGQTA, por toda a disponibilidade e atenção necessárias.

À **FURG** pela oportunidade, por proporcionar um ensino gratuito e de qualidade.

Agradeço à **Deus** por colocar todas estas pessoas no meu caminho e por me amparar nos momentos felizes e difíceis, dando-me forças para continuar sempre e concluir este trabalho.

E por fim, agradeço a todos que torceram por mim. Obrigada!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1 CEVADA.....	24
3.2 PROCESSAMENTO CERVEJEIRO.....	26
3.3 PRINCIPAIS CONTAMINANTES DA CEVADA E CEREAIS ADJUNTOS.....	30
3.4 MICOTOXINAS.....	32
3.4.1 Tricotecenos.....	33
3.4.1.1 <i>Tipo A</i>	34
3.4.1.2 <i>Tipo B</i>	36
3.4.2 Zearalenona.....	36
3.4.3 Ocratoxina A.....	38
3.5 LEGISLAÇÃO PARA MICOTOXINAS EM ALIMENTOS.....	39
3.6 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM CEREAIS ADJUNTOS, CEVADA E CERVEJA.....	41
3.7 DETERMINAÇÕES DE MICOTOXINAS.....	46
3.7.1 QuEChERS.....	48
3.7.2 Dispersão da Matriz em Fase Sólida – MSPD.....	51
3.8 DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS CONTENDO MICOTOXINAS.....	53
3.8.1 Métodos Biológicos.....	53
3.8.2 Métodos Químicos.....	54
3.8.3 Métodos Físicos.....	56

3.8.3.1	<i>Classificação</i>	56
3.8.3.2	<i>Descascamento</i>	56
3.8.3.3	<i>Moagem</i>	57
3.8.3.4	<i>Tratamento Térmico</i>	58
3.8.3.5	<i>Adsorção</i>	58
4.	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1	MATERIAL.....	62
4.1.1	Amostras	62
4.1.2	Suportes Sólidos	63
4.1.3	Preparo dos padrões das micotoxinas em estudo	63
4.1.4	Instrumentação	64
4.1.5	Reagentes e Solventes	65
4.2	MÉTODOS.....	66
4.2.1	Adequação da separação cromatográfica e quantificação dos Tricotecenos, Zearalenona e Ocratoxina A	66
4.2.2	Preparo de Amostra	68
4.2.3	Procedimentos para extração de micotoxinas na cerveja	68
4.2.3.1	<i>QuEChERS</i>	68
4.2.3.2	<i>Partição Líquido-Líquido com acetato de etila</i>	69
4.2.3.3	<i>Partição Líquido-Líquido com cloreto de metileno</i>	69
4.2.3.4	<i>Extração em Fase Sólida (SPE)</i>	69
4.2.4	Avaliação do procedimento de extração QuEChERS	69
4.2.5	Ingestão diária tolerável	71
4.2.6	Preparo da casca de arroz para os ensaios de adsorção	71
4.2.7	Caracterização da casca de arroz	72
4.2.8	Ensaio do método para redução dos níveis das micotoxinas em cerveja utilizando a casca de arroz como adsorvente	73
4.2.9	Cinética de adsorção	74
4.2.10	Técnica de preparo de amostra MSPD	76
4.2.10.1	<i>Avaliação da MSPD utilizando diferentes suportes sólidos para extração de micotoxinas</i>	76
4.2.10.2	<i>Padronização e validação da técnica de extração MSPD</i>	77
4.2.11	Análise Estatística	78
4.2.12	Limpeza e gerenciamento de resíduos	78

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	79
5.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRICOTECENOS A E B POR HPLC-UV, ZEARALENONA E OCRATOXINA A POR HPLC-FL.....	79
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA PROPOSTAS PARA A DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS NA CERVEJA.....	82
5.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE MULTIMICOTOXINAS EM CERVEJA.....	83
5.3.1 Validação do método analítico QuEChERS padronizado	91
5.3.2 Ocorrência de micotoxinas em cerveja	92
5.3.3 Estimativa da ingestão diária de micotoxinas no consumo de cerveja industrializada	98
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ.....	99
5.4.1 Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	101
5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR	103
5.5 ENSAIO DO MÉTODO PARA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DAS MICOTOXINAS EM CERVEJA UTILIZANDO A CASCA DE ARROZ COMO ADSORVENTE.....	104
5.5.1 Cinética de Adsorção	105
5.5.2 Aplicação da casca de arroz como um potencial adsorvente de micotoxinas durante o processo cervejeiro	112
5.6 ESTUDO DA TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRA MSPD UTILIZANDO DIFERENTES SUPORTES SÓLIDOS.....	112
5.6.1 Padronização da técnica de extração MSPD utilizando casca de arroz tratada como suporte sólido	114
5.6.2 Ocorrência de micotoxinas em cevada malteada	123
6. CONCLUSÕES	126
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	128
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processamento cervejeiro.....	27
Figura 2. Estruturas químicas de grupos de tricotecenos. a: Tipo A; b: Tipo B; c: Tipo C; d: Tipo D.....	34
Figura 3. Estruturas químicas de nivalenol (NIV); deoxinivalenol (DON); 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON); 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON).....	35
Figura 4. Estrutura química da Zearalenona (ZEN).....	37
Figura 5. Estrutura química da Ocratoxina A (OTA).....	38
Figura 6. Eluição cromatográfica em HPLC-UV dos padrões de tricotecenos.....	79
Figura 7. Eluição cromatográfica em HPLC-FL de zearalenona.....	81
Figura 8. Eluição cromatográfica em HPLC-FL de ocratoxina A.....	82
Figura 9. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação de DON no método QuEChERS adaptado.....	88
Figura 10. Superfície de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação de ZEN no método QuEChERS adaptado.....	89
Figura 11. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação de OTA no método QuEChERS adaptado.....	89
Figura 12. Eluição cromatográfica em HPLC-UV dos padrões de tricotecenos na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e de uma amostra contaminada com NIV, DON e ADONS na média de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b).....	93
Figura 13. Eluição cromatográfica em HPLC-FL do padrão de ZEN 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e de uma amostra contaminada com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ZEN (b).....	96

Figura 14. Eluição cromatográfica em HPLC-FL do padrão de ocratoxina A $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e de uma amostra contaminada com $2 \mu\text{g L}^{-1}$ OTA (b).....	97
Figura 15. Estrutura da casca de arroz tratada com granulometria de 0,5 mm.....	102
Figura 16. Espectro de infravermelho da casca de arroz (a) e espectro de infravermelho da sílica extraída da casca de arroz (b).....	103
Figura 17. Capacidade de adsorção de DON sobre a casca de arroz.....	105
Figura 18. Capacidade de adsorção de ZEN sobre a casca de arroz.....	107
Figura 19. Capacidade de adsorção de OTA sobre a casca de arroz.....	108
Figura 20. Remoção de DON (%), ZEN (%) e OTA (%) presentes na cerveja ao longo do tempo utilizando a casca de arroz como adsorvente.....	109
Figura 21. Gráficos de ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem para DON, ZEN e OTA adsorvidas sobre a casca de arroz.....	111
Figura 22. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para variável recuperação de NIV (%) na técnica MSPD.....	117
Figura 23. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação DON (%) na técnica MSPD.....	118
Figura 24. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável recuperação de ADONS (%) na técnica MSPD.....	119
Figura 25. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável recuperação de T2 (%) na técnica MSPD.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais micotoxinas, espécies fúngicas produtoras e substratos e seus efeitos tóxicos.....	33
Tabela 2. Características estruturais dos principais tricotecenos dos grupos A e B.....	35
Tabela 3. Limites Máximos Tolerados (LMTs) da presença de DON em alimentos.....	40
Tabela 4. Limites Máximos Tolerados (LMTs) da presença de ZEN em alimentos.....	41
Tabela 5. Ocorrência de micotoxinas nos principais cereais adjuntos à produção cervejeira.....	42
Tabela 6. Ocorrência mundial das principais micotoxinas encontradas em grãos de cevada e malte de cevada.....	43
Tabela 7. Ocorrência mundial de micotoxinas em cervejas.....	44
Tabela 8. Condições cromatográficas empregadas para determinação de tricotecenos A e B.....	79
Tabela 9. Parâmetros avaliados para separação dos analitos.....	80
Tabela 10. Condições cromatográficas empregadas para determinação de zearalenona.....	81
Tabela 11. Condições cromatográficas empregadas para determinação de ocratoxina A.....	82
Tabela 12. Recuperação de tricotecenos, ZEN e OTA para as quatro técnicas de preparo de amostra propostas.....	83
Tabela 13. Matriz do DCC 2 ³ com as variáveis e níveis avaliados em função da porcentagem de recuperação para cada micotoxina utilizando o método QuEChERS adaptado.....	84

Tabela 14. Efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão do DCC 2 ³ em relação as variáveis e interações significativas para os resultados de recuperação de NIV, DON, ADONS, T2, ZEN e OTA utilizando o método QuEChERS adaptado.....	86
Tabela 15. Resultados de recuperação para as micotoxinas em estudo utilizando o método QuEChERS adaptado.....	90
Tabela 16. Valores dos parâmetros de linearidade avaliados para validação do método analítico QuEChERS – HPLC – UV/FL.....	91
Tabela 17. Validação do método QuEChERS padronizado para as amostras de cerveja: Limite de detecção do método (LOD) e limite de quantificação do método (LOQ); Efeito Matriz (%); Porcentagens de recuperação (3 níveis), precisão avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária em nível baixo (5 µg L ⁻¹) e nível alto (20 µg L ⁻¹) para OTA e nível baixo (25 µg L ⁻¹) e nível alto (100 µg L ⁻¹) para tricotecenos e ZEN.....	92
Tabela 18. Ocorrência de micotoxinas em amostras de cerveja Lager (n=85) comercializadas na região Sul do Brasil.....	95
Tabela 19. Composição proximal da casca de arroz controle (sem tratamento prévio) e tratada na fração peneirada 0,5 mm.....	99
Tabela 20. Composição das cinzas da casca de arroz tratada.....	100
Tabela 21. Composição química da casca de arroz.....	101
Tabela 22. Estimativa da quantidade adsorvida de DON, ZEN e OTA sobre 0,5 g de casca de arroz tratada.....	104
Tabela 23. Capacidade adsortiva de DON, ZEN e OTA da casca de arroz em função do tempo.....	106
Tabela 24. Parâmetros de ajuste dos modelos cinéticos para adsorção de DON, ZEN e OTA por casca de arroz.....	110
Tabela 25. Recuperações dos tricotecenos, ZEN e OTA utilizando diferentes suportes sólidos na técnica MSPD.....	114

- Tabela 26.** Matriz do DCC 2³, com variáveis e níveis avaliados em função da recuperação (%) dos tricotecenos, ZEN e OTA utilizando a técnica MSPD com casca de arroz tratada.....115
- Tabela 27.** Efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão do DCC 2³ em relação as variáveis significativas para os resultados de recuperação de NIV, DON, ADONS, T2, ZEN e OTA utilizando a técnica MSPD com casca de arroz tratada.....116
- Tabela 28.** Resultados das recuperações para as micotoxinas em estudo utilizando o método MSPD padronizado com casca de arroz tratada.....121
- Tabela 29.** Validação do método MSPD adaptado para uso com a casca de arroz tratada como adsorvente: limite de detecção do método (LOD) e limite de quantificação do método (LOQ), efeito matriz (%), porcentagem de recuperação (média dos três níveis), precisão avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária (% RSD) em nível baixo (50 µg kg⁻¹) e em nível alto (200 µg kg⁻¹) para os tricotecenos e ZEN e nível baixo (5 µg kg⁻¹) e nível alto (20 µg kg⁻¹) para OTA.....122
- Tabela 30.** Ocorrência de micotoxinas em cevada malteada aplicando a técnica MSPD com casca de arroz tratada como suporte sólido.....124

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. α , Fator de separação
2. ϵ , Absortividade molar
3. 3-ADON, 3-Acetildeoxinivalenol
4. 15-ADON, 15-Acetildeoxinivalenol
5. a , velocidade inicial
6. b , constante de desorção
7. Abs, Absorvância
8. ADONS, erivados acetilados de DON (3-ADON e 15-ADON)
9. AFB₁, Aflatoxina B₁
10. AFLA G1, Aflatoxina G1
11. AFLA G2, Aflatoxina G2
12. AFM₁, Aflatoxina M₁
13. ANOVA, Análise de Variância
14. b , Largura da cubeta
15. C , Concentração final do analito
16. C_0 , Concentração inicial do analito
17. C_t , Concentração no tempo t
18. C8, Sílica modificada com hidrocarboneto linear C8
19. C18, Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
20. CE, Comissão Européia
21. DAS, Diacetoxiscirpenol
22. DCC, Delineamento composto central
23. DON, Deoxinivalenol
24. EM, Efeito Matriz
25. E.U.A., Estados Unidos da América
26. F, teste de Fischer
27. FB₁, Fumonisina B₁
28. FB₂, Fumonisina B₂
29. Fc, Fator de correção

30. FL, Fluorescência
31. FURG, Universidade Federal do Rio Grande
32. FTIR, Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier acoplada a sistema de reflectância total atenuada, do inglês *Fourier Transform Infrared spectroscopy*
33. HPLC, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*
34. HT-2, toxina HT-2
35. IARC, Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*
36. ID, Ingestão Diária
37. IDT, Ingestão Diária Tolerável
38. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
39. IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
40. JEFCA, Comitê Misto de Peritos FAO/OMS sobre Aditivos Alimentares, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*
41. k , fator de retenção
42. k_1 , fator de retenção do primeiro composto
43. k_2 , fator de retenção do segundo composto
44. k_1 , constante cinética de pseudo-primeira ordem
45. k_2 , constante cinética de pseudo-segunda ordem
46. LAMCA, Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos
47. LI, Limite Inferior
48. LLE, Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
49. LMT, Limites Máximos Toleráveis
50. LOD, Limite de Detecção
51. LOQ, Limite de Quantificação
52. LS, Limite Superior
53. Máx., Máximo
54. MeOH, acetonitrila
55. MEV, Microscopia Eletrônica de Varredura
56. MM, Massa Molecular
57. MS, Espectrômetro de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

58. MSPD, Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
59. n, número de replicatas
60. NIV, Nivalenol
61. OTA, Ocratoxina A
62. P.A., Grau para-análise
63. PLL, Partição Líquido-Líquido
64. q_e , capacidade de adsorção no equilíbrio
65. q_t , capacidade de adsorção no tempo t
66. QuEChERS, Anagrama para Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
67. r, Coeficiente de correlação
68. R^2 , Coeficiente de determinação
69. REC, Recuperação
70. rpm, rotações por minuto
71. RSD, Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
72. s, Estimativa do desvio padrão
73. SPE, Extração em fase sólida, do inglês *Solid-Phase extraction*
74. t, tempo
75. T, Temperatura absoluta
76. t_M , tempo morto
77. t_R , tempo de retenção
78. T2, toxina - T2
79. UV, Ultravioleta
80. vis, visível
81. ZEN, Zearalenona

RESUMO

Título: Micotoxinas em Insumo e Produto Cervejeiro: Desenvolvimento de Método Analítico e Aplicação de Adsorventes Alternativos

Autor: Elisa Rosa Seus Arraché

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon

As micotoxinas se destacam por sua alta toxicidade e frequente ocorrência em cereais como a cevada, a qual é a principal matéria-prima empregada na produção de cerveja. A zearalenona (ZEN), a ocratoxina A (OTA) e os tricotecenos toxina T-2, nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) e seus derivados acetilados, 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON), estão sendo apontados como os principais contaminantes desta matriz. Este dado ressalta a importância de estratégias que visem reduzir os níveis de micotoxinas em produtos alimentícios, garantindo o consumo de um alimento seguro como a cerveja, bebida que se destaca pelo alto consumo no país e no mundo. Assim, o objetivo geral foi avaliar o emprego da casca de arroz, um subproduto da indústria arroseira, como um biossorvente de micotoxinas aplicado na redução dos níveis destes contaminantes da cerveja e, como suporte sólido, na técnica de preparo de amostra MSPD (do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*) para a extração de micotoxinas em cevada malteada. Uma triagem de tricotecenos, ZEN e OTA foi realizada em 85 amostras das principais marcas de cerveja tipo *lager* consumidas no Rio Grande do Sul através de um método QuEChERS adaptado e validado por HPLC-UV/FL. O estudo de ocorrência de micotoxinas apresentou as seguintes porcentagens destes metabólitos: 19% de NIV, 46% de DON, 15% de ADONs, 4,7% de toxina-T2, 16% de ZEN e 13% OTA. A ingestão diária tolerável (IDT) foi estimada para NIV (0,05 µg / kg de peso corporal / dia), DON (0,08 µg / kg de peso corporal / dia), ADONs (0,1 µg / kg de peso corporal / dia) e ZEN (0,06 µg / kg de peso corporal / dia) e todas elas apresentaram valores inferiores à ID tolerável máxima provisória de 1 µg / kg de peso corporal / dia para DON, indicando que não há exposição a estas micotoxinas quanto ao consumo de cerveja. A redução dos níveis de micotoxinas na cerveja empregando a casca de arroz como adsorvente foi realizada pela adição de 0,5 g de casca de arroz tratada a 10 mL de cerveja mantido a 100 rpm durante 10 h, com amostragens para a quantificação da micotoxina residual. Através do estudo da cinética, as quantidades de DON, ZEN e OTA adsorvidas no equilíbrio (qe) pela casca de arroz tratada foram de 0,8800 µg g⁻¹, 0,7083 µg g⁻¹ e 0,0855 µg g⁻¹, respectivamente, em um tempo de contato de 7 h. O fenômeno de adsorção para todas as micotoxinas foi melhor representado pelo modelo de pseudo-segunda ordem. A técnica de extração MSPD utilizando a casca de arroz como suporte sólido também foi padronizada e validada por HPLC-UV/FL para a determinação dos tricotecenos, ZEN e OTA em dez amostras de cevada malteada e as micotoxinas foram detectadas em sete amostras, variando de 9,4 a 120,6 µg kg⁻¹. A co-ocorrência também foi observada em quatro amostras e três amostras apresentaram-se isentas de contaminação por tricotecenos, ZEN e OTA. Com este estudo ficou demonstrada a promissora capacidade adsorptiva e abrasiva da casca de arroz, podendo esta ser aplicada em processos industriais e também como suporte sólido em métodos de preparo de amostra, visando a descontaminação e extração das micotoxinas em cerveja e cevada.

Palavras-chave: micotoxinas, adsorção, casca de arroz, cerveja.

ABSTRACT

Title: Mycotoxins in Input and Brewing Product: Analytical Method Development and Alternative Adsorbents Application

Author: Elisa Rosa Seus Arraché, M.Sc.

Advisor: Jaqueline Garda Buffon, Ph.D.

Mycotoxins are well-known for their high toxicity and frequent occurrence in cereals such as barley, which is the main raw material used in brewing. Zearalenone (ZEN), ochratoxin A (OTA) and trichothecenes T-2 toxin, nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives (3-ADON) and 15-acetyl-deoxynivalenol (15-ADON), are being pointed as the main contaminants of this matrix. This fact emphasizes the importance of strategies aimed at reducing levels of mycotoxins in food products, ensuring consumption of safe food such as beer, a beverage that stands out for the high consumption in the country and the world. Thus, the main objective was to evaluate the rice husk use, a rice industry by-product, as a mycotoxin biosorbent applied to reduce levels of beer contaminants and as a solid support in MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion) sample preparation technique, for mycotoxins extraction in malted barley. The trichothecenes, ZEN and OTA screening was performed on 85 samples from main lager beer brands consumed in Rio Grande do Sul through an adapted QuEChERS method and validated by HPLC-UV / FL. Mycotoxin occurrence showed percentages of these metabolites: 19% of NIV, 46% of DON, 15% of ADONs, 4.7% of toxin-T2, 16% of ZEN and 13% OTA. Tolerable daily intake (TDI) was estimated for NIV (0.05 $\mu\text{g} / \text{kg}$ body weight / day), DON (0.08 $\mu\text{g} / \text{kg}$ body weight / day), ADONs (0.1 $\mu\text{g} / \text{kg}$ body weight body weight / day) and ZEN (0.06 $\mu\text{g} / \text{kg}$ body weight / day) and they all had values below the provisional maximum tolerable DI of 1 $\mu\text{g} / \text{kg}$ body weight / day for DON, indicating that there is no exposure to these mycotoxins for beer consumption. The reduction of mycotoxin levels in beer using rice husk as adsorbent was performed by the addition of 0.5 g of treated rice husk to 10 ml of beer kept at 100 rpm for 10 h with samplings to further quantification of residual mycotoxin. By kinetics study, quantities of DON, ZEN and OTA adsorbed on the equilibrium (q_e) by treated rice husk were 0.8800 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0.7083 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 0.0855 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively, at a contact time of 7 h. The adsorption phenomenon for all mycotoxins was best represented by the pseudo-second order model. MSPD extraction technique using rice husk as a solid support was also standardized and validated by HPLC-UV / FL for determination of trichothecenes, ZEN and OTA in ten malted barley samples and, mycotoxins were detected in seven samples, ranging from 9.4 to 120.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The co-occurrence was also observed in four samples and three samples were free of contamination by trichothecenes, ZEN and OTA. This study demonstrated the promising adsorptive and abrasive capacity of rice husk, which can be applied in industrial processes and also as a solid support in sample preparation methods, aiming the decontamination and extraction of mycotoxins in beer and barley.

Keywords: mycotoxins, adsorption, rice husk, beer

1.INTRODUÇÃO

As micotoxinas são compostos naturais de baixa massa molar produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos, os quais, quando expostos a condições propícias, sintetizam estes metabólitos tóxicos que, se ingeridos, são capazes de causar doenças em animais e seres humanos (BENETT & KLICH, 2003). A maioria das micotoxinas são agentes imunossupressores e algumas são cancerígenas, hepatotóxicas, nefrotóxicas e neurotóxicas induzindo efeitos agudos e crônicos, como alterações no intestino, sistema nervoso central e imunológico de homens e animais (PESTKA, 2010; BRYDEN, 2007).

Tendências mundiais preveem um controle rigoroso das micotoxinas, no entanto, o ambiente global em constante mudança pode não ser o cenário ideal para controlar e reduzir a exposição a estas toxinas (MARROQUÍN - CARDONA et al., 2014). Para garantir o acesso a alimentos de qualidade para todos, necessita-se um equilíbrio relativo aos padrões globais destes contaminantes com a possibilidade realista de alcançá-los, considerando as limitações dos produtores e a elaboração de estratégias para prevenir, minimizar e controlar a exposição de micotoxinas com base em pesquisas científicas e estudos de caso (ALBERTS et al., 2017).

Os fungos podem contaminar os alimentos através da produção das micotoxinas, principalmente cereais, entre eles a cevada, a qual é frequentemente utilizada como matéria-prima para a produção de cerveja (MANKEVICIENE et al., 2011; IBÁÑEZ-VEA et al., 2012). Além da cevada, cereais adjuntos ricos em amido como o milho (DOMENICO et al., 2016), o arroz (SAVI et al., 2018) e o trigo (SEUS-ARRACHÉ et al., 2018) também são caracterizados pela frequente contaminação por micotoxinas e sua utilização em grande escala pela indústria cervejeira ocorre por ser fonte adicional de carboidratos fermentáveis para a levedura (POREDA et al., 2014).

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais antigas consumidas no mundo e os cereais são a base da produção mundial desta bebida, sendo que as micotoxinas têm sido largamente detectadas não só nos cereais, mas também no lúpulo e na própria cerveja (BELÁKOVÁ et al., 2011; ROMERO-GONZÁLEZ et al., 2009). Muitas técnicas efetivas de extração destes metabólitos estão sendo aplicadas atualmente, entre elas o método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e a

técnica MSPD (do inglês, *Matrix Solid-Phase Dispersion*) associados a detecção por Cromatografia Líquida (PEREIRA, FERNANDES e CUNHA, 2015). No entanto, devido à grande variedade e, muitas vezes, complexidade das estruturas das micotoxinas, tornou-se difícil utilizar uma técnica padrão para análise e detecção destes compostos simultaneamente, sendo que o limite para aplicação dos métodos muitas vezes está no custo dos reagentes, entre eles os adsorventes e suportes sólidos, em geral derivados de sílica (C8 e C18), os quais são de alto valor aquisitivo e pouco eficientes durante a reutilização (FOLETO et al., 2005). Um substituto para os adsorventes e suportes sólidos convencionais pode ser a casca de arroz, rica em sílica e abundante no Rio Grande do Sul, cujo emprego em determinações analíticas torna-se uma importante alternativa para a sustentabilidade da cadeia produtiva arrozeira.

O Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LAMCA) da FURG já demonstrou estudos a cerca da utilização da casca de arroz como adsorvente promissor na redução dos níveis de micotoxinas e como suporte sólido em técnica de extração em diferentes matérias-primas (SCAGLIONI, BADIALE-FURLONG, 2016; CARVALHO et al., 2012). O LAMCA também apresenta estudos relacionados aos processos fermentativos associados a degradação de tricotecenos. No entanto, uma das grandes dificuldades é a redução dos níveis micotoxicológicos, a partir de uma matéria-prima contaminada, durante o processo cervejeiro e a sua quantificação no produto final.

A casca de arroz representa em torno de 23% do peso total do grão de arroz, é um resíduo resultante do processo de beneficiamento, a qual apresenta baixa propriedade nutritiva e elevado teor de cinza (COSTA et al., 2009). A utilização deste resíduo como um biossorvente na redução dos níveis de contaminação alimentar por micotoxinas contribui também, de forma simultânea, com a diminuição do impacto ao meio ambiente pelo descarte de produtos e rejeitos de forma pouco preparada, como a queima direta (SCAGLIONI, BADIALE-FURLONG, 2016).

O alto consumo de cerveja pelos brasileiros é uma preocupação devido aos elevados índices de contaminação da matéria-prima e do próprio produto final por micotoxinas, as quais podem acarretar danos à saúde. A presença destes contaminantes na bebida pode causar um efeito tóxico acumulativo, podendo ser potencializado pela presença do álcool, contaminando o consumidor, ao longo de um período, com níveis superiores aos indicados como seguro a saúde humana. Assim, surge uma preocupação associada com a qualidade da cevada utilizada no processo cervejeiro, pois

tradicionalmente é cultivada em países cujas condições climáticas favorecem a contaminação por multi-micotoxinas, como no Brasil.

O efeito tóxico acumulativo das micotoxinas justifica a avaliação de diferentes condições para mitigar a concentração destes compostos tóxicos dentro do processo cervejeiro visando a obtenção de um alimento seguro, sem alterar as características físico-químicas do produto final. O conhecimento dos níveis de contaminação por micotoxinas nos alimentos é de fundamental importância na estimativa de risco à que a população pode estar exposta ao consumir esses produtos alimentícios. Também contribui na adaptação e desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostra empregando material de baixo custo, tornando acessíveis e confiáveis os dados de ocorrência.

Dessa forma, como hipótese deste estudo, tem-se o potencial uso da casca de arroz na redução e extração de micotoxinas, a qual pode ser ampliada para a utilização na química analítica, nas técnicas de preparo de amostra, como suporte sólido em método de extração, resultando em baixo custo e maior aplicabilidade. Além disso, também tem-se a possibilidade da inclusão da casca de arroz como potencial adsorvente em processos industriais, mantendo a qualidade do produto final quando visada a redução da contaminação por micotoxinas. É de destaque a ausência de estudos envolvendo o uso da casca de arroz como agente de redução dos níveis de tricotecenos A (Toxina T-2) e B (DON, NIV, 3-ADON, 15-ADON), ZEN e OTA na cerveja e durante o processo cervejeiro.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o emprego da casca de arroz tratada como adsorvente na redução dos níveis de deoxinivalenol, zearalenona e ocratoxina A em cerveja e como suporte sólido na técnica de extração MSPD para a determinação de tricotecenos A e B, zearalenona e ocratoxina A em cevada malteada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Adequar e validar método analítico para separação dos tricotecenos A e B, ZEN e OTA em HPLC-UV/FL;
- ✓ Validar método analítico para a extração por QuEChERS, separação e quantificação dos tricotecenos A e B, ZEN e OTA em amostras de cerveja por HPLC-UV/FL;
- ✓ Caracterizar a cinética de adsorção de DON, ZEN e OTA sobre a casca de arroz tratada em amostras de cerveja;
- ✓ Demonstrar a potencial aplicação da casca de arroz tratada como adsorvente de micotoxinas após a etapa de fermentação do processo cervejeiro, visando a redução dos níveis de DON, ZEN e OTA no produto final;
- ✓ Avaliar a técnica de extração MSPD através da utilização da casca de arroz tratada como suporte sólido para a determinação dos tricotecenos A e B, ZEN e OTA em amostras de cevada malteada por HPLC-UV/FL.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CEVADA

Entre os cereais, a cevada (*Hordeum vulgare L.*) pertence à cultura mais antiga e uma das economicamente mais importantes. Normalmente, a maior parte da produção de cevada é destinada como alimentos para animais, sendo que a melhor qualidade da cevada é utilizada para a produção de malte utilizado no processo de cerveja e uísque (BOLECHOVÁ et al., 2015). A malteação tem sido a principal aplicação econômica da cevada no Brasil, sendo que, aproximadamente, 75% da cevada produzida são utilizadas em processamento industrial (na fabricação de malte), 7% é reservada para semente e 18% na elaboração de rações, por não atingir padrão de qualidade cervejeira. (EMBRAPA, 2012). É um cereal de inverno que ocupa a quinta posição, entre os cereais, em ordem de importância econômica no mundo. No Brasil, a produção de cevada está concentrada na região Sul, destacando o estado do Paraná (251,9 mil t/ano) como principal produtor, seguido do Rio Grande do Sul (157,8 mil t/ano) e Santa Catarina (5,2 mil t/ano) (EMBRAPA, 2018).

Tradicionalmente, a cevada é o grão mais utilizado para a produção de malte para cerveja, mesmo com a possibilidade da malteação de vários outros cereais como sorgo, trigo e milho (POELHMAN, 1985). O uso da cevada majoritariamente no processo cervejeiro ocorre devido à produção de enzimas de forma equilibrada e a utilização da sua casca no processo de filtração do mosto (HOSENEY, 1994). Fatores como clima e manejo são determinantes para a produção de cevada com padrão adequado para malteação, destacando principalmente o poder germinativo, tamanho e a sanidade dos grãos (PIACENTINI et al., 2015).

As características composicionais desejáveis da cevada cervejeira são: alto conteúdo de amido (61%), baixo teor de proteínas (<11,5%) e β -glucanas (3,3-4,5%). Os teores destes compostos determinam, em grande parte, a eficiência da maltagem e do processamento da cerveja (BOHATCH, 1994; HOUGH, 1990).

Tipicamente, o grão de cevada é formado por uma cariopse revestida por uma casca, endosperma e gérme ou embrião (PALMER, 2006). A casca representa, em média, 10-12% do peso seco total do grão de cevada (PALMER, 2006), desempenhando uma importante função protetora desde a colheita (OLKKU et al., 2005) até o processo

de maltagem do grão (MEREDITH et al., 1962). Na sua composição estão presentes β -glucanas, celulose, lignina e pentosanas que se encontram como componentes das paredes celulares (LEWIS & YOUNG, 1995).

A cariopse é constituída por farelo, camada de aleurona, endosperma e embrião. O farelo, o qual representa 2-3% do peso seco total do grão, é formado por camadas de células com características distintas, como a testa e o pericarpo, as quais também desempenham uma atividade protetora (PALMER, 2006).

A camada de aleurona é considerada o revestimento do endosperma e constitui 4-5% do peso seco total do grão (HOSENEY, 1994; PALMER, 2006). É formada principalmente por pentosanas (60%) e β -glucanas (30%) e é rica em ácido fítico, lipídios e proteínas (PALMER, 2006).

O endosperma, composto principalmente por amido e proteínas, representa a maior porção do grão e é constituído por cerca de 77-82% do peso seco total do grão de cevada (PALMER, 2006). O amido representa em torno de 60% da massa total do grão e é o componente mais abundante do endosperma e também do grão de cevada (FOX, 2010). O amido encontra-se armazenado nas células do endosperma sob a forma de grânulos que diferem no seu tamanho e na proporção de amilose e amilopectina. A amilose e amilopectina são polímeros de D-glucose que formam o amido e que estão presentes em proporções diferentes, conforme a origem botânica do cereal. Na cevada, a proporção de amilose e amilopectina é cerca de 1:3 (PALMER, 1983). Na molécula de amilose as moléculas de D-glicose estão ligadas principalmente por ligações glicosídicas α -(1,4), o que lhe confere uma forma essencialmente linear, enquanto que na amilopectina surgem também ligações α -(1,6) que atribuem uma estrutura molecular ramificada (BAMFORTH, 2003).

O embrião, o qual corresponde em torno de 2-3% do peso seco total do grão de cevada (PALMER, 2006), é constituído por cerca de 7% de celulose, 14-17% de lípidos, 5-10% de matéria inorgânica, 34% de proteína, 5-10% de rafinose e 14-15% de sacarose (BRIGGS, 1978). O embrião executa um papel importante no processo de maltagem, pois é nesta etapa que o embrião produz ácido giberélico, o qual irá induzir as células da camada de aleurona a produzir enzimas, tais como D-amilases, dextrinases, endoglucanases, endoproteases e xilanases (PALMER, 1989), que irão degradar alguns componentes do endosperma, como o amido e proteínas.

3.2 PROCESSAMENTO CERVEJEIRO

A partir de um malte de boa qualidade, o processamento cervejeiro torna-se possível, resultando em um produto aceitável e de qualidade para os consumidores. A produção convencional de cerveja é realizada através de oito etapas essenciais: moagem do malte, mosturação, filtração do mosto, fervura do mosto, tratamento do mosto, fermentação, maturação e finalmente a clarificação. Estas etapas estão descritas na Figura 1 (PRIEST; STEWART 2006; VENTURINI FILHO, 2016).

Nas indústrias de produção de malte, as características físicas dos grãos são as primeiras a serem avaliadas. Grãos de cevada grandes, com pouca casca, são de especial interesse pois contribuem com a redução das perdas devido ao elevado teor de amido presente (PALMER, 1989; ELFVERSON, et al., 1999). A composição do grão, a germinação e a produção de enzimas que degradam o amido, a proteína e os constituintes celulares do endosperma são os fatores que determinam a qualidade do malte (MUNCK, 1991).

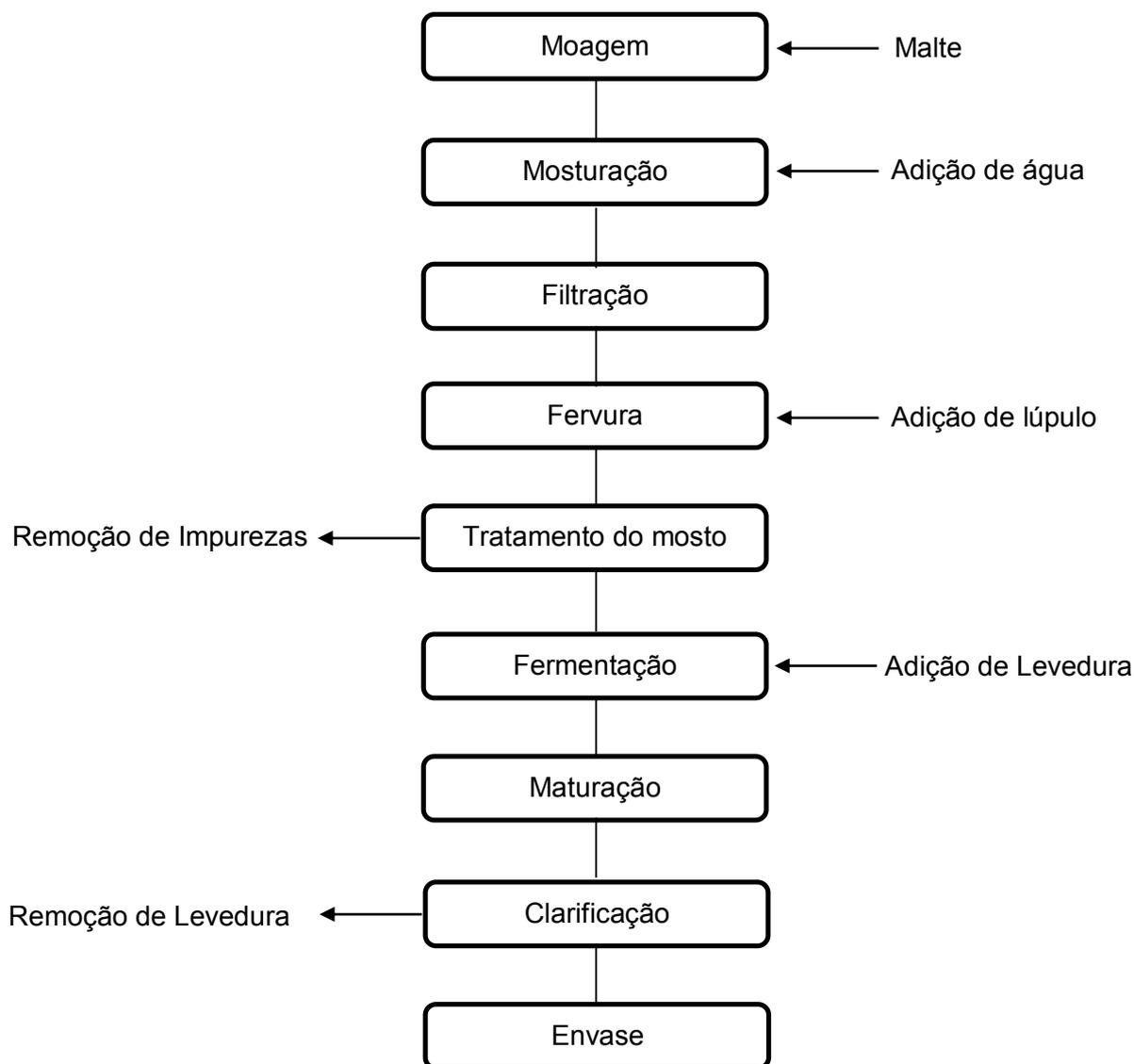
A cevada malteada, por apresentar alta concentração de carboidratos, é comumente empregada na produção cervejeira. Conforme o Decreto nº 6.871, da Casa Civil, Brasil de 4 de julho de 2009, a “Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. No entanto, a legislação brasileira permite que outros cereais possam ser utilizados como adjuntos na fabricação da bebida como, trigo (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), entre outros (ROSA; AFONSO, 2015).

A cevada, após ser limpa e selecionada em porções uniformes, passa pelos processos de maceração, germinação e torrefação, constituindo a malteação. Para impulsionar o desenvolvimento embrionário do grão, o cereal é submerso em água, alternando-se entre períodos secos e úmidos (ALMEIDA et al., 2018).

A germinação controlada dos cereais ocorre com o objetivo de ativar proteínas e enzimas endógenas que controlam a hidrólise do amido (ALMEIDA et al., 2018), impulsionando o desenvolvimento das leveduras para a produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas (URBANO, 2012). Na torrefação, o tempo e a temperatura determinam o tipo de cerveja produzida e é neste processo que ocorre o desenvolvimento da coloração da bebida através da produção das melanoidinas (compostos químicos formados pela ligação entre açúcares e amino-ácidos através da

reação de *Maillard*), intensificando os aromas agradáveis à cerveja por influenciar os processos de óxido-redução (EBLINGER; NARZIB, 2012).

Figura 1. Fluxograma do processamento cervejeiro.



Fonte: Adaptado de Venturini Filho (2016).

O objetivo da etapa de moagem do malte é reduzir o grão maltado de modo uniforme, expondo dessa forma o endosperma, para que algumas enzimas como as amilases, fosfatases e proteases atuem degradando o amido, resultando em carboidratos fermentáveis (BRIGGS et al., 2004).

A mosturação consiste na mistura do malte moído juntamente com água em temperatura controlada, de acordo com um programa previamente estabelecido, a operação é conduzida em tanques de aço inoxidável provido de agitadores, aquecimento, controladores e indicadores de temperatura e isolamento térmico (SCHIMIDELL et al., 2001). O principal objetivo desta etapa é solubilizar as substâncias do malte diretamente em água e, com auxílio das enzimas, solubilizar as substâncias insolúveis, promovendo a gomificação e posterior hidrólise do amido a açúcares. A ação das enzimas produz um mosto que contém de 70-80% de carboidratos fermentescíveis, incluindo glicose, maltose e maltotriose (VENTURINI FILHO, 2016). É na etapa de mosturação que também ocorre a adição de cereais adjuntos, quando conveniente e, como mencionado anteriormente, os mais empregados na fabricação da cerveja são o milho, o arroz, o trigo e a aveia (MADEIRA, 2015). O amido presente nestes cereais é hidrolisado pelas enzimas contidas no próprio malte da cevada em açúcares fermentescíveis. Estas enzimas ainda conseguem hidrolisar o amido contido nestes cereais em até 50% do peso do malte, em forma de adjuntos acrescentados. Acima deste limite, se faz necessária a adição de enzimas complementares (VENTURINI FILHO, 2016).

A filtração do mosto, realizada em um recipiente denominado tina de filtração, tem como objetivos diminuir a viscosidade da mistura, aumentar a extração de açúcares e conseqüentemente elevar o rendimento do processo (ROSA; AFONSO, 2015). Nessa etapa a casca do malte serve como camada filtrante (VENTURINI FILHO, 2016).

É na etapa de fervura que acontece a inativação de enzimas, esterilização do mosto, coagulação protéica, adição do lúpulo e extração de seus compostos amargos e aromáticos, evaporação de água excedente e de componentes aromáticos indesejáveis ao produto final (HUGHES, 2009). O lúpulo auxilia nas características sensoriais da cerveja, como o aroma e sabor, equilibrando a acidez da bebida durante a etapa de fermentação (VENTURINI FILHO, 2016). Quando ocorre a utilização de adjuntos na forma de açúcar como xaropes ou cristalizados, estes devem ser acrescentados nesta etapa. O mosto é mantido em fervura até atingir a concentração desejada de açúcar para o início da fermentação, correspondendo a uma média de 60 a 90 min (KUNZE, 1996; VENTURINI FILHO, 2016).

Após, o mosto deve passar por uma etapa de tratamento que inclui a retirada do precipitado, resfriamento e posterior aeração. Durante a primeira etapa, utilizando forças centrípetas por meio de rotação forçada do meio, precipitam-se os complexos de

proteína, resinas e taninos denominados de *trub*, os quais sedimentam no fundo do tanque, sendo separados do mosto límpido (VENTURINI FILHO, 2016). Já o resfriamento é realizado por trocador de calor até a temperatura adequada para a fermentação, prevenindo processos oxidativos e contaminação por microrganismos (KRAMER, 2010; FIGUEIREDO, 2017).

A fermentação consiste no ponto central da produção de qualquer cerveja e o principal objetivo deste processo é a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico pela levedura, sob condições anaeróbicas (VENTURINI FILHO, 2016; MUNROE, 1994).

Os mostos obtidos apenas a partir do malte contem como fonte de carbono os seguintes açúcares: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, todos metabolizados pela levedura alcoólica. As leveduras produzem os compostos de aroma e sabor da cerveja como subprodutos de seu metabolismo e essa produção é influenciada de acordo com as condições do processo, como concentração e composição do mosto, temperatura do processo fermentativo e o tipo de levedura utilizada (PICKERELL et al., 1991).

As leveduras cervejeiras foram identificadas com base no comportamento de floculação ou flotação no processo fermentativo alcoólico. Dessa forma, as cervejas foram classificadas em três estilos principais: *Lambic*, *Ale* e *Lager* (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). As leveduras *Ale* e *Lambic* são características de fermentação de topo (SANCHEZ; SOLODOVNIKOVA; WENDLAND, 2012; ARAÚJO, 2013) e as leveduras *Lager* de fermentação de fundo (MERTENS et al., 2015; SANCHEZ et al., 2012).

As cervejas do tipo *Lager* são comumente fermentadas por cepas de *Saccharomyces uvarum*, *S. calshbergensis* ou *S. pastorianus* (LODOLO et al., 2008; MERTENS et al., 2015). A fermentação ocorre em temperaturas na faixa de 8 e 15 °C (MERTENS et al., 2015; SANCHEZ et al., 2012) e, devido às baixas temperaturas envolvidas no processo, os sabores e os aromas desta bebida são mais suaves e leves (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). Atualmente, as cervejas da família *Lager* são as mais consumidas no Brasil e no mundo e originam estilos *Pilsen*, *American Lager*, *Malzbier*, *Pale Lager*, entre outros (ROSA; AFONSO, 2015).

As cervejas *Ale* são elaboradas com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas de 16 a 25 °C (BOKULICH; BAMFORTH, 2013; SANCHEZ et al., 2012). Neste processo, o controle da temperatura é fundamental para manter a característica do sabor e o aroma da bebida (ROSA; AFONSO, 2015). As cervejas *Lambics* são

fermentadas de forma espontânea por diferentes espécies de bactérias e leveduras naturalmente presentes no ambiente e nos utensílios utilizados em sua produção (FIGUEIREDO, 2016).

Na etapa de maturação é que ocorre a introdução do gás carbônico por contra-pressão na linha de produção. O CO₂ produzido na fermentação não fornece à bebida a gaseificação adequada, necessitando a correção após a filtração para a padronização do produto final (KRAMER, 2010). A maturação é necessária e importante, mas na verdade, poucas mudanças ocorrem durante este estágio. Entretanto, no processo tradicional de fabricação de cerveja, esta etapa pode durar um longo tempo chegando a algumas semanas e até mesmo alguns meses para determinados tipos de cerveja. Durante o período de maturação são formados ésteres (acetato de etila e acetato de amila) responsáveis pelo aroma e sabor que caracterizam a cerveja (VENTURINI FILHO, 2016).

Após a maturação, a cerveja contém leveduras, partículas coloidais dos complexos proteínas-polifenóis e outras substâncias insolúveis formadas, devido ao baixo pH existente (em torno de 5,0) e as baixas temperaturas (em torno de 8 a 10 °C abaixo da temperatura de fermentação) utilizadas durante essa etapa (VENTURINI FILHO, 2016). Dessa forma, é realizada a clarificação da bebida mediante o uso de agentes clarificantes, centrifugação, sedimentação por gravidade e/ou filtração. A clarificação tem por finalidade a obtenção de um produto final límpido e brilhante eliminando o *trub* (lúpulo, compostos coagulados, complexos de proteína, resinas e taninos) (PIACENTINI et al., 2015). A seguir, a bebida está pronta para ser envasada e comercializada.

3.3 PRINCIPAIS CONTAMINANTES DA CEVADA E CEREAIS ADJUNTOS

Além da cevada, principal matéria-prima da cerveja, a legislação brasileira vigente permite a adição de adjuntos cervejeiros no processamento da bebida, os quais podem ser cereais malteados ou não, assim como outras fontes de carboidratos. Os adjuntos possibilitam redução de custo do processo e proporcionam cervejas mais leves e palatáveis aos consumidores brasileiros (MADEIRA, 2015).

Conforme Decreto n° 6.871, de 4 de junho de 2009, considera-se adjunto cervejeiro a cevada cervejeira e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não-malteados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal.

Segundo a mesma legislação, parte do malte de cevada pode ser substituído por adjuntos cervejeiros, que não podem exceder 45% em relação ao extrato primitivo.

Os adjuntos empregados possibilitam a redução de despesas com a cevada malteada, uma vez que a produção de cevada nacional não supre a demanda do mercado. O malte de cevada apresenta grande vantagem por possuir elevado poder diastásico (conversão de amido em maltose), o que é relevante para a utilização de outros adjuntos, pois as enzimas do malte de cevada também poderão ser responsáveis pela hidrólise do amido dos outros cereais (EMBRAPA, 2012).

Entre os principais contaminantes da cultura da cevada e dos cereais adjuntos (trigo, milho, arroz e aveia) estão as pragas e os insetos, os fungos e as micotoxinas. As pragas de campo mais comuns na cultura de cevada são os pulgões e as lagartas, as quais podem reduzir a produção de grãos se não controladas adequadamente (PIACENTINI, 2014).

Muitos cereais também são frequentemente passíveis de contaminação por fungos, os quais se proliferam nesses grãos pois geralmente encontram substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento (KIRINČIČ et al. 2015; MALLMANN; DILKIN, 2007). A infecção por fungos em grãos e cereais pode ocorrer em diversos estágios da cadeia produtiva, iniciando no campo e continuando durante a maturação, colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento, inclusive na armazenagem do produto transformado. Ainda é importante ressaltar que fungos são encontrados distribuídos no ar e no solo, com capacidade de contaminar e de se desenvolver em qualquer substrato que apresente condições favoráveis (SCUSSEL, 2002).

Além das espécies de fungos deteriorantes (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*) os quais são considerados indicadores da qualidade de sementes e grãos armazenados, existem outra classe de fungos (também de campo ou de armazenagem) muito importantes por causarem danos à saúde, denominados de fungos micotoxigênicos. Algumas espécies dos gêneros de fungos de campo (principalmente *Fusarium*) e de armazenagem (*Aspergillus* e *Penicillium*) quando submetidos a condições de estresse, podem produzir metabólitos secundários tóxicos, as micotoxinas. Estes fungos, mesmo quando seu desenvolvimento não é acentuado, podem produzir estes compostos tóxicos (SCUSSEL, 2002). Nos grãos armazenados, a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultados da interação complexa entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de

carbono, presença de insetos e fungos. Nas condições de campo, o estresse pode ocorrer por condições climáticas, intempéries, pragas, entre outros, que também resultam em perda de vigor da planta, predispondo-a a colonização de fungos toxigênicos ou induzindo um estresse ao fungo que colonizou a planta (MAZIERO; BERSOT, 2010).

A ocorrência de micotoxinas em grãos e cereais ocasiona perdas econômicas para todos os setores agrícolas, sendo que grande parte destas perdas está relacionada aos danos causados à saúde humana e animal, redução da produtividade, custos em inspeção e amostragens, subsídios a agricultores, custos para desintoxicação de alimentos, pesquisa e formação (LIU; GAO; YU, 2006).

3.4 MICOTOXINAS

O crescimento fúngico, associado à produção de micotoxinas, depende de uma complexa interação de diversos fatores, como atividade de água, temperatura, oxigênio e substrato (DÖLL, S.; DÄNICKE, 2009). No entanto, a presença do fungo no alimento não implica, necessariamente, na ocorrência de micotoxina, assim como, esses metabólitos podem estar presentes no alimento mesmo na ausência de fungo. Este fato ocorre porque a maioria dos tipos de micotoxinas são termoestáveis, resistindo a maioria dos tratamentos térmicos ou processos de desidratação durante o processamento de alimentos, os quais são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (BERSOT, MAZIERO, 2010).

A contaminação por micotoxinas da cadeia alimentar humana e animal pode ocorrer de maneira direta ou indireta. Diretamente, através do consumo de cereais, oleaginosas e derivados contaminados. Indiretamente, quando os animais se alimentam com rações previamente contaminadas podendo excretar micotoxinas no leite, carne e ovos e, conseqüentemente, constituir-se em fonte de contaminação indireta para os humanos (BERSOT, MAZIERO, 2010).

A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde animal e humana. Muitos desses contaminantes possuem afinidade por determinado órgão ou tecido e os mais frequentemente atingidos são o fígado, os rins e o sistema nervoso. A gravidade dos efeitos causados pela ingestão de alimentos contaminados depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional, além de outros possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos

quais o indivíduo ou animal estão expostos (HE et al., 2010). A Tabela 1 apresenta os principais efeitos tóxicos causados em humanos e animais através da ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas.

Entre as micotoxinas de frequente ocorrência em cereais e seus produtos, destacam-se os tricotecenos, zearalenona e ocratoxina A, geralmente encontradas em malte de cevada, trigo e cerveja.

Tabela 1. Principais micotoxinas, espécies fúngicas produtoras e substratos e seus efeitos tóxicos.

Micotoxina	Principais fungos produtores	Principais substratos	Efeitos
Aflatoxina B1	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>Aspergillus parasiticus</i> .	Amendoim e milho	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Citrinina	<i>Penicillium citrinum</i>	Trigo, aveia, cevada, milho e arroz	Nefrotóxica
Ocratoxina A	<i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>Aspergillus carbonarius</i> .	Cevada, café e vinho	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Tricotecenos: T2, NIV, DON	<i>Fusarium sp</i>	Milho, cevada, aveia, trigo e centeio	Hemorragias, vômitos, dermatites e Imunossupressão
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereais	Infertilidade dos Animais

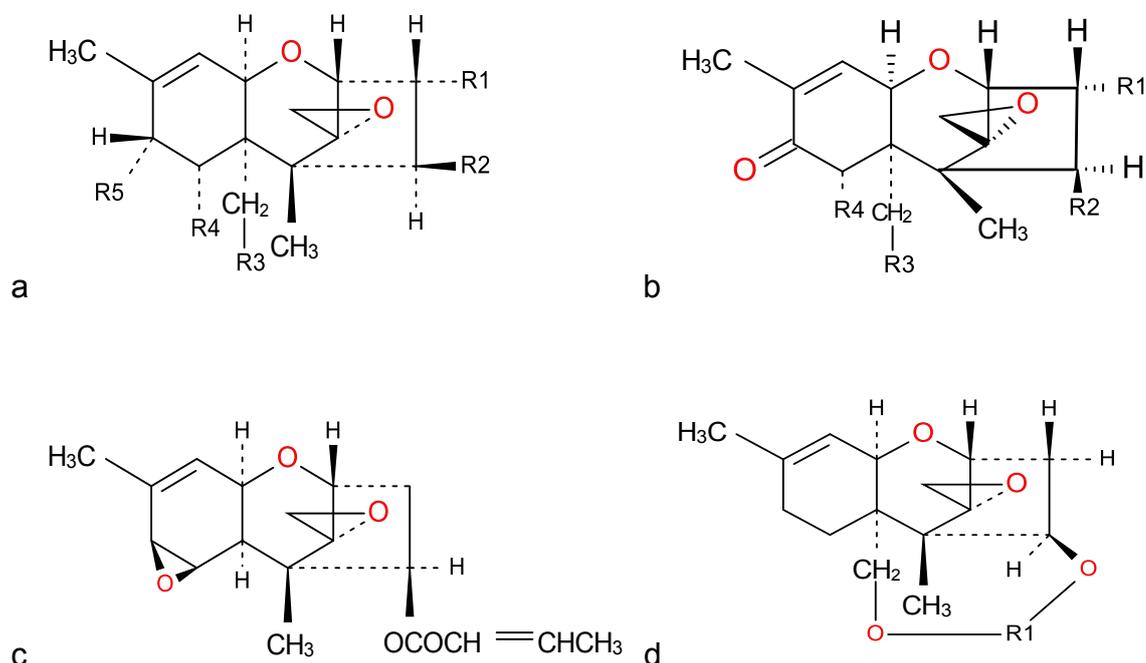
Fonte. RICHARD, 2007; STREIT et al., 2012.

3.4.1 Tricotecenos

Os tricotecenos são micotoxinas de uma família de sesquiterpenóides tetracíclico 12,13-epoxitricotec-9-eno (Figura 2), os quais são divididos em quatro grupos (tipos A, B, C e D) de acordo com as suas características de grupos funcionais, sendo os tipos A e B, os mais comuns (HE et al, 2010).

Todos os tricotecenos compartilham de um esqueleto tricíclico comum com uma função epóxido entre os C12 e 13, principal responsável pela sua toxicidade, e eles são derivados a partir do intermediário isoprenóide pirofosfato de farnesilo, através de uma série de reações de ciclização, isomerização, oxigenação e acetilação (ALEXANDER et al., 2009; KIMURA et al., 2007).

Figura 2. Estruturas químicas de grupos de tricotecenos. a: Tipo A; b: Tipo B; c: Tipo C; d: Tipo D.



O esqueleto dos tricotecenos é quimicamente estável e o anel 12,13-epóxi é resistente a ataques nucleofílicos (ROCHA, ANSARI e DOOHAN, 2005, LIU et al., 2012), são estáveis a temperaturas até 150 °C (DEL REGNO et al., 2015) e não são degradados em processos de autoclavagem, além de possuírem estabilidade em uma ampla gama de pH neutro à ácido (UENO, 1987).

Os tricotecenos diferem na estrutura por padrões de oxigenação e acetilação (ou acilação) do esqueleto (DESJARDINS, 2006) conforme a Figura 3 e Tabela 2. O tipo A é representado por Diacetoxiscirpenol (DAS) e pelas Toxinas T-2 e HT-2, o tipo B é representado por NIV, DON e seus derivados acetilados, 3-ADON e 15-ADON (PESTKA, 2007; FOROUND e EUDES, 2009; IBÁÑEZ-VEA et al, 2011; MCCORNICK et al., 2011).

3.4.1.1 Tipo A

A toxina T-2, pertencente ao grupo A na classificação dos tricotecenos, é o mais agudamente tóxico, sendo considerada como de crítica preocupação, possuindo efeitos principalmente hematotóxicos e imunotóxicos (OSSELAERE et al., 2013). A toxina T-2 pode inibir a síntese de DNA e RNA *in vivo* e *in vitro* e, nos processos *in vivo*, esta toxina

é rapidamente metabolizada a toxina HT-2, seu principal metabólito (WHO, 1990). Vários estudos mostraram que estas micotoxinas atuam inibindo a síntese eucariótica de proteínas (toxicidade) através da ligação ao ribossoma 60S e por interação com a enzima peptidiltransferase, sendo que esta interação conduz a vários graus de inibição da formação da ligação de peptídeos, o que depende da estrutura química específica do tricoteceno (BIN-UMER et al., 2011; DEYU et al., 2018; FATIMA et al., 2018).

As espécies de fungos mais importantes, produtores da toxina T-2, são *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium acuminado* e *Fusarium poae*. Estas espécies são fungos de solo, sendo patógenos importantes de plantas que crescem na cultura de campo e são nativas a áreas com climas temperados (ERIKSEN e ALEXANDER, 1998).

Figura 3. Estruturas químicas de nivalenol (NIV); deoxinivalenol (DON); 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON); 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON).

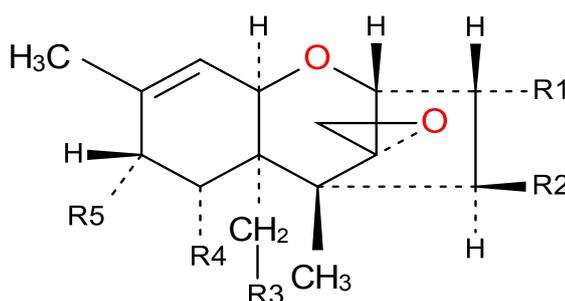


Tabela 2. Características estruturais dos principais tricotecenos dos grupos A e B.

Composto	R1	R2	R3	R4	R5
Grupo A					
Toxina T-2 (T-2)	-OH	-OAc	-OAc	-H	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Grupo B					
Nivalenol (NIV)	-OH	-OH	-OH	-OH	=O
Deoxinivalenol (DON)	-OH	-H	-OH	-OH	=O
3-acetil-DON (3-ADON)	-OAc	-H	-OH	-OH	=O
15-acetil-DON (15-ADON)	-OH	-H	-OAc	-OH	=O

Fonte. He et al., 2010.

3.4.1.2 Tipo B

Entre os tricotecenos, os do tipo B geralmente são os de maior frequência, formados no campo, antes da colheita e sua ocorrência é difícil de ser evitada devido ao grande impacto das condições abióticas (IBÁÑEZ-VEA *et al.*, 2011). As principais espécies produtoras destes tricotecenos são *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium cerealis* (ERIKSEN E ALEXANDER, 1998), sendo que a presença de deoxinivalenol é um indicador de uma possível contaminação por outros tricotecenos (VELÍSEK & HAJŠLOVÁ, 2009). Salienta-se que o deoxinivalenol tem sido a toxina de *Fusarium* mais freqüentemente reportada no mundo, assim como detectada em maior concentração, sendo considerada como “indicadora” de contaminação por este fitopatógeno (CANO-SANCHO *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2015; DEGRAEVE *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2018; SPAGGIARI *et al.*, 2019).

A exposição a níveis elevados de DON pode desencadear vômito, perda de peso, dores abdominais, diarreia e imunossupressão (KOLF-CLAUW *et al.*, 2009). DON é classificado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer no Grupo 3, isto é, não classificado como agente carcinogênico para humanos (IARC, 1993). No entanto, a literatura aponta diversas patologias relacionadas ao consumo de cereais contaminados por toxinas de *Fusarium spp*, desde *alimentary toxic aleukia* (ATA) na Rússia (STEYN, 1995) à puberdade precoce e hiperplasias (BRIONES-REYES, GOMÉZ-MARTINEZ, CUERVA-ROLÓN, 2007). A toxicidade de DON pode atravessar as barreiras biológicas, ou seja, barreiras intestinais e do sangue-cérebro, afetando as funções e a viabilidade das células formadoras de tais sistemas e órgãos (MARESCA, 2013).

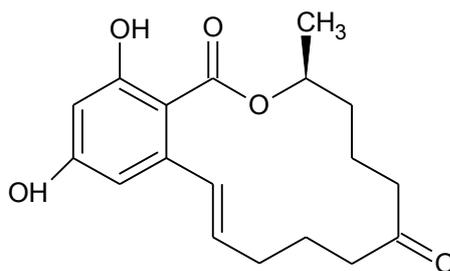
Na literatura, a detecção de DON tem sido relatada em co-ocorrência a outras micotoxinas e, principalmente, a outros tricotecenos (SOLEIMANY *et al.*, 2012). DON é frequentemente associado aos isômeros acetilados 3-acetildexinivalenol (3-ADON), 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) e, junto com o nivalenol (NIV), causam perda de apetite e redução das taxas de crescimento em animais (OSSELAERE *et al.*, 2013).

3.4.2 Zearalenona

A zearalenona (ZEN) é uma micotoxina produzida no campo, principalmente por *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*, e é conhecida por colonizar cereais e apresentar tendência a se desenvolver em baixas temperaturas (MURPHY *et al.*, 2006).

A ZEN é uma lactona do ácido fenólico resorcílico, de fórmula molecular $C_{18}H_{22}O_5$, possui massa molecular $318,4 \text{ g mol}^{-1}$ e nome pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) “(3S,11E)-14,16-dihydroxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-hexahydro-1H-2-benzoxacyclotetradecine-1,7(8H)-dione” (IUPAC, 1986). Sua molécula é constituída de radical “-eno” decorrente da dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o “-ona” pela cetona no C6 (URRY et al., 1966), como mostra a Figura 4. Apesar de ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, é estável ao rompimento hidrolítico, atribuído à presença de um grupo metil secundário que impede que ataques nucleofílicos sejam efetivados na carbonila da lactona (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). A ZEN possui características estrogênicas e semelhança química com a estrutura do hormônio estrogênico 17- β -estradiol (ZINEDINE et al., 2007).

Figura 4. Estrutura química da Zearalenona (ZEN).



A contaminação por ZEN tem sido relatada mundialmente em muitas culturas de cereais incluindo trigo, milho, cevada, sorgo e aveia (HEWITT et al., 2012; TANAKA et al., 2000). É um composto estável ao calor e não degrada durante o processamento ou cozimento de alimentos (EL-HOSHY, 1999).

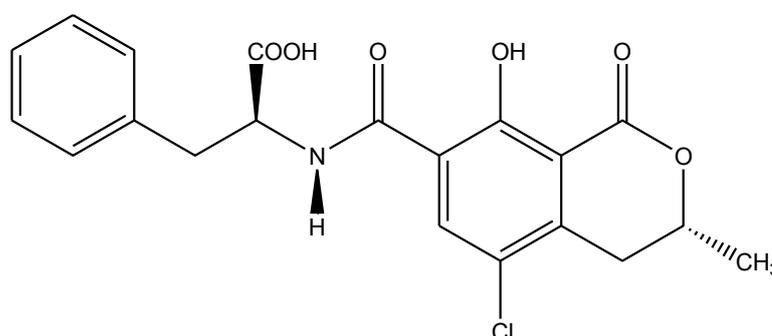
Após administração oral, a zearalenona é rapidamente absorvida e metabolizada em α -zearalenol e β -zearalenol. Estudos com várias espécies animais (cobaias, coelhos, hamsters) revelaram que ZEN provoca alterações no sistema reprodutivo que pode resultar em graves distúrbios (GAUMY et al., 2001), infertilidade (JECFA, 2000) e alteração nos níveis séricos de progesterona (YANG et al., 2007). ZEN também está associada com alterações puberais precoces em crianças (SAENZ DE RODRIGUEZ et al, 1985; SCHOENTAL, 1983; SZUETS et al, 1997). A carcinogenicidade da ZEN foi avaliada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer e verificou-se ser classificada como não carcinogênica para humanos (grupo 3) (IARC, 1993). ZEN foi

provavelmente associada ao câncer esofágico (GAO e YOSHIZAWA, 1997), ao câncer do colo do útero humano e hiperplasia endométrica (TOMASZEWSKI et al., 1998).

3.4.3 Ocratoxina A

A Ocratoxina A (OTA) é sintetizada principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (ONORIO et al., 2011; PATTONO et al., 2011). No entanto, os gêneros fúngicos citados se desenvolvem em condições distintas. Em regiões de clima temperado a OTA é sintetizada por fungos do gênero *Penicillium* e em regiões de clima tropical, fungos do gênero *Aspergillus* são responsáveis pela síntese deste metabólito (SCHMIDT-HEYDT et al., 2012). A OTA é o metabólito mais abundante e mais tóxico entre as ocratoxinas encontradas na natureza. Existem diferentes tipos de ocratoxina, nomeadas pelas letras A, B, C e D, sendo estas classificadas conforme os substituintes na base cumarina fenilalanina (BARISIC et al., 2002). A OTA, 7-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina-7-L-b-fenilalanina, ilustrada na Figura 5, é constituída por uma dihidroisocumarina ligada pelo grupo 7-carboxilo a uma molécula de L-β-fenilalanina, através de uma ligação amida (COVARELLI et al., 2012, NOVO et al., 2013). Apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{18}ClNO_6$, massa molar de $403,82 \text{ g mol}^{-1}$, é cristalizada em xileno, possui fluorescência verde e seu ponto de fusão é de $169 \text{ }^\circ\text{C}$. Por possuir caráter ácido é razoavelmente solúvel em solventes orgânicos como: clorofórmio, etanol, metanol, xileno (CERAIN, 2000; RIBEIRO et al., 2006).

Figura 5. Estrutura química da Ocratoxina A (OTA).



OTA é uma molécula moderadamente estável podendo resistir aos processos de cozimento, fermentação, entre outros, sendo encontrada em níveis de concentrações variadas em produtos alimentares como: cereais, café, carne, cacau, cervejas e vinhos (CHULZE et al., 2006, VALERO et al., 2008, NOVO et al., 2013). Também foi encontrada

em sangue humano e no leite materno de pessoas expostas a produtos contaminados (ARESTA et al., 2006). Estudos toxicológicos mostraram que a OTA é absorvida no trato gastrointestinal, causando lesões crônicas nos rins e no fígado (HERNANDEZ et al., 2006). OTA também pode ser genotóxica, teratogênica, mielotóxica, carcinogênica, possivelmente neurotóxica, sendo considerada a causa de nefropatia endêmica nos Balcãs (TOZLOVANU et al., 2006; PIETRO-SIMÓN et al., 2008; REMIRO et al., 2010). Tem rápida absorção e lenta eliminação, sendo classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, como um possível carcinógeno para humanos (grupo 2B) (MEDINA et al., 2005, MATEO et al., 2007, PAGKALI et al., 2017).

3.5 LEGISLAÇÃO PARA MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

Dessa forma, tendo em vista a grande preocupação com a contaminação de micotoxinas nos mais diversos alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou um Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos no Brasil. Está em vigor a Resolução Nº 138 de 8 de fevereiro de 2017, prorrogação da Resolução Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*.

A ANVISA orienta que os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido (BRASIL, 2017). Destaca-se a legislação sobre os limites máximos tolerados para DON, ZEN e OTA em alimentos, sendo que para os demais tricotecenos do tipo B (NIV, 3-ADON, 15-ADON) os níveis máximos permitidos ainda não são limitados pelas agências reguladoras no Brasil.

A Tabela 3 apresenta os limites máximos toleráveis de deoxinivalenol (DON) em alimentos a partir de janeiro de 2019 no Brasil.

Tabela 3. Limites Máximos Tolerados (LMTs) da presença de DON em alimentos.

Aplicação	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Alimento
Janeiro de 2019	1000	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.
	750	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.

Fonte: BRASIL, 2017.

Na Europa, foi estabelecido $1750 \mu\text{g kg}^{-1}$ como limite máximo permitido para trigo, aveia e milho destinados ao consumo humano para DON. Para cereais não transformados, excluindo aveia, trigo duro e milho, o LMT é de $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para farinha de cereais, incluindo farinha de milho e sêmola de milho, o LMT é de $750 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para pão, produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para pequeno almoço, o LMT é de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para massas alimentícias secas o LMT é de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ (EUROPA COMMISSION REGULATION, 2010).

A Tabela 4 apresenta os limites máximos toleráveis de zearalenona (ZEN) em alimentos a partir de janeiro de 2017 no Brasil. A Comissão Europeia estabeleceu um LMT para ZEN de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cereais não transformados, excluindo o milho, o qual é de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, incluindo farinha, sêmola e óleo de milho. Já para a farinha de cereais, excluindo a de milho, o LMT de ZEN é de $75 \mu\text{g kg}^{-1}$. Pão, produtos de pastelaria e bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para pequeno almoço, o LMT de ZEN é de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. (EUROPA COMMISSION REGULATION, 2005).

Em relação aos limites máximos tolerados para a contaminação por Ocratoxina A em alimentos no Brasil, só existe legislação para a ocorrência desta micotoxina em cereais para posterior processamento, com valor até $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, incluindo grão de cevada (BRASIL, 2017). A Comissão Europeia (2005) também estabelece limites para a concentração de OTA em produtos comercializados: $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ em produtos derivados de cereais para consumo direto; $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ em cereais crus e não processados e $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ em frutas secas.

Cabe ressaltar que o estabelecimento de concentrações máximas legais de micotoxinas não significa que concentrações baixas destes contaminantes sejam

seguras. Pequenas quantidades de micotoxinas também podem interromper o funcionamento celular normal e até resultar em mortes celulares e alterações patológicas acumulativas (STREIT et al., 2013; BRYDEN, 2012). Além disso, baixos níveis de micotoxinas nas dietas podem levar a problemas subclínicos que são menos evidentes, incluindo uma ligeira diminuição do consumo e produção de alimentos, utilização de nutrientes de má qualidade e queda no desempenho (re) produtivo (BRYDEN, 2007).

Tabela 4. Limites Máximos Tolerados (LMTs) da presença de ZEN em alimentos.

Aplicação	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Alimento
	40	Milho em grão e trigo para posterior processamento.
	100	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.
	100	Arroz beneficiado e derivados.
Janeiro de 2017	400	Arroz integral
	600	Farelo de arroz
	150	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho.
	200	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo.

Fonte: BRASIL, 2017.

3.6 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM CEREAIS ADJUNTOS, CEVADA E CERVEJA.

Pesquisas que avaliem a ocorrência de micotoxinas vem crescendo cada vez mais, tanto em alimentos destinados a animais quanto para os humanos. A Tabela 5

apresenta alguns estudos sobre a ocorrência desses contaminantes em arroz, trigo e milho, principais cereais utilizados como adjuntos à produção cervejeira.

Tabela 5. Ocorrência de micotoxinas nos principais cereais adjuntos à produção cervejeira.

Cereal	Micotoxina	Nível máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Referência
	AFLAs	0,11	Almeida et al., 2012.
	DON	244	
	OTA	0,24	
	ZEN	4872	
Arroz	AFB ₁	74	Dors et al., 2011.
	DON	400	
	OTA	26	
	ZEN	396	Savi et al., 2018.
	ZEN	126,31	
	OTA	560	
Milho	AFLAs	1600	Machinski Jr et al, 2001.
	OTA	206	
	ZEN	4640	
	ZEN	99	Queiroz et al., 2012.
	AFLAs	14,5	Domenico et al., 2016.
Trigo	AFB ₁	4906	Mendes et al., 2015.
	DON	11800	Machado et al., 2017.
	DON	1590,7	Seus-Arraché et al., 2018.
	ADONS	428	
	NIV	187,5	

É frequente que mais de um tipo de micotoxina ocorra em um produto, pois a maioria das espécies fúngicas produzem mais de um tipo de metabólito tóxico, indicando que a contaminação cruzada ocorre naturalmente quando as espécies de fungos toxigênicos estão em contato com os alimentos (EYNI et al., 2016).

Entre todas estas pesquisas, destaca-se a presença de DON no trigo, em quantidades extremamente altas, na faixa de 1590,7 até 11800 $\mu\text{g kg}^{-1}$, bem acima do

permitido pela legislação mundial vigente. DON também foi avaliado em 113 amostras de trigo pertencentes ao estado do Paraná, estando presente em 64% destas (SANTOS et al., 2013). A Tabela 6 apresenta estudos de ocorrência de micotoxinas, agora levando em consideração a contaminação somente nos grãos de cevada e malte.

Tabela 6. Ocorrência mundial das principais micotoxinas encontradas em grãos de cevada e malte de cevada.

Micotoxina	Frequência	Máx. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	País	Referências
Fumonisinias	72,5%	908,47	Brasil	Batatinha et al., 2007.
	35% (Malte)	347,5	Espanha	Gil-Serna et al., 2013.
Aflatoxinas B1	4,8% (Malte)	7,2	Romênia	Tabuc et al., 2009.
	3,2%	0,3	República Tcheca	Benesova et al., 2012.
Ocratoxina A	2,57%	0,3	República Tcheca	Belakova et al., 2011.
	58% (Malte)	3,53	Espanha	Ibanez-Vea et al., 2012.
	100%	280	Polônia	Krysinska-Traczyk et al., 2007.
	96,4%	372	Lituânia	Mankeviciene et al., 2007.
Deoxinivalenol	54%	10000	Uruguai	Pan et al., 2007.
	72% (Malte)	112,3	Espanha	Gil-Serna et al., 2013.
	77,5% (Malte)	985,9	República Tcheca	Belakova et al., 2014.
	18% (Malte)	15100	Brasil	Piacentini et al., 2015.
	86,4%	602,3	República Tcheca	Bolechová et al., 2015.
	23%	6,1	Tunisia	Juan et al., 2017.

Tralamazza et al. (2016), confirmaram a presença de DON em 99% de amostras de trigo estudadas, pertencentes aos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, em concentrações que variaram entre 183 e 2150 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os fungos produtores de

micotoxinas causam perdas nutricionais e representam um risco significativo para a cadeia alimentar, sendo que os cereais infectados podem representar uma fonte de contaminação durante a fabricação de novos produtos, pois as micotoxinas são termoestáveis, resistindo a variações de temperatura e pH durante o processamento de alimentos (KABAK, 2009). Isto pode ser comprovado com os estudos de ocorrência de micotoxinas em diversos produtos alimentícios, como na produção cervejeira, em que a utilização de cevada ou de cereal adjunto contaminado com algum dos tipos de micotoxinas pode acontecer.

Na Tabela 7 estão presentes alguns estudos de ocorrência de DON, ZEN e OTA em cervejas consumidas no mundo, destacando-se novamente a presença de DON em maior proporção que as outras micotoxinas apresentadas.

Tabela 7. Ocorrência mundial de micotoxinas em cervejas.

Micotoxina	Frequência	País	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referências
DON	100%	Irlanda, Alemanha, Bélgica e Polônia	6 – 70	Kuzdralinski et al., 2013.
DON	60%	Espanha	24,5 – 47,7	Carrasco et al., 2015.
DON	75%	Alemanha	2,2 – 20	Bauer et al., 2016.
ZEN	100%	Alemanha	0,35 – 2	Bauer et al., 2016.
ZEN	65%	Espanha	8,24 – 63	Pascari et al., 2018 a.
OTA	39%	República Tcheca	1 – 24,4	Belakova et al., 2011.

Muitos estudos foram publicados sobre o destino das micotoxinas durante a produção de cerveja, analisando todo o processo de produção ou apenas uma parte dele e destacando os parâmetros físicos que levam à variação na concentração destes contaminantes (INOUE et al., 2013; MALACHOVA et al., 2010; PIETRI et al., 2010; VACLAVIKOVA et al., 2013).

O processo cervejeiro inclui várias etapas já descritas anteriormente, sendo que a mosturação, a fervura do mosto e a fermentação representam um impacto significativo nos níveis de micotoxinas possivelmente presentes no malte (PASCARI et al, 2018 b). Embora as operações de processamento de cerveja tenham temperaturas máximas de operação abaixo das que tem capacidade de destruir as micotoxinas, elas podem influenciar na concentração das micotoxinas devido a ocorrência de mudanças químicas e bioquímicas (PASCARI et al., 2018 b).

Um estudo determinou a porcentagem de transferência e redução de DON durante a mosturação e a fervura do mosto a partir do malte de cevada contaminado com este tricoteceno. Os estágios cruciais que induziram mudanças significativas nos níveis de micotoxinas durante estas etapas foram nos primeiros 15 min a 45 °C durante a mosturação (aumento da transferência de DON para o mosto de até 94%) e nos primeiros 30 min de ebulição (diminuição do nível de DON para o mosto na média de 45%) (PASCARI et al., 2018 b). O aumento da quantidade de DON liberado no mosto ocorreu provavelmente devido ao contato com a água e a atividade enzimática durante a mosturação, o qual fez com que DON fosse liberado das macromoléculas da matriz de malte (KOSTELANSKA et al., 2011). A redução dos níveis de DON durante a fervura pode estar relacionada à sedimentação e modificação química sob ação de temperatura que sofre a micotoxina (RYCHLIK et al., 2014), no entanto, pesquisas suplementares devem ser realizadas para confirmar esta afirmação, levando em consideração que a maioria das micotoxinas não são completamente reduzidas mesmo após 90 min de fervura (PASCARI et al., 2018 b).

Campagnollo et al., (2015) investigaram a redução de micotoxinas na cerveja durante a etapa de fermentação e observaram uma alta porcentagem de redução no caso de ZEN (75,1%), mas também para AFB1 (48,1%) e OTA (59,4%), no entanto, a redução de DON atingiu apenas 11,6%. Segundo os autores e outras pesquisas publicadas anteriormente (JOUANY et al., 2005), essa redução ocorreu devido a adsorção das toxinas (especialmente ZEN) a β - glucanos presentes na parede celular da levedura (ligações hidrogênio e Van der Waals sendo envolvidas em conjunto com a proporção de β -1,3-D-glucanos e β -1,6-D-glucanos no produto). No entanto, estas porcentagens reduzidas variam, pois, dependem dos diferentes tipos de leveduras utilizadas, as quais podem possuir uma resistência desigual frente a ação das micotoxinas (PASCARI et al., 2018 b).

Garda et al, (2005) também avaliaram o comportamento de DON e toxina T-2 durante a fermentação alcoólica (120 h a 14 ° C) na produção de cerveja, a partir da utilização de um malte contaminado, e observaram uma redução dos níveis totais de contaminação de 53% para as micotoxinas em estudo. Em outros estudos sobre fermentação alcoólica com *Saccharomyces Cerevisiae* realizado por Scott e Kanhere (1995), houve redução de 9 a 13% para a ocratoxina A, enquanto que para Baxter et al., (2001) a redução foi de 13 a 32% para a mesma micotoxina. Estes valores menores de redução da contaminação podem ser devido à polaridade da micotoxina, a qual favorece a recuperação em meio aquoso, resultando em níveis mais altos de contaminação na cerveja.

Através dos estudos e pesquisas demonstrados pode-se concluir que as micotoxinas são transferidas da matéria-prima previamente contaminada ao produto final. O processamento cervejeiro impacta, em maior parte, na redução dos níveis das micotoxinas, obtendo-se um produto final com menores teores de micotoxinas quando comparados a matéria-prima inicial. No entanto, mais estudos são necessários sobre o real destino de cada micotoxina durante o processamento cervejeiro e uma avaliação de perdas e possíveis benefícios trazidos pelas estratégias de descontaminação precisam ser identificadas para uma melhor visão da situação (PASCARI et al., 2018 b).

3.7 DETERMINAÇÕES DE MICOTOXINAS

O requisito para aplicar limites regulatórios para o controle de micotoxinas foi o desenvolvimento de um vasto número de métodos analíticos para a identificação e quantificação dessas micotoxinas em diversas amostras complexas, como alimentos, rações e amostras biológicas (VENTURA et al., 2006). O controle dos níveis destes contaminantes em amostras de alimentos pode ocorrer através de determinações que utilizam métodos analíticos envolvendo técnicas de extração, com o objetivo de evitar os efeitos tóxicos das micotoxinas na população exposta, bem como atender a legislação vigente (MENEELY et al., 2011).

Um procedimento analítico completo envolve cinco etapas principais, sendo estas a amostragem, o preparo de amostra e a separação/extração, a detecção/determinação e a análise dos dados (CHEN et al., 2008). A etapa do preparo de amostra pode ser considerada como crítica no desenvolvimento de um procedimento analítico, podendo

esta ser responsável por até 80% do tempo na execução de um método (WEN et al., 2014).

O preparo de amostra consiste em isolar os analitos de interesse de compostos que possivelmente causem interferência na análise e, quando necessário, pré-concentrá-los ou transformá-los em determinada forma que seja compatível com o método de detecção ou de separação (PAN et al., 2014).

A extração de micotoxinas a partir de amostras alimentícias geralmente envolve extração com solvente, extração ultra-sônica e métodos de microextração em fase sólida e líquida. Métodos adequados de limpeza envolvendo particionamento líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE), ou uma coluna de imunoafinidade (SENYUVA, GILBERT, 2010) são comumente usados para remover interferentes de matriz dos extratos das amostras. Métodos SPE utilizando diferentes fases ligadas, tais como polímeros C18, troca iônica, polímero reverso de fase reversa ou molecular são empregados para a limpeza de vários tipos de matrizes alimentícias (KHAYOON et al., 2010; PÉREZ-ORTEGA et al., 2012). No entanto, o desenvolvimento de metodologia para a análise de micotoxinas é, muitas vezes, dificultado devido a fatores como: tempo, grande volume de solventes, várias etapas de extração, custo de reagentes. A extração de micotoxinas de suas matrizes é uma etapa crítica, pois depende muito das propriedades físico-químicas e do tipo de matriz, bem como da escolha do solvente para o isolamento (SORIANO et al., 2004; SYLOS et al., 2003).

Por esta razão, o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra que permitem a extração simultânea de micotoxinas tem sido estimulado desde a confirmação da toxicidade destes compostos. Neste contexto, técnicas alternativas tais como os métodos QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e MSPD (do inglês, *Matrix Solid-Phase Dispersion*), que aplicam menores volumes de solventes e permitem utilizar materiais renováveis e de menor custo, são cada vez mais requisitados com os objetivos de melhorar as características de desempenho aplicadas à análise de vários analitos como as micotoxinas (PEREIRA, FERNANDES e CUNHA, 2015).

Entre as técnicas analíticas de separação das micotoxinas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) é a mais usada e isso ocorre devido a sua alta sensibilidade, sua adequação a separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua aplicabilidade (SKOOG et al., 2002). Um grande número de detectores já foi descrito e desenvolvido,

no entanto, grande parte das análises contemporâneas de HPLC utilizam detectores de ultravioleta, condutividade elétrica, fluorescência, índice de refração e espectrômetro de massas (FU et al., 2009).

Os compostos que absorvem no UV são aquelas substâncias que absorvem luz na faixa de 180 a 350 nm (COLLINS et al., 2006) e, possivelmente, é a técnica mais frequente aplicada para determinação de tricotecenos, estes são detectados em comprimentos de onda de 193 nm para tricotecenos tipo A (PASCALE, PANZARINI e VISCONTI, 2012) e 220 nm para tricotecenos tipo B (KRSKA et al., 2007).

Os detectores de fluorescência são sensíveis, seletivos e com alta especificidade entre os detectores de HPLC. A sensibilidade deste tipo de detector pode ser de 10 a 1000 vezes mais que os detectores de UV-VIS. A ocratoxina A e a zearalenona possuem propriedade fluorescente, quando expostas à luz ultravioleta. A OTA apresenta fluorescência verde e um comprimento de onda de excitação de 333 nm e de emissão de 460 nm (SCUSSEL, 1998). A ZEN emite uma fluorescência azul com comprimentos de onda de 314, 270 e 236 nm (excitação) e 366 e 455 nm (emissão) (MIROCHA et al, 1967; ZHANG et al., 2011).

Todos os métodos analíticos devem ser validados para que sejam seguros, eficazes e aplicáveis tanto na avaliação de ocorrência quanto nas determinações de detoxificação dessas micotoxinas. Os parâmetros determinantes são sensibilidade, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e efeito matriz (SANTE, 2015).

3.7.1 QuEChERS

QuEChERS é um método que envolve o preparo da amostra, extração com solvente (acetonitrila, acetato de etila ou acetona) e partição com sulfato de magnésio isoladamente ou em combinação com outros sais, seguido de limpeza, utilizando extração em fase sólida. QuEChERS tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro a partir de matrizes complexas, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (ANASTASSIADES et al., 2003).

É uma técnica muito flexível e desde a sua criação ocorreram várias modificações em sua execução, dependendo dos tipos de analitos, matrizes (líquidas ou sólidas), instrumentação e preferências dos analistas quanto aos compostos a extrair. Basicamente, a amostra é extraída com um solvente miscível em água (por exemplo,

acetonitrila) na presença de quantidades elevadas de sais (cloreto de sódio e sulfato de magnésio) e de agentes tamponantes (por exemplo, citrato) para induzir a separação de líquido. Após, ocorrem as etapas de agitação e centrifugação e uma alíquota da fase orgânica é submetida a limpeza. A mistura é centrifugada e o sobrenadante resultante pode ser analisado diretamente ou pode ser submetido a uma concentração, se necessário (MAJORS, 2008; PEREIRA, FERNANDES e CUNHA, 2015).

A utilização de $MgSO_4$ na etapa de partição de fases deve-se à sua elevada capacidade de remoção de água quando comparado aos demais sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, resultando no aquecimento da amostra durante as fases de extração/separação, favorecendo a extração, principalmente de substâncias apolares (ANASTASSIADES et al., 2003). O uso de NaCl com $MgSO_4$ é utilizado principalmente para favorecer a transferência de substâncias polares para a fase orgânica. Os adsorventes possuem a capacidade de reter interferentes da matriz, permitindo que os analitos permaneçam na fase orgânica (extrato) (PRESTES et al., 2009).

A aplicação do método QuEChERS vem sendo amplamente utilizada para a extração de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares como em amostras de milho (FERREIRA et al., 2012), em arroz (BEMVENUTI et al., 2012), em cevada (RUBERT et al., 2012), em cerveja (CARRASCO et al., 2015) e em trigo (SEUS-ARRACHÉ et al., 2018), já que o alimento é o caminho mais direto para a exposição humana (SOCAS-RODRIGUEZ et al., 2017).

Seus-Arraché et al. (2018) utilizaram QuEChERS para a determinação simultânea de tricotecenos do tipo B, DON, ADONS e NIV em amostras de grãos de trigo com quantificação por HPLC-UV. O método mostrou-se adequado para a determinação de tricotecenos em trigo com recuperações que variaram de 76-88%. DON foi detectado em 19 das 20 amostras analisadas, na faixa de concentração 163,48 a 1590,69 $\mu g\ kg^{-1}$. A co-ocorrência de DON e ADONS também foi observada em nove amostras, e uma amostra apresentou a co-ocorrência de DON e NIV. Em outro estudo, Rubert et al. (2012) validaram uma metodologia QuEChERS para avaliar 32 micotoxinas, entre as quais DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV presentes em amostras de cevada. O método mostrou-se adequado, apresentando recuperações na faixa de 65-85%, quantificadas por UHPLC-MS.

Pascari et al. (2018) utilizaram um método QuEChERS para a determinação de 23 micotoxinas em 64 amostras de cerveja, com detecção por LC-MS/MS. A toxina

encontrada mais frequentemente foi a zearalenona (ZEN), sendo quantificada em 65% das amostras positivas, com níveis variando de 8,24 a 62,96 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em relação à co-ocorrência, em três amostras de cerveja foram encontradas 18 micotoxinas simultaneamente.

Na cerveja, há uma ampla gama de compostos de baixo peso molecular, como açúcares, pigmentos, ácidos orgânicos, que causam efeito significativo de matriz na etapa de detecção. Estes compostos interferentes são o principal problema enfrentado por métodos que avaliam as micotoxinas simultaneamente, pois podem causar subestimação da quantidade de toxinas nas amostras (ZACHARIASOVA et al., 2010). Para minimizar as interações da matriz, a maioria dos métodos multi-toxinas aplicados para análise de micotoxinas em cerveja empregam uma diluição de amostra. No entanto, mesmo após o passo de diluição, a calibração com correspondência de matriz ou a utilização de padrões internos são geralmente empregados para corrigir o efeito de matriz e, assim, realizar uma quantificação correta (PETERS et al., 2017; VARGA et al., 2013). A grande vantagem da utilização do método QuEChERS é a eliminação de compostos interferentes, não necessitando a diluição da amostra (REJCZAK & TUZIMSKI, 2015).

Em relação a etapa de limpeza, importante na eliminação de compostos interferentes, PSA e C18 são os sorventes mais utilizados na extração de micotoxinas de amostras de alimentos (FERNANDES et al., 2015; LI et al., 2015; MICHLIG et al., 2016; CARRASCO et al. 2015; VEPRIKOVA et al, 2015). Colunas de limpeza MultiSep e colunas de imunoafinidade (IAC) também são utilizadas em alguns casos para aumentar a eficiência da limpeza antes da análise cromatográfica. No entanto, o IAC não pode ser aplicado para a análise de uma grande variedade de micotoxinas devido à sua especificidade. Com relação às colunas de limpeza MultiSep, que são misturas de sorventes especialmente projetados para análise de micotoxinas, valores aceitáveis para quase todos os analitos são obtidos, no entanto a metodologia é mais complexa, cara e demorada (PEREIRA et al., 2015).

Em resumo, cada vez mais torna-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias analíticas ou a modificação/otimização das já existentes com o objetivo de permitir a determinação simultânea de uma ampla gama de compostos de produtos em um ciclo analítico utilizando materiais economicamente viáveis e sustentáveis (KOEL, 2016). Neste contexto, paralelamente, ocorre a introdução do conceito de desenvolvimento sustentável no laboratório analítico, o qual tem sido chamado de

"química analítica verde". O conceito de "química verde" está em constante desenvolvimento desde a década de 1990 (TOBISZEWSKI, 2016). Os parâmetros que determinam a natureza verde dentro da análise incluem: eliminação (ou pelo menos limitação) do uso de reagentes químicos (especialmente solventes) ou a substituição por substâncias menos tóxicas; redução de emissões de resíduos sólidos gerados no laboratório analítico e redução de trabalho e consumo de energia em procedimentos (TURNER, 2013).

3.7.2 DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA – MSPD

A técnica MSPD foi desenvolvida inicialmente para a extração de drogas de tecidos bovinos (BARKER et al., 1989) e apresentou características atrativas para a análise de amostras sólidas e semi-sólidas de natureza complexa, tais como os tecidos vegetais e animais (PAVLOVIC et al., 2007). A técnica é baseada na quebra da amostra utilizando um suporte sólido através da maceração, permitindo o aumento da superfície de contato da amostra. Após a etapa de maceração, a mistura homogeneizada é empacotada em um cartucho de SPE e um solvente é permeado através do cartucho e recolhido no final para posterior análise cromatográfica (BARKER et al., 1989).

Caldas et al., (2013b) apresentaram vantagens em substituir a etapa de eluição em cartucho SPE por uma agitação em vórtex com a diminuição da etapa de empacotamento da amostra. Esta etapa pode ocasionar maiores desvios na extração devido a possíveis variações de como o material macerado é empacotado, além da variação entre diferentes amostras. Outra vantagem é que a agitação em vórtex pode melhorar a eficiência da extração pois aumenta o tempo de contato entre amostra e solvente.

A escolha dos solventes para extração e o suporte sólido também podem ser otimizados, visto que a etapa de dispersão é igualmente determinante na eficiência da extração (BARKER, 2007). Entre os solventes mais utilizados estão a acetonitrila (RUBERT et al., 2011), metanol (CARVALHO et al., 2012), acetato de etila (WANG et al., 2007) e diclorometano (WU et al., 2008).

Materiais como C18, florisil, alumina e sílica são os suportes sólidos mais frequentes em métodos baseados na MSPD, porém possuem desvantagem quanto ao custo elevado (CAPRIOTTI et al., 2013; GARCIA-LOPEZ et al., 2008). No entanto, materiais de ocorrência natural e de baixo custo, como areia (QUINTANA et al., 2009) e

terra diatomácea (GONZALES-MARINO et al, 2010; VILLAVERDE-DE-SÁA et al., 2012) já foram aplicados na MSPD. A utilização de materiais residuais, subprodutos da indústria e de baixo custo se encaixa no mesmo contexto e estes tem demonstrado resultados eficazes (ARIAS et al., 2014; CERQUEIRA et al., 2014).

A MSPD é uma técnica de baixo custo, que envolve baixo consumo de reagentes e solventes (BLASCO et al., 2002), além de ser uma técnica que se adapta a diferentes amostras e analitos, devido a sua eficiência de estar diretamente associada a escolha dos materiais utilizados como suporte sólido e solvente (PAVLOVIC et al., 2007). Esta técnica já foi empregada para a determinação de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares.

Massarolo et al, (2018) otimizaram a técnica MSPD para a determinação simultânea de aflatoxinas (AFLAs) G2, G1, B2 e B1 em farinha de milho proveniente do Brasil, utilizando método de separação por HPLC-FL. Recuperações aceitáveis (85,7 a 114,8%) foram obtidas sob as seguintes condições de extração: 1 g de amostra, 25 mg de C18 e 10 mL de MeCN / MeOH (50:50, v / v).

Carvalho et al., (2012) também realizaram um estudo para a determinação simultânea de aflatoxinas (AFLAs) B1, B2, G1 e G2 em cebolas produzidas no Brasil por meio de técnica de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD). Os autores utilizaram como adsorvente a mistura de casca de arroz: terra diatomácea (1:1) (p/p), empregado na proporção de 1:1 (p/p) com a massa de amostra e a mistura clorofórmio: metanol (5:25) (v/v) como solvente. A metodologia apresentou valores de recuperação entre 78 e 93% e a ocorrência de AFLA B2 foi verificada em 43% das amostras analisadas com teor máximo de 90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFLA B2.

Rubert et al. (2011), na Espanha, investigaram a presença dos tricotecenos DON e NIV em amostras de farinhas de trigo coletadas nos mercados de Valência através da técnica MSPD, utilizando como suporte sólido C18 e a mistura de metanol e acetonitrila 50:50 (v/v) como solvente extrator e quantificação por LC-MS. Os limites de detecção foram 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para NIV e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para DON e os limites de quantificação foram de 85 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 31 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para NIV e DON, respectivamente. As recuperações foram de aproximadamente 77% para NIV e 90% para DON. Das 50 amostras analisadas, 9 apresentaram NIV (<LOQ – 105 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 5 apresentaram DON (45 – 367 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

3.8 DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS CONTENDO MICOTOXINAS

O crescente número de pesquisas que tem demonstrado os impactos negativos que as micotoxinas causam na contaminação de alimentos e, acima de tudo, na saúde humana e animal, levou à uma série de estudos relacionados as estratégias para diminuir ou evitar a formação destes contaminantes (BRYDEN, 2009). Várias técnicas de mitigação vêm sendo desenvolvidas para prevenir o crescimento de fungos e consequente produção de micotoxinas durante o plantio, armazenamento ou processamento dos mais variados tipos de alimentos (KABAK et al., 2006; NEME, MOHAMED, 2017).

Ocorre que há a necessidade da obtenção de métodos eficientes de descontaminação ou desintoxicação que sejam capazes de reduzir ou destruir as micotoxinas e que, ao final do processo, preservem as características sensoriais e nutricionais do produto e também não gerem resíduos tóxicos (SANTOS et al., 2013).

Técnicas de melhoria no cultivo das plantas ou pré-colheita, como agentes anti-fúngicos e engenharia genética e também o controle das condições de armazenamento, principalmente umidade e temperatura, vem sendo utilizadas para prevenir a contaminação por micotoxinas (GONÇALEZ et al., 2001).

No entanto, quando o alimento ou o grão já apresentam a ocorrência de micotoxinas, estratégias para a descontaminação e mitigação desses compostos são utilizadas como os métodos biológicos (FAZELI et al., 2009; HASSAN et al., 2017), os métodos químicos (JALILI e JINAP, 2012; SAVI et al., 2014) e os métodos físicos (JALILI et al., 2010; MATUMBA et al., 2015; TIBOLA et al., 2016).

3.8.1 Métodos Biológicos

Alguns microrganismos podem transformar as micotoxinas em derivados menos tóxicos ou não tóxicos, transformando suas características físicas e químicas (HEINL et al., 2010). He et al. (2010) citaram as seguintes vantagens da biotransformação: especificidade para ingredientes menos ou não tóxicos; condições de reação suaves (temperatura; pH); aplicação sob condições aeróbicas e anaeróbicas e a potencial aplicação de enzimas desintoxicantes.

As técnicas de descontaminação biológicas que utilizam bactérias (KARLOVSKY et al., 2011) e enzimas (HASSAN et al., 2017), por exemplo, estão sendo amplamente

estudadas e podem ser uma escolha muito promissora, desde que apresentem eficiência, especificidade e que sejam ambientalmente corretas (WU et al., 2009).

Gautério et al. (2017) e Feltrin et al., (2017b) empregaram a enzima peroxidase, obtida e purificada a partir de farelo de arroz e verificaram uma degradação de 82% e de 81% do tricoteceno deoxinivalenol, respectivamente, em sistema modelo. No entanto, os autores ressaltaram que não se pode afirmar com certeza se existe uma ação oxidativa da enzima na estrutura de DON, levantando assim a hipótese de que as proteínas apresentam capacidade de adsorção devido aos grupos ativos presentes na sua parede celular, o que pode ocorrer em substituição a um mecanismo oxidativo.

Outro exemplo é a de-epoxidação redutiva de tricotecenos por bactérias presentes no intestino grosso de suínos e aves. Neste processo, a transformação de grupos epóxido, que determina a toxicidade dos tricotecenos, leva a produtos menos tóxicos (WU et al., 2007). No entanto, esses microrganismos podem funcionar bem apenas quando seus requisitos rigorosos de ambiente são atendidos. Por exemplo, as bactérias que podem desintoxicar os tricotecenos pela de-epoxidação são observadas como ativas apenas sob ambiente anaeróbico (KARLOVSKY, 2011). Algumas enzimas envolvidas na desintoxicação necessitam de NADPH (HASSAN et al., 2017) e de outros co-fatores que limitam sua aplicação prática como uma solução enzimática. Tan et al. (2015) isolaram bactérias *Pseudomonas otitidis* TH-N1 do rúmen de vacas e incubaram em meio Murashige e Skoog (MS) durante 3 dias a 37 °C, onde 79% de ZEN foi degradada devido a uma ou mais enzimas intracelulares. Contudo, os autores relataram que mais estudos são necessários para revelar o mecanismo de degradação de ZEN e avaliar a segurança da utilização de *P. otitidis* na alimentação humana e animal.

Os métodos biológicos podem representar alternativas de desintoxicação, no entanto, são necessárias novas pesquisas para identificação de espécies de microrganismos com maior potencial de ligação com as estruturas das micotoxinas, já que existem diferenças de sensibilidade, seletividade e especificidade, verificando-se também a influência de fatores intrínsecos e extrínsecos às células no processo de descontaminação (PENG et al., 2018).

3.8.2 Métodos Químicos

Diferentes mecanismos estão envolvidos na descontaminação de micotoxinas nos alimentos através dos métodos químicos, são eles: oxidação, alcalinização, hidrólise,

redução, hidratação e conjugação (HE et al., 2010). A amônia e o ozônio são os produtos químicos mais utilizados na degradação de micotoxinas, com efeitos redutor e oxidante, respectivamente (TAJKARIMI et al., 2008; SAVI et al., 2014; YOUNG et al., 2006). Na prática, ambos os produtos são líquidos ou em forma de gás, e poderiam ser aplicados devido aos seus excelentes efeitos para eliminar bactérias zoonóticas em alimentos (TAJKARIMI et al., 2008; MCKENZIE et al., 1997).

Allameh et al. (2005) observaram que os efeitos adversos do milho contaminado com aflatoxina poderiam ser controlados após o tratamento com vapores de amônia a 1% e o desempenho de crescimento, condições orgânicas e os parâmetros bioquímicos de animais alimentados com a dieta tratada foram comparáveis ao grupo controle que foi alimentado com grãos não contaminados.

A aplicação do gás ozônio na concentração de 10% exposta em uma solução de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ZEN, durante 5 min, promoveu a completa degradação desta micotoxina, não sendo detectada a formação de subproduto (MCKENZIE et al., 1997).

No estudo de Savi et al. (2014), o ozônio reduziu com sucesso o nível de DON no pericarpo de trigo em 86,6% em 30 minutos, mas foi menos eficiente para reduzir o DON no endosperma de trigo. Como o endosperma é originário das partes internas dos grãos, o lipídio presente nessas partes poderia ser uma razão para agarrar firmemente esta toxina lipossolúvel.

No entanto, esses tratamentos químicos para a descontaminação de micotoxinas também têm suas limitações. Primeiro, as toxicidades dos metabólitos resultantes dos tratamentos com produtos químicos, como os compostos intermediários oriundos da aflatoxina B1 tratados com ozônio ou amônia, incluindo aflatoxina D1 e aflatoxina ozonida, ainda podem apresentar toxicidade semelhante à da aflatoxina B1 (TIWARI et al., 2010; MCKENZIE et al., 1998). Em segundo lugar, esses tratamentos químicos podem alterar a qualidade dos grãos tratados ou insumos da indústria alimentícia, incluindo oxidação da superfície, mudanças de cor, gosto prejudicado e energia de germinação reduzida (TIWARI et al., 2010).

Como os tratamentos químicos para redução de micotoxinas em alimentos ou matérias-primas para alimentação humana e animal foram proibidos pela Comissão Européia (2006b), em virtude das possíveis causas negativas na qualidade dos alimentos e a formação de outros compostos, estudos sobre os efeitos de redução de micotoxinas utilizando produtos químicos foram gradualmente menos publicados neste século (HE et al., 2010).

3.8.3 Métodos Físicos

Entre os métodos físicos utilizados para diminuir ou inibir a formação de micotoxinas em alimentos, principalmente na produção e armazenamento de grãos e no processamento de alimentos derivados estão: a classificação, o descascamento, a moagem, o tratamento térmico e a adsorção. Estes métodos estão descritos com mais detalhes a seguir:

3.8.3.1 Classificação

Uma forma de reduzir a infecção de grãos saudáveis pelos já contaminados é fazer a classificação do material, evitando assim que os grãos fisicamente danificados entrem em contato com os saudáveis (BALZER et al., 2004). Esta forma de prevenção é particularmente eficiente no que diz respeito ao *Fusarium sp.* e a micotoxinas associadas. A remoção de grãos danificados por segregação de densidade foi usada para diminuir DON e ZEN em milho e trigo (JACKSON e BULLERMAN, 1999). A associação de técnicas de segregação como a colheita manual e densidade resultaram numa diminuição de 70-90% das fumonisinas (FB1 e FB2) (VASANTHI e BATH, 1998). Além disso, a combinação de técnicas de enxágue e flutuação foi eficaz contra a toxicidade de DON e ZEN em milho mofado destinados a alimentação de porcos (ROTTER et al., 1995). Uma diminuição de 60% FB1 e FB2 foi obtido quando as técnicas de triagem e classificação por gravidade foram aplicadas a grãos de milho descarregados de um silo de armazenamento (MALONE et al., 1998). No entanto, esse método tradicional de triagem é inaplicável em situações de manufatura em larga escala, por sua baixa eficiência e alto custo na aquisição de equipamentos (LANCOVA et al., 2008). Por exemplo, na fabricação de ração animal em grande escala, a classificação pode ser altamente mecanizada, contudo, geralmente, combinam vários equipamentos, incluindo separadores de ar, peneiras, separadores por gravidade e cilindros recuados (TIBOLA et al., 2016; SCHWAKE-ANDUSCHUS et al., 2010)

3.8.3.2 Descascamento

No processamento de alimentos, o descasque é um processo mecânico para remover a camada externa dos grãos. Este processo é amplamente utilizado para cereais, sementes de leguminosas e oleaginosas com composições fibrosas externas

(RIOS et al., 2009 a). O descasque também ajuda a aumentar a fineza dos produtos de moagem subsequentes, como farinha e sêmola (CHELI et al., 2013).

O descasque pode ser realizado com diferentes ferramentas como por exemplo, Siwela et al. (2005) estudaram a redução de aflatoxinas no milho através de um 'descascador automático'; Schwake-Anduschus et al. (2010) estudaram a redução da toxina T-2 em aveia por descascador de laboratório; Matumba et al. (2015) aplicaram descasque tradicional com almofariz e pilão de madeira para examinar a redução de micotoxinas no milho. Estes estudos indicaram que muitos fatores, incluindo espécies de culturas, cultivares e duração do processamento, poderiam influenciar a redução de micotoxinas durante o processo de descascamento. No entanto, o descascamento apresenta como principal desvantagem a perda de massa, a qual pode chegar a 40% (HOUSE et al., 2003).

3.8.3.3 *Moagem*

A moagem é um processo que quebra fisicamente os grãos em partículas menores. Logicamente, os processos de moagem só podem redistribuir as micotoxinas existentes em diferentes frações, ao invés de eliminar ou desativar essas toxinas. Como a camada externa de grãos é mais fácil de ser contaminada do que as partes internas (LANCOVA et al., 2008), com o processo de moagem são esperados resultados em menores concentrações de micotoxinas nas frações das partes internas dos grãos (por exemplo, farinha ou sêmola) em amostras de grãos iniciais, enquanto isso, níveis mais altos de micotoxinas nas frações que se originam da camada externa (por exemplo, farelos) (CHELI et al., 2013).

Rios et al. (2009b) estudaram a distribuição de DON nas frações moídas de duas amostras de trigo duro francês com diferentes concentrações iniciais de DON (382 e 4204 mg kg⁻¹). Neste estudo, as amostras foram sucessivamente moídas por dois tipos de rolos (rolos de ruptura e rolos redutores) e, em seguida, diferentes frações moídas foram coletadas para testes de micotoxinas. Em ambas as amostras, observou-se que a fração "farelo" continha proporções elevadas do total de DON (50,8% e 42,6%), mas isso não sinalizou que a remoção desta fração foi suficiente para superar o risco de micotoxinas, já que a fração mais fina "semolina total" ainda manteve proporções altas de DON (40,8% e 49,6%). Resultados semelhantes foram observados no estudo de Lancova et al. (2008), o qual foi realizado em 4 amostras de trigo com diferentes níveis

iniciais de contaminação por micotoxinas (909, 108, 92 e 2985 mg kg⁻¹). Os resultados indicaram uma redução de 50-65% do total inicial de DON através da remoção com farelos e perdas, mas certas proporções do total de DON permaneceram na farinha de quebra (10–22%) e na farinha redutora (24–28%).

3.8.3.4 *Tratamento térmico*

A maioria das micotoxinas é considerada estável ao calor. No entanto, alguns processos de extrusão, os quais são utilizados para a fabricação de salgadinhos tipos “chips”, podem reduzir o teor de micotoxinas como o observado por Castells et al., (2005) em que o teor de ZEN em grãos de milho artificialmente contaminados foi reduzido em 66-83% após a extrusão, a temperaturas variando de 120 a 160 °C, enquanto menores reduções foram observadas para DON.

As perdas de fumonisinas B1 e B2 excederam 70% em farelo de milho contaminado ao nível de 2,5 mg kg⁻¹ após aquecimento a 190 °C durante 60 min e atingindo 100% quando aquecido a 220 °C por 25 min (SCOTT e LAWRENCE, 1994). No entanto, o destino químico de fumonisinas e ZEN em alimentos cozidos, fritos e extrusados não é bem compreendido. Uma degradação real de fumonisinas ou ZEN durante o aquecimento é questionável pois a diminuição observada nessas micotoxinas pode ser devido a uma interação com a matriz alimentar, resultando em dificuldades na análise de toxinas (HUMPF e VOSS, 2004).

3.8.3.5 *Adsorção*

Adsorção é o fenômeno no qual ocorre a adesão espontânea de moléculas presentes em um fluido (adsorbato) a uma superfície sólida (adsorvente). O grau de adsorção depende das condições termodinâmicas, da superfície do adsorvente e das interações entre adsorvente e adsorbato (MYERS, 2004). Isso ocorre devido à existência de forças não balanceadas na superfície do sólido, as quais causam a atração das moléculas presentes no fluido em contato com o adsorvente sólido por um tempo determinado (RUTHVEN, 1984).

Os fenômenos adsorptivos são classificados quanto às forças responsáveis, em dois tipos: adsorção química e adsorção física. A adsorção química, ou quimissorção, envolve um processo no qual ocorre efetiva troca de elétrons entre o sólido e a molécula

adsorvida, ocasionando as seguintes características: formação de uma única camada sobre a superfície sólida, irreversibilidade e liberação de uma quantidade de energia considerável (da ordem de uma reação química). A adsorção física é um fenômeno reversível em que normalmente se observa a deposição de mais de uma camada de adsorbato sobre a superfície adsorvente. As forças atuantes na adsorção física são idênticas as forças de coesão, as forças de *van der Waals*, as quais operam em estados líquido, sólido e gasoso. As energias liberadas são relativamente baixas e atingem rapidamente o equilíbrio (RUTHVEN, 1984; SUZUKI, 1990).

Para que um processo de adsorção se torne eficiente, deve-se levar em conta a escolha do adsorvente o qual deve apresentar alta seletividade, alta capacidade e longa vida. Este também deve estar disponível em grandes quantidades e a um baixo custo (FIGUEIREDO, BOAVENTURA e LOUREIRO, 2000).

Resinas sintéticas como a colestiramina (um polímero usado para fins farmacêuticos) e divinilbenzeno-estireno foram testadas como ligantes de micotoxinas para fumonisinas (KERKADI et al., 1998; UNDERHILL et al., 1995; SOLFRIZZO et al., 2001) e ZEN (RAMOS et al., 1996), no entanto sua utilização torna-se inviável devido ao custo elevado.

Carvão ativado conhecido por suas propriedades de adsorção conseguiu diminuir a biodisponibilidade de toxina T-2 (BRATICH et al., 1990; FRICKE e JORGE, 1990; GALEY et al., 1987), DON e NIV (AVANTAGGIATO et al., 2004) quando adicionado a uma concentração de 5-20 g kg⁻¹ de dieta, mas nenhum efeito real foi demonstrado contra micotoxicoses em animais (HATCH et al., 1982; ADEMOYERO e DALVI, 1983; DALVI e MCGOWAN, 1984).

Devegowda et al. (1998) observaram que a fração da parede celular extraída de *Saccharomyces cerevisiae in vitro* foi capaz de ligar uma grande variedade de micotoxinas e muitos estudos foram realizados com produtos comerciais contendo frações da parede celular da levedura. Yiannikouris et al. (2004 a) demonstraram que a fração D-glucana da parede celular da *S. cerevisiae* está diretamente envolvida no processo de ligação das micotoxinas, e que a organização estrutural de D-glucanos modula a força de ligação. Adsorventes orgânicos obtidos da parede celular da levedura *S. cerevisiae* podem ter um papel importante para controlar a toxicidade das micotoxinas, pois apresentam várias características, como atuar sobre diferentes micotoxinas, ser estáveis em diferentes pHs e eficiente para baixos ou altos níveis de micotoxinas presentes nos alimentos (SMITH, CHOWDHURY e SWAMY, 2006).

Adsorventes orgânicos são mais eficientes contra uma gama maior de micotoxinas que os inorgânicos, pois a eficácia de adsorventes inorgânicos é muito limitada a determinados grupos de micotoxinas, nos casos mais frequentes de alimentos multicontaminados (HUWIG et al., 2001). Adsorventes de origem orgânica também são biodegradáveis e não se acumulam no meio ambiente depois de serem excretados (JOUANY, 2007).

Métodos baseados na adsorção possuem vantagem de serem versáteis e acessíveis, no entanto, muitas vezes o material adsorvente pode encarecer o processo e, além disso, muitos não podem ser reutilizados e acabam gerando mais um resíduo. Assim, no sentido de reduzir custos e ampliar o uso destes processos pela indústria, fontes alternativas que remetam eficiência e baixo custo estão sendo investigadas, como os chamados biossorventes (TARLEY, ARRUDA, 2003; GUNDOGDU et al., 2009).

Biossorventes de origem vegetal são constituídos por macromoléculas como lignina, celulose, hemicelulose e proteínas, as quais possuem sítios adsortivos, tais como carbonilas, carboxilas, aminas e hidroxilas capazes de adsorver diversas espécies iônicas, moléculas polares ou apolares (NGAH, HANAFIAH, 2008). Neste sentido, o emprego de biossorventes torna-se relevante quando são derivados de resíduos agroindustriais, os quais dependendo do volume produzido se tornam um problema ambiental tendo como exemplo a casca de arroz, abundante no Rio Grande do Sul, um subproduto da indústria arroseira o qual representa 23% do peso total do grão de arroz (CHUAH, 2005).

A casca de arroz é um material fibroso, composto basicamente por celulose, lignina e matéria orgânica, apresenta alta dureza, fibrosidade e natureza abrasiva, portanto, tem-se a obtenção de produtos de baixa propriedade nutritiva, boa resistência ao desgaste e muita cinza. O seu potencial como adsorvente decorre de sua superfície de contato e constituição química caracterizada, em média, por 35% de celulose, 12% de lignina, 25% hemicelulose, 14% de óxidos de silício, além de outros óxidos como os de magnésio e cálcio. Cabe salientar que os óxidos de silício associados à celulose podem adsorver moléculas apolares ou moderadamente polares, como as micotoxinas (FOLETO et al., 2005).

Pesquisas já demonstraram uma tendência em utilizar a casca de arroz com diferentes finalidades, no entanto, em relação a determinação de micotoxinas poucos estudos têm sido realizados. Carvalho et al., (2012) empregaram a casca de arroz quimicamente tratada como suporte sólido aplicado a técnica de MSPD (do inglês, *Matrix*

Solid Phase Dispersion) para a determinação de aflatoxinas (AFLAB1, AFLAB2, AFLAG1, AFLAG2) e ocratoxina A presentes em cebola. A extração de todas as micotoxinas estudadas foi alcançada, com recuperações que variaram de 72-95%. A capacidade da casca de arroz de adsorver aflatoxinas presentes no leite também foi comprovada e os níveis atingidos de adsorção foram em torno de 100% para as aflatoxinas (AFLAB1 e AFLAM1) presentes nesta matriz alimentícia (SCAGLIONI, BADIÁLE-FURLONG, 2016).

Entre os processos de adsorção, o estudo cinético é de fundamental importância. A cinética controla a eficiência do processo, fornece informações sobre a velocidade em que as reações acontecem e sobre os fatores que influenciam a taxa de adsorção. Além disso, fornece informações sobre as interações que ocorrem na interface adsorbato-adsorvente (CRINI, BADOT, 2008).

O processo de adsorção que pode ocorrer na casca de arroz tem sido relacionado com a capacidade de troca iônica, quelação e adsorção física e não envolve metabolismo celular (KRISHNANI et al., 2008). Estes mecanismos, de forma geral, envolvem grupos funcionais (carbonilas, carboxilas, hidroxilas e enóis) que, em meio aquoso, podem atuar na captura e retenção dos analitos. Tais grupos podem ser modificados em meio aquoso pela variação do pH, o que afeta o processo de adsorção (GUILARDUCI et al., 2006). Sabe-se que os mecanismos de biossorção que envolvem a aplicação da casca de arroz ainda não foram completamente elucidados, pois estes envolvem diferentes formas de captura do analito de interesse e também dependem da estrutura molecular deste analito. Apesar disso, geralmente aceita-se que a superfície do biossorvente tem um importante papel, qualquer que seja o processo de adsorção envolvido (LESMANA, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras

Um total de 85 amostras de cervejas industrializadas do tipo *Lager*, consistindo de 23 marcas e lotes diferentes, foram selecionadas aleatoriamente para representar as principais cervejarias do Brasil. Entre as 85 amostras, 10 foram cervejas *Lager* de trigo, 15 foram cervejas *Lager* puro malte e 60 amostras foram cervejas *Lager* com malte de cevada e cereais não maltados (não descritos pelo fabricante). Estas amostras foram adquiridas em diversos estabelecimentos comerciais (lojas, mercados e cervejarias especializadas) do Estado do Rio Grande do Sul, durante o ano de 2017. Na amostragem, foram coletados três tipos de embalagens, lata de 250 mL, lata de 473 mL e longneck de 350 mL. Lotes de 1% do produto disponível na prateleira dos comerciantes foram formados aleatoriamente para cada tipo de embalagem com o objetivo de compor os lotes de laboratório.

Amostras de cevada malteada foram adquiridas de estabelecimentos comerciais em cidades do sul do Rio Grande do Sul (Brasil, RS), correspondendo a 10 marcas disponíveis para consumo no ano de 2018 provenientes de dois estados do sul do Brasil, Rio Grande do Sul e Paraná. Durante o procedimento de amostragem, foram adquiridos 500 g de grãos de cevada malteada. Em cada estabelecimento comercial foram coletados lotes que correspondiam a 1% das embalagens de 500 g de grãos de cevada de diferentes marcas disponíveis nas prateleiras. Os grãos foram utilizados inteiros e embalagens da mesma marca foram abertas, transferidas para um recipiente, homogeneizadas e quarteadas. O quarteamento foi realizado manualmente até se obter a quantidade correspondente a amostra analítica.

A coleta das amostras, tanto para as cervejas *Lager* como para as amostras de cevada malteada, ocorreu de acordo com o regulamento nº 401/2006 da Comissão Européia (EC) de 23 de fevereiro de 2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios.

4.1.2 Suportes Sólidos

- ✓ Adsorvente “sílico-celulósico” extraído da casca de arroz contendo 30% de sílica;
- ✓ Areia de praia proveniente da cidade de São José do Norte;
- ✓ C18 (adsorvente padrão) (Sigma-Aldrich, E.U.A.);
- ✓ Casca de arroz proveniente de uma indústria de beneficiamento de arroz localizada na região sul do Brasil;
- ✓ Celite (Nuclear, Brasil).

4.1.3 Preparo dos padrões das micotoxinas em estudo

Os padrões analíticos das micotoxinas NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON, T2, ZEN e OTA (todos com pureza > 98 %) foram obtidos da Sigma Chemical Company (EUA). As soluções analíticas estoque dos tricotecenos (NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON e T2) foram preparadas a partir de recipientes comerciais que continham 1 mg de cada micotoxina. Cada um dos tricotecenos foi dissolvido em acetonitrila até uma concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após, cada uma destas soluções estoque foi diluída de modo a se obter soluções padrão cujas concentrações corresponderiam a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ segundo relação massa/volume. A confirmação da concentração das soluções trabalho foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Cary 100-Varian) em comprimento de onda de máxima absorção de 220 nm para todos os tricotecenos e absorvidade molar de 6808, 6911, 6895 e 6836 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV em acetonitrila, respectivamente, de acordo com a Equação 1, (BENNETT, SHOTWELL, 1990; KRŠKA et al., 2007).

O padrão de ZEN que continha 5 mg foi dissolvido em benzeno: acetonitrila (98:2 v/v) até uma concentração estoque de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e, após, esta solução foi diluída até a obtenção da solução trabalho de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração foi confirmada em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 317 nm e absorvidade molar de 6060 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, conforme Equação 1.

A OTA, frasco contendo 5 mg, foi dissolvida em benzeno: ácido acético (99:1 v/v), resultando em uma solução estoque de concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a obtenção da solução trabalho, a micotoxina foi ressuspensa em benzeno: ácido acético (99:1) sendo sua concentração confirmada, em espectrofotômetro e utilizando a Equação 1,

onde o comprimento de onda utilizado foi de 333 nm e absorvidade molar em benzeno: ácido acético (99:1) de $5550 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$[] \text{ micotoxina } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{abs} \times \text{MM} \times 1000 \times \text{Fc} \times \varepsilon^{-1} \times b^{-1} \quad \text{Equação (1)}$$

Em que: micotoxina ($\mu\text{g mL}^{-1}$): concentração da micotoxina presente em 1 mL; abs: valor da absorvância da solução padrão; MM: massa molar da micotoxina (g mol^{-1}); Fc: fator de correção do instrumento; ε : absorvidade molar no comprimento de onda da absorção característica de cada micotoxina ($\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); b: largura da cubeta (cm).

4.1.4 Instrumentação

- ✓ Balança analítica de precisão FA2104N (Bioprecisa, São Paulo, Brasil);
- ✓ Banho de areia Quimis (São Paulo, Brasil);
- ✓ Banho-maria Quimis (São Paulo, Brasil)
- ✓ Banho ultrassônico 40 kHz, 150 W - UNIQUE (São Paulo, Brasil);
- ✓ Banho ultrassônico UNIQUE Ultra Cleaner 700 (São Paulo, Brasil);
- ✓ Bomba de vácuo Primatec – (São Paulo, Brasil);
- ✓ Capela de exaustão;
- ✓ Centrífuga Mini Spin Eppendorf;
- ✓ Centrífuga Eppendorf 5804 R;
- ✓ Coluna analítica Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm); (Phenomenex, Torrance, USA);
- ✓ Cromatógrafo líquido Shimadzu, disponível no Laboratório de Micotoxinas - FURG, equipado com sistema administrador CBM-20A módulo LC-20AT, degaseificador DGU-20A5, detector UV-VIS SPD-20A e detector FL – 10 AXL conectado em *software LC solution data acquisition*, amostrador automático;
- ✓ Destilador de água Quimis 341-25 (São Paulo, Brasil);
- ✓ Destilador de nitrogênio Tecnal (São Paulo, Brasil);
- ✓ Espectrômetro FEMTO UV-Vis modelo Cirrus 80;
- ✓ Estufa – Quimis (São Paulo, Brasil);
- ✓ Membrana de acetato de celulose 0,45 μm de diâmetro de poro de 47 mm de diâmetro (Millipore, São Paulo, Brasil) com utilização na filtração de solventes para HPLC;

- ✓ Microcentrífuga Eppendorf Mini Spin AG 22331;
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 – 1000 µL;
- ✓ Microscópio eletrônico de varredura (MEV - Jeol JSM 6060) com tensão de trabalho de 15 kV até a ampliação de 2500 vezes;
- ✓ Moinho de facas Quimis (São Paulo, Brasil);
- ✓ Mufla Quimis (São Paulo, Brasil);
- ✓ Peneira com abertura 32 mesh;
- ✓ Shaker incubadora Tecnal TE-420 – (São Paulo, Brasil);
- ✓ Sistema de filtração em membrana Supelco (E.U.A);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3 Millipore (Millipore, E.U.A).
- ✓ Sistema de vácuo *Manifold*;
- ✓ Soxhlet Quimis (São Paulo, Brasil);
- ✓ Vórtex Biomixer Vtx-2500;
- ✓ Vidraria de rotina laboratorial (balões volumétricos, copo de béquer, erlenmeyers, tubos falcon ...).

4.1.5 Reagentes e Solventes

- ✓ Acetato de etila P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Acetona P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Panreac, Espanha);
- ✓ Ácido acético glacial P.A. 99,7% (Synth, Brasil);
- ✓ Ácido Bórico P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Ácido clorídrico P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Ácido Sulfúrico P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Água destilada;
- ✓ Água ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3 Millipore (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Alaranjado de metila (Synth, Brasil);
- ✓ Alcool Isoamílico (Synth, Brasil);
- ✓ Benzeno P.A. (Vetec, Brasil);
- ✓ Cartuchos C18;
- ✓ Cloreto de sódio P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Cloreto de metileno grau HPLC (J.T. Baker, USA);

- ✓ Clorofórmio P.A. (Proquimios, Brasil);
- ✓ Etanol P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Éter de petróleo (Synth, Brasil);
- ✓ Fenolftaleína (Synth, Brasil);
- ✓ Gás nitrogênio;
- ✓ Hexano grau HPLC (J.T. Baker, USA);
- ✓ Hidróxido de sódio P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA);
- ✓ Padrões analíticos: Toxina T-2, Deoxinivalenol, Nivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, zearalenona e ocratoxina-A (*Sigma Chemical Company – E.U.A.*);
- ✓ Peróxido de Hidrogênio P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Selênio metálico;
- ✓ Sulfato de magnésio P.A. (Synth, Brasil);
- ✓ Sulfato de potássio P.A. (Synth, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Adequação da separação cromatográfica e quantificação dos Tricotecenos, Zearalenona e Ocratoxina A

A separação e quantificação dos tricotecenos em estudo foram realizadas em HPLC-UV e avaliadas a partir de condições já descritas por De Souza et al., (2015) para a detecção da toxina T-2 (tricoteceno tipo A), e por Seus-Arraché et al., (2018) para a detecção de NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON (tricotecenos tipo B). A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila (MeCN) e água ultra pura na proporção 70:30 (v:v).

A separação dos tricotecenos foi avaliada através do tempo de retenção (t_R) de cada analito, fator de retenção (k) através da Equação 2 e fator de separação (α) através da Equação 3 (FORNSTEDT, FORSSÉN e WESTERLUND, 2015).

$$1 \quad k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Equação (2)

Em que: k é o fator de retenção; t_R é o tempo de retenção de um analito; tempo transcorrido desde a injeção até o ponto de máximo do pico; t_M é o tempo de retenção de um analito não retido.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{Rb} - t_M}{t_{Ra} - t_M} \quad \text{Equação (3)}$$

Em que: α é o fator de separação; k_2 é o fator de retenção do segundo composto a eluir na corrida cromatográfica; k_1 é o fator de retenção do primeiro composto a eluir na corrida cromatográfica; t_{Ra} é o tempo de retenção do primeiro composto a eluir na corrida cromatográfica; t_{Rb} é o tempo de retenção do segundo composto a eluir na corrida cromatográfica.

As determinações de ZEN e OTA foram realizadas separadamente através de HPLC-FL. As condições para a determinação de ZEN seguiram o já descrito por Garcia et al., (2018) e as condições para a determinação de OTA seguiram parâmetros utilizados por Nora, (2015). Essas determinações foram avaliadas através do tempo de retenção (t_R) de cada analito e fator de retenção (k) através da Equação 2.

A exatidão dos métodos para a quantificação das micotoxinas em amostras de cerveja e cevada malteada foi avaliada através dos ensaios de recuperação. A quantificação dos tricotecenos A e B foi realizada através da padronização por superposição de matriz. Os cálculos para expressar a porcentagem de recuperação de cada micotoxina foram realizados de acordo com a Equação 4:

$$R(\%) = \left[\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right] \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Em que: C1: concentração determinada após a contaminação; C2: concentração determinada na amostra não contaminada (branco); C3: concentração esperada para o nível de contaminação.

4.2.2 Preparo da Amostra

Embalagens da mesma marca de cerveja foram abertas, transferidas para um recipiente, homogeneizadas, desgaseificadas por agitação em banho de ultrassom e, após, foram retiradas alíquotas analíticas. As determinações foram realizadas em triplicata.

Em relação à cevada malteada, cada amostra foi moída em um moinho de facas e peneirada em malha de 32 mesh (0,5 mm). A fração obtida foi homogeneizada e quarteada. O quarteamento foi realizado manualmente até se obter a quantidade correspondente a amostra analítica. Uma amostra de cevada malteada adquirida no comércio e isenta de micotoxinas foi empregada para os procedimentos de extração das micotoxinas. Esta amostra foi contaminada com diferentes níveis de concentração das micotoxinas em estudo e, posteriormente, extraída pela técnica MSPD.

4.2.3 Procedimentos para extração de micotoxinas na cerveja

Para a extração das micotoxinas NIV, DON, 3-acetil-DON, 15-acetil-DON, T2, ZEN e OTA na cerveja, quatro técnicas de preparo de amostra foram testadas com modificações.

4.2.3.1 QuEChERS

O procedimento QuEChERS foi adaptado do método descrito por Carrasco et al., (2015). A 10 mL de amostra de cerveja desgaseificada foram adicionados 5 mL de acetonitrila e agitados em vórtex por 30 seg. Em seguida, foram adicionados 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl e a mistura foi submetida a agitação em vórtex por 30 seg, sonicada por 3 min e centrifugada a 2800 xg durante 5 min. O extrato foi submetido a um *clean up* com 0,9 g de $MgSO_4$ e 0,3 g de C18, homogeneizado em vórtex por 1 min e centrifugado a 1372 xg por 3 min. O sobrenadante foi recolhido e evaporado até a secura em banho maria a 45 °C. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila.

4.2.3.2 *Partição Líquido-Líquido com acetato de etila*

Esta técnica foi realizada de acordo com Bauer et al. (2016) com modificações. Um volume de 2 mL de cerveja desgaseificada foi extraída duas vezes por partição líquido-líquido, cada uma com 4 mL de acetato de etila. Após cada partição, a mistura foi centrifugada por 15 min a 1372 xg. Juntaram-se as duas fases orgânicas e o solvente foi evaporado até a secura em banho maria a 45 °C. Para a quantificação em HPLC, o resíduo seco foi ressuspensão em 1 mL de acetonitrila.

4.2.3.3 *Partição Líquido-Líquido com diclorometano*

Um volume de 50 mL de amostra foi homogeneizado com 50 mL de água destilada em funil de separação seguida de três partições com 10 mL de diclorometano, conforme descrito por Garda et al. (2004). As três alíquotas da partição foram reunidas, agitadas em banho ultrassônico e em seguida separadas em três porções de 10 mL e evaporadas em banho-maria a 45 °C. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspensão em 1 mL de acetonitrila.

4.2.3.4 *Extração em fase sólida (SPE)*

A técnica de SPE utilizada foi baseada no método descrito por Rubert et al. (2013) com modificações. Os cartuchos de C18 foram condicionados com 5 mL de acetonitrila / metanol (50:50, v / v) e após 5 mL de água foram eluídos. Os cartuchos foram secos por 30 minutos e, posteriormente, 10 mL de cerveja foram adicionados utilizando sistema de vácuo *Manifold*. No último passo, as micotoxinas foram eluídas adicionando 4 mL de acetonitrila / metanol (50:50, v / v). O extrato obtido foi transferido para um frasco âmbar de 15 mL e evaporado até a secura em banho maria a 45 °C. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspensão em 1 mL de acetonitrila.

4.2.4 Avaliação do procedimento de extração QuEChERS

Com base nos dados obtidos da avaliação da extração pela resposta simultânea dos valores de recuperação de micotoxinas foi padronizado o método descrito por Carrasco et al., (2015) utilizado para a determinação de micotoxinas em amostras de

cerveja empregando QuEChERS modificado. As modificações avaliadas se basearam no método QuEChERS original desenvolvido por Anastassiades et al., (2003).

Assim, neste estudo, foram realizados ensaios para avaliar a influência do tempo de extração, da proporção amostra: solvente e da quantidade de celite na etapa de limpeza em substituição ao adsorvente C18. Um delineamento composto central (DCC) 2^3 foi realizado para avaliar o método QuEChERS quanto à extração simultânea dos tricotecenos, ZEN e OTA em amostras de cerveja.

A validação do método analítico foi realizada de acordo com os guias indicados sobre esse assunto (SANTE, 2016; INMETRO, 2016; BRASIL, 2003; EC, 2006). Os parâmetros de qualidade linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, precisão e efeito matriz foram estudados a fim de avaliar a eficácia do método analítico.

Para avaliar a linearidade foram construídas curvas analíticas através da padronização externa no solvente e por superposição de matriz. O LOD e o LOQ foram estimados através da relação sinal/ruído, considerando a concentração da solução com o padrão que gerou no mínimo um sinal de 3 e 10 vezes maior que o sinal gerado pela linha de base (ruído), respectivamente.

A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação. Amostras de cerveja (isentas de micotoxinas) foram contaminadas nos níveis de 25, 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os tricotecenos e ZEN e 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para OTA a partir da adição de um volume conhecido de solução trabalho de cada micotoxina a 10 mL de amostra. A precisão foi avaliada através da precisão instrumental e precisão do método. Para avaliar a precisão instrumental foram realizadas injeções sucessivas de solução padrão na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 10$) para os tricotecenos e ZEN e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTA e estimada através do desvio padrão relativo percentual (RSD %) com relação a média das concentrações obtidas de todas as injeções. A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. O efeito matriz foi determinado a partir de curvas analíticas no solvente e curvas analíticas na matriz, em que foram avaliados os coeficientes angulares das retas.

O método QuEChERS avaliado e validado foi aplicado para a determinação de tricotecenos, ZEN e OTA em 85 amostras de cerveja tipo *lager*.

4.2.5 Ingestão Diária Tolerável

A ingestão diária tolerável (IDT) relacionada ao consumo de cerveja foi avaliada através da Equação 5. Assim, utilizando um peso corporal adulto médio de 60 kg e os dados da ocorrência das micotoxinas neste estudo, pode-se estimar a exposição diária na dieta à que adultos estão propensos pela ingestão de cerveja, referente à quantidade de micotoxinas presentes na bebida.

$$IDT = \frac{[Micotoxina].Consumo}{Peso\ corporal}$$

Equação (5)

Em que: IDT = ingestão diária tolerável; [Micotoxina] = concentração média da micotoxina na ocorrência ($\mu\text{g L}^{-1}$); Consumo = consumo diário de cerveja (L dia^{-1}); Peso corporal = média populacional estimada (kg);

Abordagens determinísticas foram utilizadas para avaliar a exposição de cada micotoxina estudada, de acordo com Cunha et al., 2018. Neste estudo, essas abordagens combinaram dados sobre o consumo de cerveja no Brasil e os níveis de micotoxinas. Para determinar os valores médios do consumo diário estimado, foram consideradas duas situações de exposição: limite inferior (LI) e limite superior (LS). Na situação de limite inferior, os níveis de contaminação e exposição são subestimados, enquanto que no limite superior é superestimado. Para estimar a exposição alimentar em uma situação de LI, todas as amostras devem receber um valor zero para os resultados não detectados ou não quantificados. Já para uma situação de LS, a exposição da dieta deve ser estimada pela atribuição do valor de LOD (limite de detecção) a todas as amostras com resultados não detectados e LOQ (limite de quantificação) a todas as amostras com valores menores que LOQ, mas mais elevados que LOD. A ingestão tolerável baseou-se na medida em que a exposição excedeu a ingestão diária máxima e os resultados da exposição foram comparados com os valores de dose de referência à ingestão máxima tolerável de DON.

4.2.6 Preparo da casca de arroz para os ensaios de adsorção

Primeiramente, a casca de arroz utilizada foi lavada com água corrente, até que o escoado se tornasse límpido. Em seguida, a casca foi seca em estufa com circulação de

ar a 90 °C até massa constante. Após, a casca de arroz foi tratada com solventes polares e apolares (metanol e hexano) de forma a reduzir a interferência de possíveis contaminantes que não fazem parte da estrutura da casca de arroz, procedimento este chamado de remoção de extrativos.

A remoção dos extrativos da casca consistiu em três lavagens com hexano, na proporção 1:4 (casca: solvente), sob agitação a 1600 rpm por 30 min cada, seguido de centrifugação. A casca de arroz passou pelo mesmo procedimento utilizando-se metanol, por fim a casca foi seca em estufa com circulação de ar a 90 °C (CARVALHO, 2011).

Para a utilização da casca de arroz como adsorvente, a amostra tratada foi moída em moinho de facas e peneirada até granulometria de 32 mesh (0,5 mm). Também foi realizada a determinação da contaminação por micotoxinas na casca de arroz tratada e o método utilizado para a extração foi QuEChERS adaptado de Seus-Arraché et al., 2018 e detecção por HPLC-UV/FL.

4.2.7 Caracterização da casca de arroz

Após, a casca de arroz sem e com tratamento foi caracterizada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists International – AOAC (2000), conforme citado: o teor de umidade foi determinado empregando gravimetria com secagem em estufa a 105 °C pelo método nº 935.29. Os lipídios foram determinados pela extração com éter de petróleo de acordo com o método 920.85. A determinação de cinzas foi realizada por gravimetria, através de incineração das amostras em mufla a 550 °C, como descrito no método 923.03. Os níveis protéicos foram determinados pelo método de micro-Kjeldahl, nº 920.87. As fibras brutas foram determinadas segundo o método 991.43, por digestão ácido-básica. Os percentuais dos outros carboidratos foram estimados por diferença, considerando o somatório dos teores de proteínas, lipídios, cinzas, umidade e fibra bruta.

A caracterização das cinzas foi realizada de acordo com métodos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (1976), como segue: cinzas solúveis e insolúveis em água, determinadas a partir do aquecimento em banho-maria por 15 min das cinzas totais, obtidas de 5 g de amostra, com 30 mL de água, o resíduo foi filtrado com 100 mL de água quente, seco em estufa a 105 °C, carbonizado em bico de bunsen e incinerado em mufla a 550 °C. A massa do resíduo final foi relacionada com a massa das cinzas totais utilizada no início do experimento, a fim de se obter o teor de cinzas insolúveis em água,

enquanto que as solúveis em água foram determinadas pela diferença entre as totais e insolúveis. A alcalinidade das cinzas solúveis em água foi verificada através da sua titulação com ácido clorídrico 0,1 M até coloração alaranjada, sendo utilizado o indicador alaranjado de metila. A alcalinidade das cinzas insolúveis em água foi determinada a partir da adição de 20 mL de água e 15 mL de ácido clorídrico 0,1 M à essa fração, levando a mistura à ebulição, após resfriamento, foi adicionado o indicador alaranjado de metila e realizada a titulação com hidróxido de sódio 0,1 M até o desaparecimento da coloração alaranjada. As cinzas solúveis e insolúveis em ácido clorídrico foram determinadas a partir do aquecimento em banho-maria por 10 min das cinzas totais, obtidas de 5 g de amostra, com 20 mL de ácido clorídrico 0,1 M, o resíduo foi filtrado com 50 mL de água quente, carbonizado, incinerado em mufla a 650 °C, a massa do resíduo final foi relacionada com a massa das cinzas totais utilizada no início do experimento, obtendo-se o teor de cinzas insolúveis em ácido clorídrico, sendo que o teor de cinzas solúveis em ácido clorídrico foi obtido por diferença.

Os teores de sílica e lignina presentes na casca de arroz tratada foram analisados pelas normas ASTM D1102 e TAPPI T 222 om-02, respectivamente. A investigação da morfologia da superfície da casca de arroz tratada foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV - Jeol JSM 6060) com tensão de trabalho de 15 kV até a ampliação de 2500 vezes. A estrutura química foi analisada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada FTIR - Fourier (Shimadzu - IR PRESTIGE-21).

4.2.8 Ensaio do método para redução dos níveis das micotoxinas em cerveja utilizando a casca de arroz como adsorvente

Inicialmente foi avaliada a quantidade de casca de arroz tratada aplicada na adsorção, com homogeneização para um volume de 10 mL de amostra de cerveja contaminada contendo as concentrações máximas obtidas das micotoxinas que apresentaram maior ocorrência (DON, ZEN e OTA). O volume de amostra foi fixado em 10 mL devido às condições de extração do método QuEChERS. Assim, foram testadas massas de 0,5, 1 e 1,5 g de casca de arroz tratada e também as velocidades de agitação orbital de 100, 150 e 200 rpm. As misturas foram realizadas em erlenmayer de 250 mL e homogeneizadas em agitador orbital até um tempo mínimo de 6 h.

Padronizadas as condições de massa de casca de arroz e agitação, o ensaio do método para a redução dos níveis de micotoxinas foi realizado para DON, ZEN e OTA

em um tempo total de 10 h, com amostragens de 30 em 30 minutos para os primeiros 10 ensaios e, após, amostragens de 1 em 1 hora para os últimos 5 ensaios, totalizando 15 ensaios para cada micotoxina. Estas foram quantificadas nas amostras de cerveja pelo método QuEChERS padronizado neste trabalho. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.9 Cinética de adsorção

Estimadas as condições do experimento que geraram a maior redução nos níveis de DON, ZEN e OTA presentes na cerveja, a capacidade de adsorção da casca de arroz no tempo “t” foi determinada pela Equação 6:

$$q_t = \frac{V(C_0 - C_t)}{m} \quad \text{Equação (6)}$$

Em que: V o volume da solução (L); m a massa de casca de arroz (g); C₀ e C_t as concentrações inicial e no tempo “t” na fase líquida (µg L⁻¹).

Os parâmetros cinéticos da operação foram calculados através de modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e a equação de Elovich (QIU et al., 2009), conforme equações relatadas na literatura.

Pseudoprimeira ordem:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad \text{Equação (7)}$$

Em que: q_t e q_e as capacidades de adsorção no instante “t” e no equilíbrio respectivamente (µg g⁻¹), e k₁ a constante cinética de pseudo-primeira ordem (1/min).

Resolvendo a Equação 7 por variáveis separáveis, considerando q_t=0 em t=0 e q_t= q_t em t=t, e rearranjando, a cinética de pseudo-primeira ordem pode ser representada pela Equação 8 (SKODRAS et al., 2008):

$$q_t = q_1(1 - \exp(-k_1 t)) \quad \text{Equação (8)}$$

Em que: q₁ o valor da capacidade de adsorção (µg g⁻¹) obtido através do modelo de pseudo-primeira ordem.

Pseudossegunda ordem:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad \text{Equação (9)}$$

Em que: k_2 a constante cinética de pseudo-segunda ordem ($\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Resolvendo a Equação 9 por variáveis separáveis, considerando $q_t = 0$ em $t=0$ e $q_t=q_t$ em $t=t$, e rearranjando, a cinética de pseudo-segunda ordem pode ser representada pela Equação 10 (SKODRAS et al., 2008):

$$q_t = \frac{t}{(1/k_2 q_2^2) + (t/q_2)} \quad \text{Equação (10)}$$

Em que: q_2 o valor da capacidade de adsorção ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) obtido através do modelo de pseudo-segunda ordem.

Modelo de Elovich:

$$q_t = \frac{1}{a} \ln(1 + abt) \quad \text{Equação (11)}$$

Em que: 'a' a velocidade inicial devido $(dq/dt) = a$, quando $q_t=0$ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), e b a constante de dessorção do modelo de Elovich ($\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) que indica a extensão da cobertura da superfície, conforme Equação 11 (WU et al., 2009).

O percentual de cada micotoxina removida (R) pela casca de arroz também foi determinado através da Equação 12:

$$R = \frac{C_0 - C_f}{C_0} 100 \quad \text{Equação (12)}$$

Em que: C_0 e C_f concentrações inicial e final na fase líquida ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), respectivamente.

4.2.10 Técnica de preparo de amostra MSPD

A técnica MSPD adaptada de Rubert et al., (2011) foi testada quanto a capacidade de extrair simultaneamente os tricotecenos (NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON e T2), OTA e ZEN da amostra de cevada malteada adquirida comercialmente, utilizando suportes alternativos comparados ao suporte sólido C18, considerado como o mais usual em técnicas de extração de analitos de amostras alimentícias.

A amostra foi contaminada artificialmente com 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada tricoteceno, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ZEN e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de OTA para posterior avaliação da recuperação.

As condições de extração iniciais fixadas para a padronização da técnica MSPD assistida por vórtex consistiu na maceração por 5 min de 1 g de amostra e 1 g de C18, seguido da etapa de extração com 10 mL da mistura acetonitrila: metanol (50:50) em tubo de fundo cônico por vórtex durante 3 min e centrifugação por 10 min a 1400 xg. O extrato obtido foi evaporado até a secura em banho-maria a 45 °C.

Os resíduos secos obtidos após cada extração foram ressuspensos em 1mL de acetonitrila, agitados em banho de ultrassom por 30 seg e centrifugados durante 5 min a 1200 xg. As micotoxinas foram identificadas e quantificadas através da cromatografia líquida com detector ultra-violeta (HPLC-UV) para os tricotecenos e detector de fluorescência (HPLC-FL) para a ZEN e OTA.

Após realizar a análise de recuperação de micotoxinas utilizando C18 na técnica MSPD, foram testados os suportes sólidos alternativos para avaliar a recuperação destes compostos em amostras de cevada.

4.2.10.1 Avaliação da MSPD utilizando diferentes suportes sólidos para extração de micotoxinas

Os suportes sólidos foram avaliados na utilização em MSPD quanto à recuperação simultânea das micotoxinas em estudo na amostra de cevada malteada. Para isso, cada um dos suportes sólidos (adsorvente sílico-celulósico, casca de arroz tratada e areia) foi utilizado separadamente na técnica MSPD. Um ensaio controle sem o uso de adsorvente também foi realizado. Em todos os ensaios foram utilizados 1 g de adsorvente, nas mesmas proporções seguindo o procedimento descrito por Rubert et al. (2011) adaptado para micotoxinas, baseado na técnica original descrita por Barker (1989).

4.2.10.2 Padronização e validação da técnica de extração MSPD

Com base nos dados obtidos da avaliação da extração de micotoxinas, foi padronizada a técnica de extração MSPD descrita por Rubert et al., (2011) utilizada para a determinação de micotoxinas produzidas em amostras de cevada.

Assim, neste estudo, foram realizados ensaios para avaliar a influência do tempo de maceração (1, 3 e 5 min), do volume da mistura de solventes extratores (5, 10 e 15 mL) e do tempo de agitação no vórtex (1, 3 e 5 min). Um delineamento composto central (DCC) 2³ foi realizado para avaliar a técnica MSPD quanto à extração simultânea dos tricotecenos, zearalenona e ocratoxina A em amostras de cevada malteada.

A validação do método analítico foi realizada de acordo com os guias indicados sobre esse assunto (SANTE, 2016; INMETRO, 2016; BRASIL, 2003; EC, 2006). Os seguintes parâmetros de qualidade foram estudados a fim de avaliar a eficácia do método analítico: linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, precisão e efeito matriz.

Para avaliar a linearidade foram construídas curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por superposição de matriz. As concentrações das soluções analíticas utilizadas para a construção das curvas foram: 0,5 – 10 µg mL⁻¹ para NIV, DON, ADONS e T2; 0,01 – 5 µg mL⁻¹ para ZEN e 0,7 – 27 ng mL⁻¹ para OTA. O LOD e o LOQ foram estimados através da relação sinal/ruído, considerando a concentração da solução com o padrão que gerou no mínimo um sinal de 3 e 10 vezes maior que o sinal gerado pela linha de base (ruído), respectivamente.

A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação. Amostras de cevada (isentas de micotoxinas) foram contaminadas nos níveis de 50, 100 e 200 µg kg⁻¹ para os tricotecenos e ZEN e 5, 10 e 20 µg kg⁻¹ para OTA a partir da adição de um volume conhecido de solução trabalho de cada micotoxina a 1g de amostra. A precisão foi avaliada através da precisão instrumental e precisão do método. Para avaliar a precisão instrumental foram realizadas injeções sucessivas de solução padrão na concentração de 3 µg mL⁻¹ (n = 10) para os tricotecenos e ZEN e 10 ng mL⁻¹ OTA e estimada através do desvio padrão relativo percentual (RSD %) com relação a média das concentrações obtidas de todas as injeções. A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. O efeito matriz foi determinado a partir de curvas analíticas no solvente e curvas analíticas na matriz, em que foram avaliadas as inclinações das retas.

A técnica MSPD padronizada e validada foi aplicada na determinação de tricotecenos, ZEN e OTA em dez amostras de cevada malteada.

4.2.11 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com 95% de confiança, considerando as triplicatas dos ensaios de cada experimento, utilizando o programa “Statistica” (versão 5.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Esse *software* também foi utilizado para realizar os planejamentos DCC 2³, bem como na estimativa para verificar o comportamento cinético dos dados.

4.2.12 Limpeza e gerenciamento dos resíduos

A solução de hipoclorito de sódio 1% foi utilizada para a limpeza de todo o material utilizado nos diferentes métodos e ensaios que continham a presença de micotoxinas. O hipoclorito de sódio garante a degradação da estrutura química dos compostos e evita a possibilidade de recontaminação ambiental durante o descarte dos resíduos.

Os resíduos orgânicos dos ensaios foram rotulados e armazenados de acordo com sua classificação, seguindo regulamento para tratamento de resíduos estabelecido na Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TRICOTECENOS A E B POR HPLC-UV, ZEARALENONA E OCRATOXINA A POR HPLC-FL

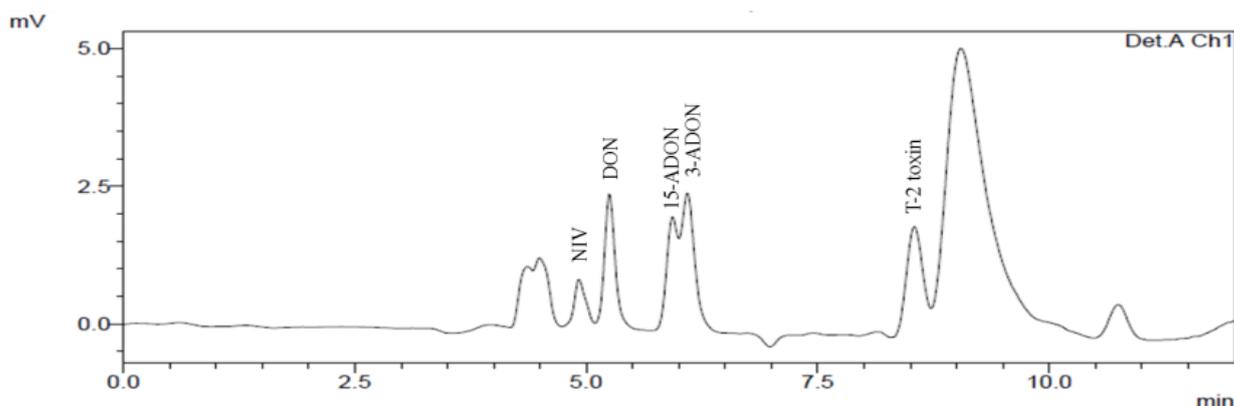
As melhores condições cromatográficas para determinação e quantificação dos tricotecenos A e B estabelecidas no sistema HPLC-UV podem ser observadas na Tabela 8. A separação dos compostos (NIV, DON, ADONS, Toxina T2) foram alcançadas usando água ultrapura (30%) e MeCN (70%) com variação de comprimento de onda de 220 nm para detecção de tricotecenos tipo B e 193 nm para detecção de tricotecenos tipo A, em um tempo de eluição cromatográfico de 12 min, onde, até 7 min foi empregado 220 nm como comprimento de onda e 193 nm até o tempo final da análise.

Tabela 8. Condições cromatográficas empregadas para determinação de tricotecenos A e B.

Parâmetros	HPLC-UV
Coluna analítica	Gemini 5 μ m C ₁₈ – 250 x 4,6 mm
Vazão de fase móvel (mL min ⁻¹)	0,5
Fase móvel (v/v)	MeCN:água (70:30)
Volume do injetor (μ L)	20
Temperatura (°C)	25

A Figura 6 apresenta a eluição dos tricotecenos NIV, DON, 15-ADON, 3-ADON e Toxina T-2 nas condições estabelecidas, bem como o tempo de eluição do analito não retido (t_M) o qual foi de 3,3 min.

Figura 6. Eluição cromatográfica em HPLC-UV dos padrões de tricotecenos.



Parâmetros para avaliar a separação dos compostos como a determinação de k (fator de retenção) e α (fator de separação) são muito importantes, já que o fator de retenção é um parâmetro amplamente utilizado para descrever as velocidades de migração dos analitos nas colunas e α um fator que, quanto maior for o seu valor, mais seletiva será a fase líquida e, portanto, uma melhor separação será encontrada (COLLINS *et al.*, 2006). Os valores ideais de k para dois componentes da separação podem variar entre 1 a 10, envolvendo múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 a 20 (FORNSTEDT, FORSSÉN e WESTERLUND, 2015). Em relação ao fator de separação α , uma boa separação implica em um fator $\alpha > 1$ e se $\alpha = 1$, os picos não estão separados, dessa forma, quanto maior o valor de α uma melhor separação será observada. Os resultados encontrados para k , para α , assim como os tempos de retenção para cada analito estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros avaliados para separação dos analitos.

Compostos	t_R (min)	k	Micotoxinas	α
NIV	4,9	0,5		
DON	5,3	0,6	DON/NIV	1,20
15-ADON	6,1	0,85	15-ADON/DON	1,42
3-ADON	6,3	0,91	3-ADON/15-ADON	1,07
Toxina T2	8,5	1,58	Toxina T2/3-ADON	1,74

t_R - tempo de retenção; k - fator de retenção; α - fator de separação

O menor valor de α , próximo de 1, foi verificado para os compostos 15-ADON e 3-ADON. Isto ocorre porque estes compostos são isômeros de posição e possuem a mesma massa molar, diferindo entre si por uma posição do grupo acetil, por isso sua separação cromatográfica torna-se muito difícil. Assim, neste estudo foi considerado um único pico para representar os ADONS em todos os estudos de extração. Este mesmo sistema de quantificação já foi utilizado por Krska *et al.*, (2007) e Arraché *et al.*, (2018). O restante dos valores de α foram satisfatórios, superiores a 1, bem como os valores de k , os quais apresentaram-se superiores a 0,5, o que é permitido quando ocorre a eluição de múltiplos componentes. Dessa forma, para a determinação e quantificação dos tricotecenos as condições cromatográficas estão estabelecidas.

A melhor condição cromatográfica para a determinação e quantificação da zeralenona no sistema HPLC-FL pode ser verificada na Tabela 10. A fase móvel foi constituída de MeCN (90%) e água acidificada a 1% com ácido acético, em um tempo

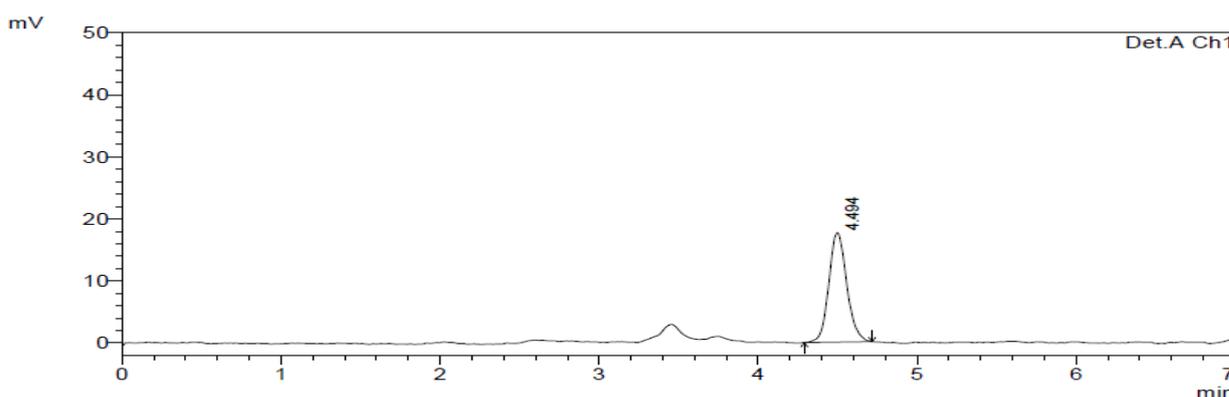
de eluição de 7 min com comprimentos de onda de detecção de 270 nm (excitação) e 455 nm (emissão).

Tabela 10. Condições cromatográficas empregadas para determinação de zearalenona.

Parâmetros	HPLC-FL
Coluna analítica	Gemini 5 μm C ₁₈ – 250 x 4,6 mm
Vazão de fase móvel (mL min ⁻¹)	0,8
Fase móvel (v/v)	MeCN:água acidificada 1% (90:10)
Volume do injetor (μL)	20
Temperatura (°C)	25

A Figura 7 apresenta a eluição da zearalenona nas condições estabelecidas, bem como o tempo de eluição do analito não retido (t_M) o qual foi de 3,3 min.

Figura 7. Eluição cromatográfica em HPLC-FL de zearalenona.

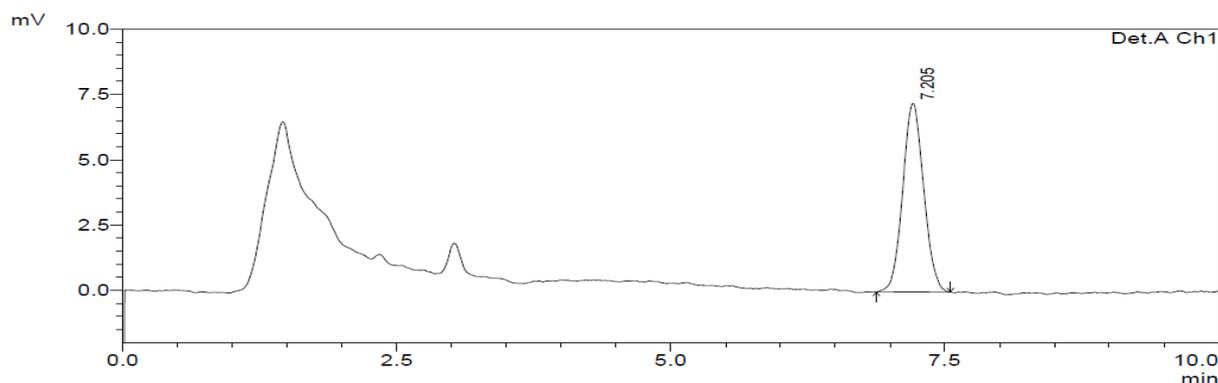


O t_R para ZEN foi de 4,5 min, possibilitando um tempo de análise cromatográfica de 7 min. O valor de k de 0,4 para ZEN demonstra que, mesmo não estando de acordo com os intervalos ideais indicados pela literatura, o pico está distante do tempo morto, caracterizando uma boa separação, como observado na Figura 7. Dessa forma, por meio das condições estabelecidas, foi possível detectar ZEN em HPLC-FL de maneira eficaz, possibilitando o emprego do método na detecção e quantificação das amostras em estudo.

As melhores condições cromatográficas para detecção da OTA em HPLC-FL estão estabelecidas na Tabela 11. O comprimento de onda de excitação foi de 333 nm e de emissão foi de 460 nm. A Figura 8 apresenta o cromatograma de eluição da ocratoxina A, no tempo de eluição de 7,2 min bem como o tempo do analito não retido (t_M) igual a 3 min.

Tabela 11. Condições cromatográficas empregadas para determinação de ocratoxina A.

Parâmetros	HPLC-FL
Coluna analítica	Kromasil 5 μm C ₁₈ – 150 x 4,6 mm
Vazão de fase móvel (mL min ⁻¹)	1,0
Fase móvel (v/v)	MeCN:água (50:50)
Volume do injetor (μL)	20
Temperatura (°C)	25

Figura 8. Eluição cromatográfica em HPLC-FL de ocratoxina A.

O valor de k de 1,4 para OTA demonstra que o fator de retenção está de acordo com os intervalos ideais indicados pela literatura, intervalo entre 1 a 10 (FORNSTEDT, FORSSÉN e WESTERLUND, 2015), possibilitando, dessa forma, detectar OTA em HPLC-FL de maneira eficiente com as condições estabelecidas para a determinação e quantificação desta micotoxina nas amostras em estudo.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA PROPOSTAS PARA A DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS NA CERVEJA

Primeiramente, foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos para a recuperação de tricotecenos, ZEN e OTA, conforme cálculo através da Equação 4, utilizando as quatro técnicas propostas: QuEChERS, partição líquido-líquido com acetato de etila, partição líquido-líquido com diclorometano e SPE. A Tabela 12 apresenta as recuperações obtidas pelos métodos propostos, para as amostras de cerveja contaminadas com 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada tricoteceno e ZEN e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTA.

O método QuEChERS foi o que apresentou as melhores recuperações para todas as micotoxinas em estudo, com valores entre 70 e 95%. Estes valores são aceitáveis

quando se avalia misturas complexas, como a cerveja, rica em carboidratos, proteínas e álcool. Pode-se concluir que o *clean up* utilizado no método de extração QuEChERS foi eficaz, apresentando menor número de picos, não ocorrendo co-eluição de compostos quando comparados aos outros procedimentos de extração testados. Nesta etapa, também pode-se avaliar as extrações pelas técnicas por partição líquido-líquido e SPE, no entanto, estas técnicas apresentaram menores valores de recuperação que o método QuEChERS, os quais podem estar relacionados com os interferentes da matriz, ou com a avaliação mais específica da técnica para a extração dessas micotoxinas em cerveja. Concluiu-se também que, pela utilização dos sais no método QuEChERS, a transferência das micotoxinas para a fase orgânica foi favorecida.

Dadas as promissoras recuperações alcançadas pelo método QuEChERS e suas vantagens em reduzir a geração de resíduos e o tempo de exposição dos analistas, este método foi adaptado para a determinação de tricotecenos, ZEN e OTA em amostras de cerveja.

Tabela 12. Recuperação de tricotecenos, ZEN e OTA para as quatro técnicas de preparo de amostra propostas.

Métodos	Recuperações (%) (RSD %)					
	NIV	DON	ADONS	T2	ZEN	OTA
QuEChERS	71 (9,8)	95 (7,6)	81 (5,2)	78 (4,8)	82 (4,1)	81 (3,8)
PLL – acetato de etila	49 (7,8)	89 (7,2)	52 (6,3)	77 (9,6)	76 (3,5)	70 (3,2)
PLL- diclorometano	30 (12,5)	76 (7,5)	59 (4,5)	79 (8,5)	69 (3,8)	68 (3,0)
SPE	40 (1,5)	53 (8,8)	47 (5,6)	65 (6,3)	70 (4,1)	52 (3,5)

RSD% = desvio padrão relativo. n = 3.

5.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE MULTIMICOTOXINAS EM CERVEJA

Com base no aumento da recuperação das concentrações de micotoxinas estudadas pelo método de extração QuEChERS, a principal modificação testada foi a troca de C18 por celite, com o objetivo de reduzir o custo do método mantendo a

efetividade, visto que C18 é um adsorvente de elevado valor comercial. A proporção amostra: solvente e o tempo de extração também foram otimizados, pontos críticos das técnicas de preparo de amostra quando se refere à recuperação de analitos. Dessa forma, nesta etapa, foi realizado um delineamento composto central (DDC) 2³, conforme a Tabela 13, com as variáveis avaliadas em função da recuperação das multimicotoxinas. A fortificação das amostras de cerveja realizadas para esta avaliação foi de 50 µg L⁻¹ de cada tricoteceno e ZEN e 10 µg L⁻¹ de OTA.

Tabela 13. Matriz do DCC 2³ com as variáveis e níveis avaliados em função da porcentagem de recuperação para cada micotoxina utilizando o método QuEChERS adaptado.

Ensaio	Recuperações (%)								
	Celite (g)	Proporção Amostra: MeCN	Tempo de Extração (min)	NIV	DON	ADONS	T2	ZEN	OTA
	X1	X2	X3						
1	-1(0,1)	-1(1:0,5)	-1(5)	144	99,8	73,8	70,2	63,1	68,1
2	1(0,5)	-1(1:0,5)	-1(5)	25,6	42,3	61,2	64,5	92,3	92,6
3	-1(0,1)	1(1:2)	-1(5)	107,1	169,5	41,5	60,3	72,2	69,2
4	1(0,5)	1(1:2)	-1(5)	197,7	64,5	73,0	70,3	92,6	95,3
5	-1(0,1)	-1(1:0,5)	1(15)	72,4	102,2	97,1	77,3	68,9	66,8
6	1(0,5)	-1(1:0,5)	1(15)	57,8	77,8	73,2	65,2	93,5	104
7	-1(0,1)	1(1:2)	1(15)	32,2	175,1	32,2	42,3	80	56,2
8	1(0,5)	1(1:2)	1(15)	0	108,5	80,2	45,2	83,2	92,8
9	0(0,3)	0(1:1)	0(10)	82,0	107,7	85,3	78,6	82,4	80,6
10	0(0,3)	0(1:1)	0(10)	80,5	104,8	85,0	76,5	82,5	80,7
11	0(0,3)	0(1:1)	0(10)	79,4	97,7	88,4	73,6	86,5	85,9

Os resultados obtidos das recuperações de cada tricoteceno, ZEN e OTA foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), utilizando um intervalo de confiança de 95%. A ANOVA foi utilizada para determinar a adequacidade do modelo gerado pelas variáveis significativas, ou seja, para descobrir os efeitos principais e as interações das variáveis independentes em relação a variável dependente (variável resposta). Através do teste estatístico de Fischer (F), o valor de F foi obtido de acordo com a razão entre a média dos quadrados da regressão e a média dos quadrados do resíduo, indicando o significado de cada um dos fatores controlados sobre o modelo testado. Se o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado o modelo é dito preditivo.

Após a obtenção dos resultados referentes a recuperação de cada micotoxina, foi realizado o cálculo do efeito de cada variável (X_1 , X_2 e X_3) e da interação das mesmas sobre a variável resposta (recuperação). A Tabela 14 apresenta os coeficientes e os efeitos significativos das variáveis estudadas e de suas interações.

Com a análise estatística dos efeitos das variáveis independentes em relação às variáveis respostas de recuperação das micotoxinas separadamente, pode-se concluir que as variáveis apresentaram efeitos positivos e negativos para as recuperações de todas as micotoxinas. Neste estudo, um aumento na quantidade de celite na etapa de *clean up* ocasionou um aumento na recuperação de ADONS, ZEN e OTA, mas, em contrapartida, apresentou influência negativa para as recuperações de NIV, DON. Para a recuperação da toxina T2 a quantidade de celite não apresentou influência. A etapa de limpeza ocorre simultaneamente com a remoção de água residual pela utilização do sulfato de magnésio. Os sorventes possuem a capacidade de reter os interferentes da matriz e a etapa de *clean up* torna-se essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos. A utilização de C18 como sorvente nesta etapa de *clean up* do método QuEChERS tem sido utilizada e efetiva para amostras de alimentos contendo teores de gordura maiores ou iguais a 2% (WALORCZYK, 2007) como arroz, cevada, trigo, óleos vegetais. Já a celite, formada a partir de terra diatomácea, possui como componente majoritário a sílica, a qual é muito utilizada para a adsorção de corantes e pigmentos alimentícios. A celite, entre os adsorventes, destaca-se pelo seu baixo custo e alta área superficial específica e, por possuir estrutura inerte, com ausência de grupos reativos, a adsorção que ocorre é de natureza física (ERDEN et al., 2005; TSAI et al, 2004; DEMIRBAS, 2009). No caso da cerveja, os principais interferentes de matriz são os açúcares, os ácidos orgânicos e os pigmentos e a celite mostrou-se efetiva quando

utilizada no *clean up* do método QuEChERS, apresentando resultados semelhantes aos obtidos quando esta etapa foi realizada com C18.

Tabela 14. Efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão do DCC 2³ em relação as variáveis e interações significativas para os resultados de recuperação de NIV, DON, ADONS, T2, ZEN e OTA utilizando o método QuEChERS adaptado.

DCC 2 ³	Variáveis Significativas	Efeito	Desvio Padrão	p*	Coeficientes de Regressão
Recuperação NIV	Mean	79,88	0,39	0,0000	79,88
	X1	-18,65	0,92	0,0024	-9,33
	X2	9,30	0,92	0,0097	4,65
	X3	-78	0,92	0,0001	-39
	X1 x X2	47,85	0,92	0,0004	23,93
	X1 x X3	-4,75	0,92	0,0357	-2,38
	X2 x X3	-58,30	0,92	0,0003	-29,15
Recuperação DON	Mean	104,53	1,55	0,0002	104,53
	X1	-63,38	3,64	0,0033	-31,69
	X2	48,88	3,64	0,0055	24,44
	X3	21,88	3,64	0,0266	10,94
	X1 x X2	-22,43	3,64	0,0253	-11,21
	X1 x X3	17,88	3,64	0,0390	8,94
Recuperação ADONS	Mean	71,90	0,57	0,0000	71,90
	X1	10,75	1,33	0,0149	5,38
	X2	-19,60	1,33	0,0046	-9,80
	X3	8,30	1,33	0,0248	4,15
	X1 x X2	29	1,33	0,0021	14,50
	X2 x X3	-9,35	1,33	0,0019	-4,68
Recuperação T2	Mean	65,82	0,76	0,0001	65,82
	X2	-14,78	1,78	0,0141	-7,39
	X3	-8,83	1,78	0,0382	-4,41
	X1 x X2	7,68	1,78	0,0496	3,84
	X2 x X3	-12,73	1,78	0,0189	-6,36
Recuperação ZEN	Mean	81,56	0,71	0,0000	81,56
	X1	19,35	1,65	0,0072	9,68
	X1 x X2	-7,55	1,65	0,0448	-3,78
Recuperação OTA	Mean	81,11	0,91	0,0001	81,11
	X1	31,10	2,14	0,0047	15,55

*Variáveis significativas ($p < 0,05$).

X1: celite (g); X2: proporção amostra:MeCN; X3: tempo de extração (min).

Um aumento na proporção amostra: solvente resultou na maior recuperação de NIV e DON, não influenciando significativamente para a recuperação de ZEN e OTA. Já para ADONS e toxina T2, uma proporção menor de amostra: solvente fez aumentar a porcentagem de recuperação destes tricotecenos.

O tempo de extração apresentou efeitos positivos e significativos para DON e ADONS e efeitos negativos para NIV e toxina T2, já para ZEN e OTA não demonstrou influência na variável resposta. Neste caso, DON e ADONS podem estar ligados e necessitam de um processo extrativo com maior tempo para que ocorra o rompimento desta interação física entre eles, o que não ocorre com os outros tricotecenos. Essa variação nos efeitos que interferem no preparo de amostra pode estar relacionada com a complexidade das estruturas químicas das micotoxinas e seus diferentes radicais, aliado ao fato de que os tricotecenos, ZEN e OTA pertencem a grupos estruturais diferentes. Dessa forma, o teste F (Fischer) foi realizado através da ANOVA para cada variável resposta com o objetivo de verificar se as equações de regressão, representativas do modelo, são estatisticamente significativas. A recuperação de NIV apresentou um coeficiente de correlação (R) igual a 0,90, indicando que o modelo é considerado significativo. O valor do teste F calculado foi de 2,54, sendo menor que o valor de F tabelado (6,16), indicando que o modelo não é preditivo para a variável recuperação de NIV. O mesmo ocorreu para ADONS (F calculado = 2,1) e para a toxina T2 (F calculado = 1,53), no entanto para estas duas micotoxinas o modelo é significativo com coeficientes de correlação (R) iguais a 0,9 e 0,85, respectivamente.

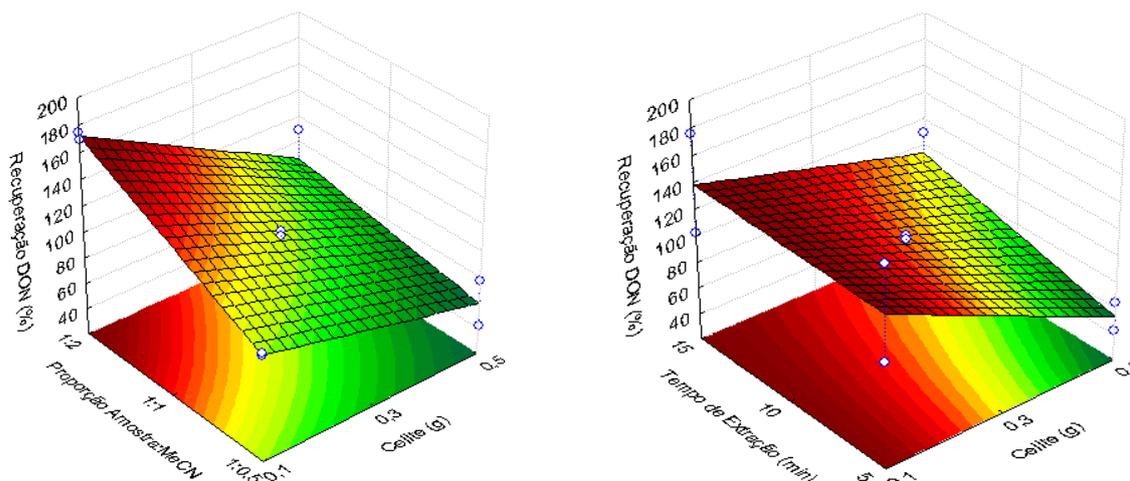
O coeficiente de correlação (R) para a recuperação de DON foi de 0,99, indicando que o modelo é considerado significativo. O valor do teste F calculado foi de 166,5, sendo 27 vezes maior que o valor de F tabelado (6,16), influenciada individualmente por todas as variáveis independentes e pelas interações da quantidade de celite *versus* proporção amostra: solvente e pela quantidade de celite *versus* tempo de agitação. Estes dados resultaram em um modelo muito preditivo e significativo, representado pela Equação 13.

$$\text{Recuperação de DON (\%)} = 104,53 - 31,69X_1 + 24,44X_2 + 10,94X_3 - 11,21X_1.X_2 + 8,94X_1.X_3$$

Equação (13)

A Figura 9 apresenta as superfícies de respostas geradas pelo modelo preditivo e significativo em relação à recuperação de DON, onde podemos observar que os melhores resultados para a recuperação de DON encontram-se nos níveis do ponto central para a interação das variáveis significativas.

Figura 9. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação de DON no método QuEChERS adaptado.

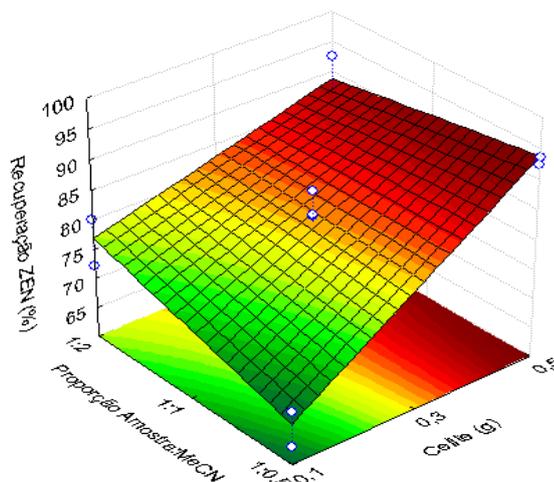


O F calculado para a variável dependente recuperação de ZEN foi de 12,29, 2 vezes superior ao F tabelado (6,16), assim o modelo foi considerado preditivo pois também apresenta significância ($R = 0,97$). No entanto, alguns autores afirmam que para ser preditivo o F calculado deve ser de 3 a 5 vezes maior que o F tabelado (KALIL, MAUGERI e RODRIGUES, 2000). O modelo gerado para a variável recuperação de ZEN, influenciado individualmente pela quantidade de celite e pela interação das variáveis quantidade de celite x proporção amostra:solvente, pode ser então representado pela Equação 14. A Figura 10 apresenta a superfície de resposta que representa este modelo na interação das variáveis significativas quantidade de celite *versus* proporção amostra:solvente. Pode-se observar que as melhores condições de aumento dos teores de recuperação ocorrem quando se aumenta a quantidade de celite e se diminui a proporção amostra:solvente, esta última com baixa significância.

$$\text{Recuperação de ZEN (\%)} = 81,56 + 9,68X1 - 3,78 X1.X2$$

Equação (14)

Figura 10. Superfície de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação de ZEN no método QuEChERS adaptado.

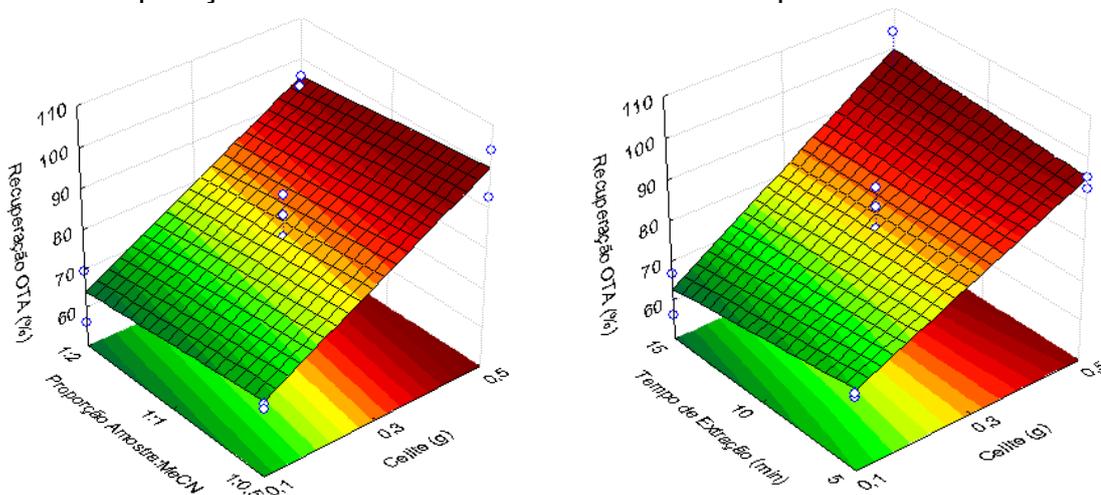


A variável resposta recuperação de OTA também apresentou um modelo preditivo, sendo que seu F calculado de 54,81 é maior que o F tabelado (6,16), influenciado estatisticamente somente pela quantidade de celite utilizada. A Equação 15 representa o modelo preditivo e significativo ($R = 0,99$) e a Figura 11 apresenta as superfícies de resposta geradas para a recuperação de OTA quando presente a quantidade de celite, única variável significativa. Pode-se observar que maiores quantidades de celite proporcionam maiores valores de resposta da variável recuperação de OTA.

$$\text{Recuperação de OTA (\%)} = 81,11 + 15,55X1$$

Equação (15)

Figura 11. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação de OTA no método QuEChERS adaptado.



Dessa forma, considerando os efeitos das variáveis significativas para a eficiência da extração dos tricotecenos, ZEN e OTA e também, considerando os resultados de recuperação obtidos com o DCC 2³, optou-se por utilizar no método as condições do ponto central, ou seja, uma proporção de amostra:solvente de 1:1 com um tempo de extração de 10 minutos e 0,3 g de celite no método modificado padronizado.

A Tabela 15 apresenta os valores de recuperação obtidos dos tricotecenos, ZEN e OTA, de acordo com as adaptações realizadas no método QuEChERS segundo Carrasco et al. (2015). A contaminação das amostras de cerveja realizadas para esta avaliação foi de 50 µg L⁻¹ de cada tricoteceno e ZEN e 10 µg L⁻¹ de OTA. Pode-se observar que os resultados foram adequados para a determinação de tricotecenos, ZEN e OTA na cerveja, uma vez que apresentaram valores de recuperação dentro da faixa de 70 a 120%, para todas as micotoxinas em estudo.

Tabela 15. Resultados de recuperação para as micotoxinas em estudo utilizando o método QuEChERS adaptado.

Níveis de Contaminação µg L ⁻¹	Recuperações (%)					Níveis de Contaminação µg L ⁻¹	Recuperações (%)
	RSD (%)						
	NIV	DON	ADONS	T2	ZEN		OTA
25	71 (9,3)	92 (8,5)	84 (8,7)	75 (6,8)	84 (8,8)	5	83 (7,8)
50	82 (8,8)	101 (5,5)	88 (8,9)	78 (5,2)	87 (5,2)	10	88 (8,8)
100	83 (7,5)	98 (5,1)	95 (6,2)	79 (4,2)	95 (4,5)	20	89 (6,3)

RSD% = desvio padrão relativo. n = 3.

O procedimento QuEChERS padronizado neste estudo envolveu a adição de 10 mL de amostra de cerveja desgaseificada a 10 mL de MeCN, e a mistura foi homogeneizada em um agitador orbital a 150 rpm por 10 min. Em seguida, adicionaram-se 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl e agitou-se a mistura durante 30 s, sonicou-se durante 3 min e depois centrifugou-se a 2800 g durante 5 min. O extrato foi submetido à extração em fase sólida com 0,9 g de MgSO₄ e 0,3 g de celite, submetido a vórtice por 1 min e

centrifugado a 1372 g por 3 min. O sobrenadante foi recolhido e evaporado até à secura num banho de água a 45 °C.

5.3.1 Validação do método analítico QuEChERS padronizado

Os parâmetros de linearidade (faixas de calibração e coeficientes de correlação) obtidos para cada tricoteceno por HPLC-UV e para zearalenona e ocratoxina A por HPLC-FL estão expressos na Tabela 16. Com os resultados obtidos em relação a construção das curvas analíticas em HPLC-UV-FL, foi possível concluir que o modelo de regressão linear se mostrou adequado para as determinações em estudo. Os coeficientes de correlação (R) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações do EURACHEM/CITAC (2000), que recomenda R acima de 0,99.

Tabela 16. Valores dos parâmetros de linearidade para a validação do método analítico QuEChERS – HPLC-UV/FL.

Micotoxinas	Faixa de calibração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente de correlação (R)
NIV	15 – 100	0,995
DON	15 – 100	0,999
ADONS	15 – 100	0,997
Toxina T-2	15 – 50	0,995
ZEN	10 – 200	0,998
OTA	2 – 20	0,991

A Tabela 17 apresenta os limites de detecção e quantificação do método, efeito matriz (%), exatidão através de recuperações em 3 níveis avaliados (%), precisão avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária (% RSD) em nível baixo e alto para os tricotecenos, ZEN e OTA. O efeito matriz mostrou enriquecimento do sinal para todas as micotoxinas em estudo. Esses efeitos foram considerados baixos para DON, toxina-T2, ZEN e OTA, pois os valores encontrados foram entre -20 e + 20%. Para NIV e ADONS, esses efeitos foram altos porque os valores estavam acima de + 50% (ECONOMOU, 2009). Neste caso, com o uso da celite na etapa de *clean up* do método, a qual possui capacidade de remover majoritariamente os pigmentos, provavelmente fez com que alguns açúcares e ácidos orgânicos presentes na cerveja permanecessem ainda no extrato final, interferindo na detecção de NIV e ADONS. Para compensar todos

esses efeitos, foi realizada a calibração com o extrato branco da matriz correspondente para cada uma das micotoxinas. A precisão do método, através dos testes de recuperação, apresentou valores adequados para compostos traços, micotoxinas, dentro da faixa aceitável de 70 – 120% (INMETRO, 2016).

Tabela 17. Validação do método QuEChERS padronizado para as amostras de cerveja: Limite de detecção do método (LOD) e limite de quantificação do método (LOQ); Efeito Matriz (%); Porcentagens de recuperação (3 níveis), precisão avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária em nível baixo ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) e nível alto ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) para OTA e nível baixo ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) e nível alto ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) para tricotecenos e ZEN.

Micotoxina	LOD _(m) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ _(m) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EM ^a (%)	Rec (%)	Repetibilidade ^b (%)		Precisão ^c Intermediária (%)	
					Nível Baixo	Nível Alto	Nível Baixo	Nível Alto
NIV	3,0	10,0	54	76,7	4,4	5,9	8,2	6,2
DON	2,5	8,2	8,2	97,8	3,5	6,1	8,9	7,7
ADONS	3,5	11,5	53	93,4	6,5	3,5	7,8	7,0
T2	2,7	9,0	2,5	77,4	5,8	4,9	7,6	6,7
ZEN	3,0	10,0	3,5	91,1	7,9	6,0	5,5	4,1
OTA	0,2	0,7	3,2	86,6	8,7	7,2	8,1	5,2

^a EM (%): (inclinação da curva preparada no extrato da matriz - inclinação da curva preparada no solvente / inclinação da curva preparada no solvente) x 100;

^b Repetibilidade (número de replicatas: 10);

^c Precisão intermediária (dias diferentes: 5).

5.3.2 Ocorrência de micotoxinas em cerveja

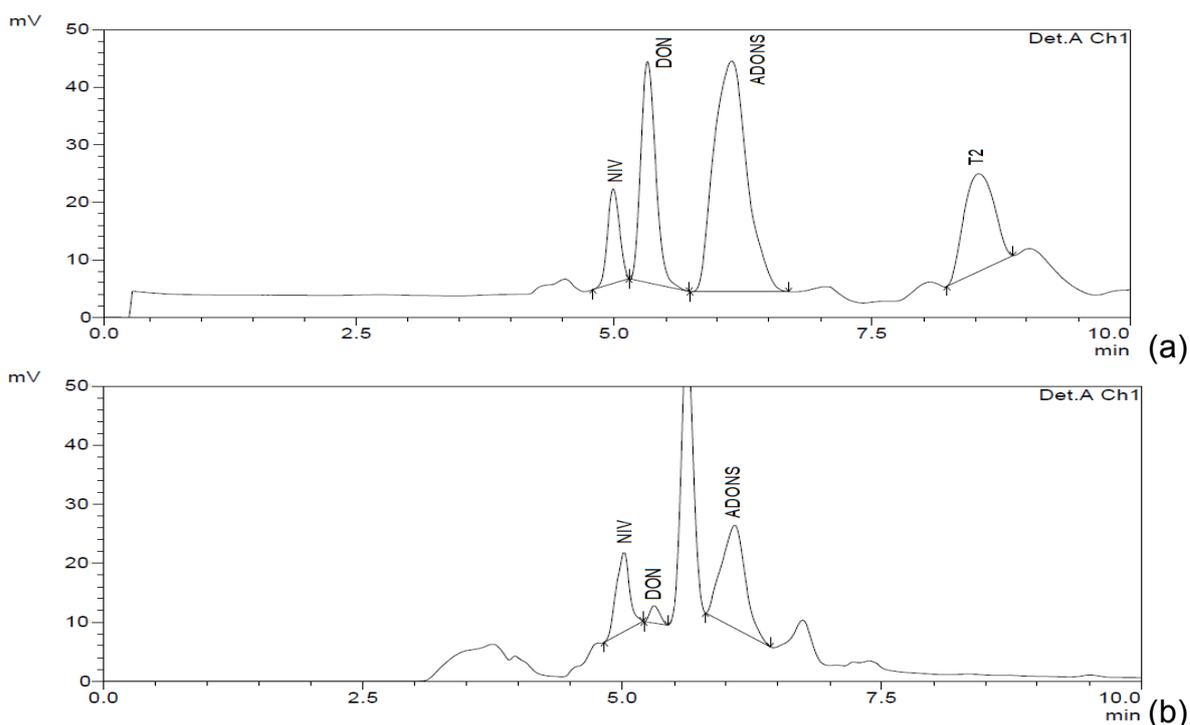
O método QuEChERS modificado e validado neste estudo foi aplicado para determinar tricotecenos, ZEN e OTA em 85 amostras de cervejas industrializadas. A Tabela 18 apresenta as faixas de contaminação e as médias de cada tricoteceno, ZEN e OTA nas amostras de cerveja analisadas. Entre as 85 amostras apenas 13% (duas amostras de cerveja lager de trigo, duas amostras de cerveja puro malte e sete amostras de cerveja lager) não apresentaram níveis detectáveis de nenhuma dessas micotoxinas. A co-ocorrência de algumas micotoxinas também foi observada em 19% das amostras, 16 amostras de cerveja foram contaminadas com mais de uma micotoxina.

A micotoxina de maior ocorrência foi DON, presente em 46% do total de todas as amostras ($12,2\text{--}79,1 \mu\text{g L}^{-1}$). Entre as cervejas lager, 32 amostras apresentaram teores

de DON na média de $23,6 \mu\text{g L}^{-1}$, as quais possuíam em sua formulação cevada malteada e cereais não malteados não especificados, assim como carboidratos de outras fontes não descritas. Quatro cervejas de trigo e três cervejas puro malte estavam contaminadas com DON na média de $24,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $28,3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A Figura 12 apresenta a eluição cromatográfica de um padrão de tricotecenos na matriz e de uma amostra de cerveja contaminada simultaneamente com NIV, DON e ADONS. DON é considerada uma das micotoxinas mais comumente encontrada em cereais no mundo, especialmente em cereais usados para fabricação de cerveja, como cevada e trigo. Estudos já mostraram que os níveis de contaminação por micotoxinas precisam ser monitorados, especialmente em produtos que usam cereais armazenados com potencial contaminação, como cerveja.

Figura 12. Eluição cromatográfica em HPLC-UV dos padrões de tricotecenos na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e de uma amostra contaminada com NIV, DON e ADONS na média de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ (b).



Bauer et al. (2016) detectaram DON em 75% das 44 amostras de cerveja estudadas, em um intervalo de contaminação de $2,2$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Outro estudo realizado com cerveja de várias nacionalidades diferentes (Irlanda, Alemanha, Bélgica e Polônia) relatou DON em 100% das 91 amostras avaliadas (6 - $70 \mu\text{g L}^{-1}$) (KUZDRALINSKI et al., 2013). Carrasco et al. (2015) quantificaram o DON em 59,7% das 154 amostras de

cerveja pesquisadas, variando de 24,5 a 47,7 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estas quantidades foram semelhantes as encontradas no presente estudo.

Além dos estudos de caso, alguns autores demonstraram que DON pode ser muito estável durante o processo cervejeiro (BOHM-SCHRAML et al., 1997; WOLF-HALL, 2007). Niessen (1993) encontrou um aumento de quatro vezes nas concentrações de DON, associado, provavelmente, a liberação de micotoxinas “mascaradas” como o DON-3-Glucosídico e o Deepóxi-DON durante o processo de fermentação, sugerindo que o deoxinivalenol pode ser liberado de proteínas conjugadas durante a transformação do malte de cevada em cerveja. Em outro estudo, Lancova et al. (2008) relataram que na maltagem, o conteúdo das micotoxinas monitoradas (DON, NIV) foi maior em comparação com a cevada original.

No presente estudo, também foram encontrados valores para outros tricotecenos, como NIV (19% das amostras), ADONS (15% das amostras) e toxina-T2 (4,7% das amostras). Das 85 cervejas analisadas, quatro amostras continham toxina T-2 a uma concentração média de 12,9 $\mu\text{g L}^{-1}$. A principal fonte de toxina T-2 pode ser o trigo e as quatro amostras contaminadas com esta micotoxina eram cervejas de trigo, o que explica que a possível contaminação ocorreu ao nível das matérias-primas utilizadas. Embora a ocorrência de toxina-T2 tenha sido baixa (detectada apenas em 4 amostras), seu monitoramento é de fundamental importância por ser o tricoteceno com maior toxicidade. Rubert et al. (2013) encontraram a toxina T-2 em 3 das 49 amostras avaliadas, numa faixa de concentração de 4-12 $\mu\text{g L}^{-1}$. A toxina T-2 é considerada uma preocupação crítica quando encontrada em produtos alimentícios, devido a seus efeitos hematotóxicos e imunotóxicos, que podem causar sérios danos ao organismo (OSSELAERE et al., 2013).

Na co-ocorrência, três amostras de cerveja de trigo apresentaram níveis de NIV, DON e ADONS na média de 23,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, 25,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 38,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os maiores teores de DON (79,1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e de ADONS (71,6 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram encontrados em uma dessas amostras de cerveja de trigo, também contaminada com NIV (21,2 $\mu\text{g L}^{-1}$), indicando que a presença dessas micotoxinas pode ter sido causada pela utilização de trigo contaminado ainda no campo, pois são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, os quais proliferam-se ainda durante o plantio.

Tabela 18. Ocorrência de micotoxinas em amostras de cerveja Lager (n=85) comercializadas na região Sul do Brasil.

Micotoxinas	Amostras positivas	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	
		Faixa ^a	Média ^b
NIV	16/85	26,2 – 44,4	36,9
DON	39/85	22,2 – 79,1	37,1
ADONS	13/85	25,2 – 71,6	42,7
T2	4/85	11,5 – 14,3	12,9
ZEN	14/85	11,1 – 37,2	20,8
OTA	11/85	1,2 – 4,8	2,9
NIV; DON	3/85	20,5 – 39,1	24,7
NIV; ADONS	4/85	33 – 69,8	32,7
DON; ZEN	4/85	16,3 – 42,5	16,9
NIV; DON; ADONS	3/85	23,1 – 79,1	40,9
DON; T2; ZEN	1/85	11,5 – 28,6	23,9
NIV;DON;ADONS;ZEN	1/85	13,7 – 61,3	30,7

^{a, b} Todas amostras positivas.

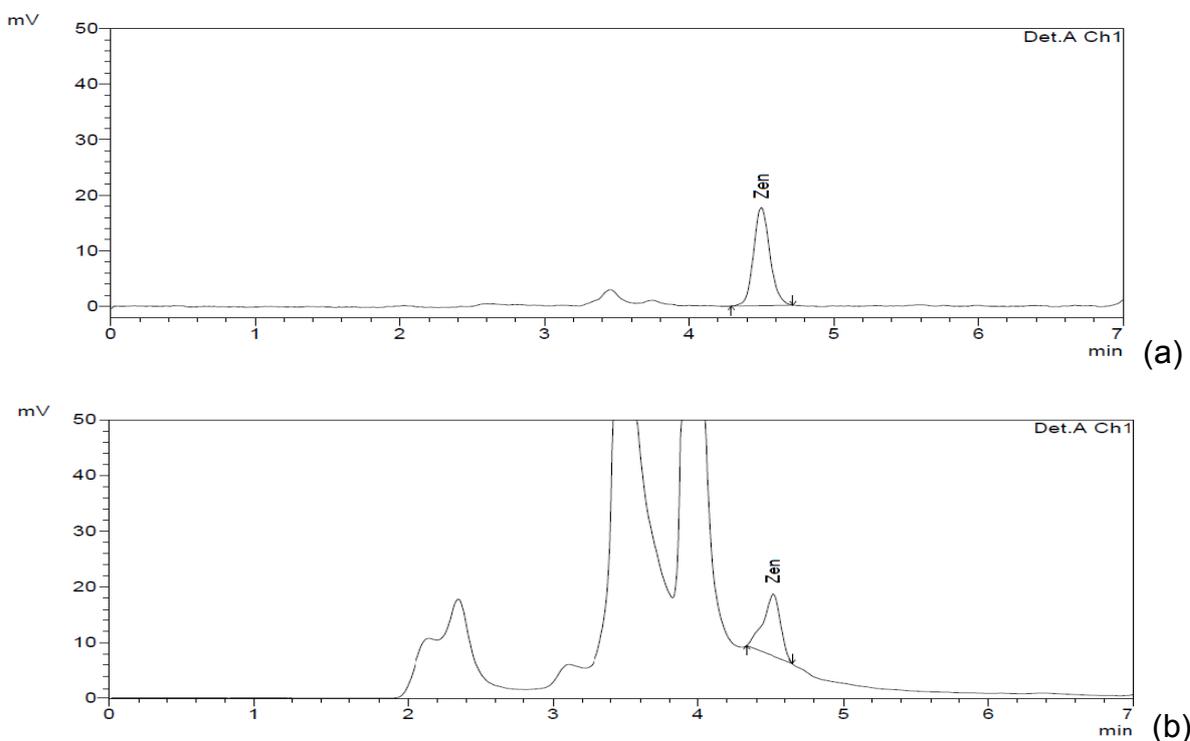
Outros estudos realizados no Brasil também avaliaram o conteúdo de micotoxinas em cervejas brasileiras. Por exemplo, Garda et al. (2004) determinaram a ocorrência de DON e toxina T-2 em 72 amostras de cerveja e observaram que 9,7% destas estavam contaminadas, incluindo 5,3% com DON ($50\text{-}336 \mu\text{g L}^{-1}$) e 4,5% com toxina T-2 ($114\text{-}249 \mu\text{g L}^{-1}$). Piacentini et al. (2014) avaliaram a presença de DON e fumonisina B1 em 53 amostras de cervejas artesanais do sul do Brasil e detectaram a presença de DON ($127\text{-}501 \mu\text{g L}^{-1}$) e fumonisina B1 ($29\text{-}285 \mu\text{g L}^{-1}$) em 32 e 15% das amostras, respectivamente.

Além dos tricotecenos, ZEN e OTA também foram investigadas no presente estudo. ZEN foi encontrada em 16% das amostras, na faixa de concentração de $11,1\text{-}37,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Entre as cervejas puro malte, um total de doze amostras foram contaminadas com ZEN, na média de $19,76 \mu\text{g L}^{-1}$, indicando que essa contaminação pode ter sido provocada também pela utilização de grãos de cevada previamente contaminados no campo. A Figura 13 apresenta os cromatogramas de um padrão e de uma amostra de cerveja contaminada com ZEN. Bauer et al. (2016) encontraram que 100% das amostras

analisadas (44) estavam contaminadas com ZEN, numa faixa de concentração de 0,4 a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já um outro estudo realizado na Espanha com 64 amostras de cerveja demonstrou que 65% destas estavam contaminadas com ZEN na faixa de 8,24 a 62,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PASCARI et al., 2018), sendo que quantidades semelhantes de ZEN na cerveja foram encontradas no presente estudo.

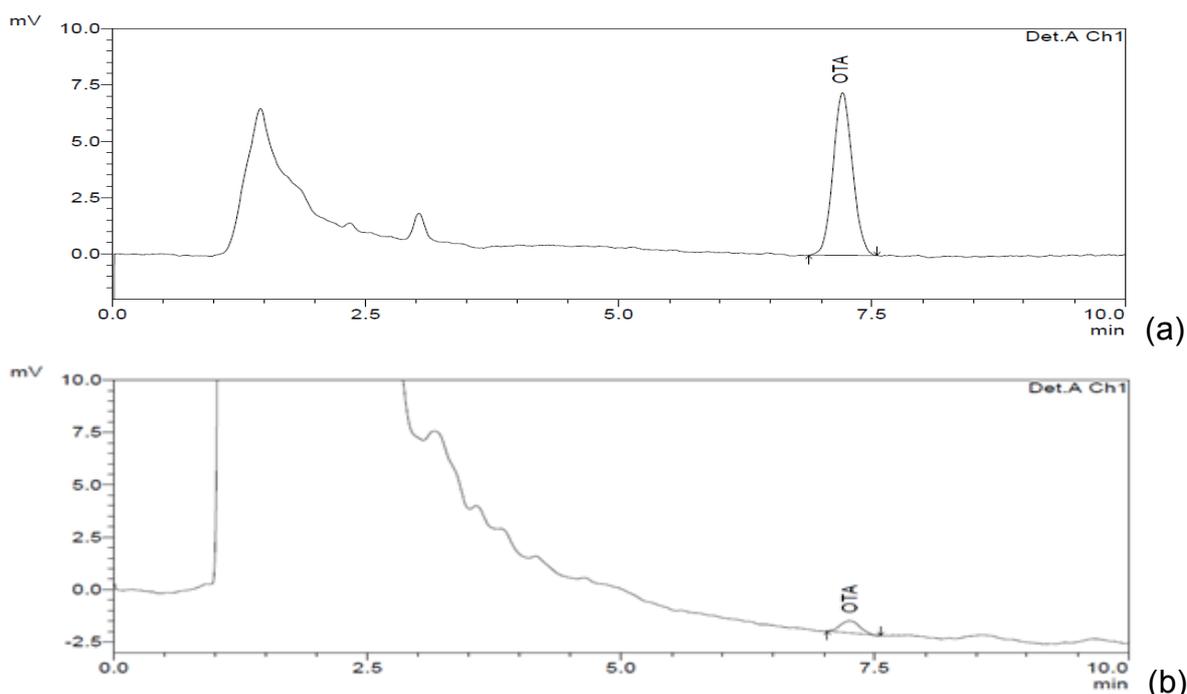
Uma amostra de cerveja de trigo foi contaminada com DON, toxina T-2 e ZEN e uma única amostra de cerveja puro malte foi contaminada com NIV, DON, ADONS e ZEN. Todas estas micotoxinas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium* e provavelmente contaminaram a cevada e o trigo no campo. Estudos anteriores já demonstraram que as principais micotoxinas presentes no malte de cevada, o principal ingrediente das cervejas tipo *Lager*, são aquelas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (WOLF-HALL, 2007), sendo que, cereais que são utilizados como adjuntos não maltados (por exemplo, milho), também são passíveis de contaminação por micotoxinas, podendo transferir estes compostos tóxicos para a cerveja (TORRES et al., 1998).

Figura 13. Eluição cromatográfica em HPLC-FL do padrão de ZEN 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e de uma amostra contaminada com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ZEN (b).



A ocratoxina A (OTA) foi encontrada em 13% das 85 amostras consideradas neste estudo, na faixa de 1,2 a 4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nenhuma das amostras de cerveja de trigo ou puro malte foram contaminadas com OTA. No entanto, a ocorrência de OTA em amostras de cerveja do tipo lager pode indicar que o armazenamento e o processamento do malte não foram realizados sob condições adequadas. Um estudo realizado na Espanha por Legarda e Burdaspal (1998) encontrou OTA em 91,4% das amostras estudadas, com uma contaminação média de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Belakova et al., (2011) quantificaram OTA em 39 % das 115 amostras de cerveja analisadas na faixa de 1 a 24,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, faixa esta semelhante a encontrada no atual estudo. A Figura 14 apresenta a eluição cromatográfica de um padrão e de uma amostra de cerveja contaminada com OTA determinada neste estudo.

Figura 14. Eluição cromatográfica em HPLC-FL do padrão de ocratoxina A 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a) e de uma amostra contaminada com 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ OTA (b).



O aparecimento de micotoxinas na cerveja pode ser resultado da contaminação por grãos maltados ou aditivos alimentares. Ingredientes adicionados durante o processo de fabricação de cerveja, xaropes de milho, arroz moído, cevada moída, se já contaminados no campo ou armazenados sob condições adversas, também podem contribuir para a contaminação do mosto no processo de fermentação. A cevada é a principal matéria-prima na fabricação de cerveja, sendo usada em formas maltadas e

não maltadas. As duas etapas na produção de cerveja que empregam altas temperaturas, nas quais a redução de micotoxinas pode ser obtida são a mosturação e a esterilização do mosto para a fermentação subsequente. Por outro lado, a fase de fermentação também pode reduzir o conteúdo desses compostos devido a capacidade adsorviva dos complexos de carboidratos presentes na parede celular da levedura, no entanto, apesar do substancial consumo mundial de cerveja, o processo de fermentação ainda é pouco estudado na redução das micotoxinas durante seus estágios de fabricação.

5.3.3 Estimativa da ingestão diária de micotoxinas no consumo de cerveja industrializada

Neste estudo, a ID tolerável foi estimada para NIV, DON, ADONS e ZEN, considerando que essas micotoxinas tiveram maior ocorrência entre as amostras pesquisadas e ainda a ID relacionada ao consumo de cerveja pode ser avaliada por sua co-ocorrência, uma vez que NIV, DON, ADONS e ZEN foram detectadas simultaneamente em uma amostra. Utilizando-se um peso corporal médio adulto de 60 kg e os dados de ocorrência de micotoxinas obtidos neste estudo, estimou-se a exposição diária à NIV, DON, ADONS e ZEN por meio da ingestão de cerveja. O consumo médio de 60,7 L / ano de cerveja per capita (EUROMONITOR, 2017), equivalente a 0,17 L / dia de cerveja, resultou em uma exposição ao DON de 0,08 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia para um adulto de 60 kg (LI = 0,035 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia; LS = 0,036 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia). Para NIV, ADONS e ZEN, os valores estimados de exposição foram de 0,05 (LI = 0,0028 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia; LS = 0,0060 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia), 0,1 (LI = 0,018 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia; LS = 0,019 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia) e 0,06 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia (LI = 0,008 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia; LS = 0,018 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia) para um adulto médio. Para a co-ocorrência, a ID calculada foi de 0,09 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia. Todos os IDs estimados foram inferiores à ID tolerável máxima provisória de 1 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia para DON, estipulados pelo Comitê de Especialistas Conjuntos em Aditivos Alimentares da FAO / OMS (JECFA, 2000). Embora essas estimativas estejam abaixo do limite estabelecido pela regulamentação, a presença de DON e outras micotoxinas na cerveja deve ser uma preocupação para a indústria, principalmente porque muitas das micotoxinas causam sérios problemas de saúde, como câncer e doenças do sistema

nervoso. Salienda-se que o cálculo da estimativa de ingestão diária tolerável também deve levar em consideração o consumo de outros alimentos importantes tais como pão, massas, frutas, entre outros, os quais constituem a dieta de um adulto.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE ARROZ

A composição proximal da casca de arroz foi determinada antes e após pré-tratamento visando sua aplicação como adsorvente, a fim de verificar se ocorreu alguma alteração na sua composição (Tabela 19). Os teores encontrados estão de acordo com os previstos por Walter, Marchesan e Avila (2008), que relatam uma composição média da casca de arroz nos seguintes níveis: cinzas: 13,2 a 21,0%; lipídios: 0,3 a 0,8%; proteínas: 2,0 a 2,8%; fibras: 34,5 a 45,9% e carboidratos: 22,0 a 34,0%.

Tabela 19. Composição proximal da casca de arroz controle (sem tratamento prévio) e tratada na fração peneirada de 0,5 mm.

Frações	Casca de arroz Controle (%) [*]	Casca de arroz Tratada (%) [*]
Umidade	8,9 ± 0,04 ^a	7,9 ± 0,03 ^a
Cinzas	16,3 ± 0,18 ^a	15,5 ± 0,11 ^a
Lipídios	0,9 ± 0,03 ^a	0,8 ± 0,03 ^a
Proteínas	2,9 ± 0,07 ^a	3,0 ± 0,11 ^a
Fibras	41,1 ± 0,18 ^a	39,5 ± 0,8 ^a
Carboidratos ^{**}	29,9 ± 0,04 ^b	33,3 ± 0,18 ^a

^{*}Resultados expressos como média (%) ± desvio padrão. ^{**}Estimados por diferença. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os teores de umidade, lipídios, proteínas e fibras não diferiram ($p > 0,05$) entre as amostras de casca controle e pré-tratada, ou seja, o tratamento da casca não alterou as quantidades dos constituintes majoritários. No entanto, somente um decréscimo dos percentuais de cinzas na casca de arroz tratada foi observado, sendo que estas podem ter sido lixiviadas pelos solventes utilizados no tratamento e, provavelmente, não eram

constituintes nativos da casca, estando aderidos a sua superfície. No entanto, mesmo com o tratamento da casca com solventes, o teor de cinzas permaneceu elevado.

Considerando que quanto maior o teor de sílica, maior a possibilidade de ocorrer adsorção, um estudo da fração mineral quanto aos seus grupos constituintes elementares fornece informações importantes para a utilização da casca como adsorvente. Assim, a Tabela 20 apresenta os resultados da distribuição dos grupos minerais nas cinzas da casca tratada.

O teor de alcalinidade das cinzas insolúveis em água (11,1%), comprova que a forma de ácido silícico representa quase que a totalidade das cinzas insolúveis (13,7%). Este teor de sílica na casca de arroz apresentou-se acima daquele encontrado por Carvalho (2011), que foi igual a 9,4% e muito próximo do encontrado por Sgaglioni e Badiale Furlong (2016), na ordem de 14%. O teor de sílica nas suas diferentes formas químicas pode ser representado pelos teores de cinzas insolúveis em ácido, sendo extremamente importante para o papel de adsorvente de compostos orgânicos em técnicas analíticas de purificação ou de preparo de amostra.

Tabela 20. Composição das cinzas da casca de arroz tratada.

Caracterização das cinzas	Teores (%)*
Cinzas insolúveis em água	13,7 ± 0,11
Cinzas solúveis em água	2,2 ± 0,04
Alcalinidade das cinzas insolúveis em água	11,1 ± 0,24
Alcalinidade das cinzas solúveis em água	28,8 ± 0,31
Cinzas insolúveis em ácido clorídrico	12,1 ± 0,11
Cinzas solúveis em ácido clorídrico	2,1 ± 0,09

*Resultados expressos como média (%) ± desvio padrão.

A composição química média da casca, em base anidra, é de 50% de celulose, 30% de lignina e 20% de sílica (SiO₂), sendo que a lignina e a celulose podem ser removidas através da combustão (PEDROZO, 2008). Se houver controle da temperatura

na combustão da casca obtém-se a sílica, em um estado amorfo e microporoso, altamente reativa (METHA, 1992).

De acordo com a Norma ASTM D1102, ensaios realizados na casca de arroz por Rosa et al. (2017) resultaram em um teor médio de cinzas de 16,1%. A análise da lignina insolúvel total segundo Norma TAPPI T 222 om-02, também chamada de lignina Klason, foi de $22,4 \pm 1\%$ (Tabela 21). Esse valor condiz com o que é reportado em outros estudos (BEVILAQUA, 2010; CHANDRASEKHAR et al., 2003; JOHAR, AHMAD, DUFRESNE, 2012; KUMAR et al., 2010) pois sendo a casca de arroz um composto de origem natural, o percentual de compostos existentes pode variar de acordo com as condições de cultivo. Além disso, a perda de massa do processo de remoção dos extrativos foi de 2,0% e o restante da composição do material foi avaliada como celulose e hemicelulose.

Tabela 21. Composição química da casca de arroz.

Composto	Composição (%) [*]
Extrativos (ceras, lipídeos, etc)	$2,0 \pm 0,04$
Lignina	$22,4 \pm 1$
Sílica	$16,1 \pm 0,13$
Celulose + Hemicelulose	$59,6 \pm 1$

^{*}Resultados expressos como média (%) \pm desvio padrão.

Após a verificação da promissora característica da composição da casca visando sua aplicação como adsorvente, outros parâmetros foram analisados com o objetivo de promover as características biossorventes deste resíduo da agroindústria, como a sua morfologia de superfície e o seu espectro de infravermelho.

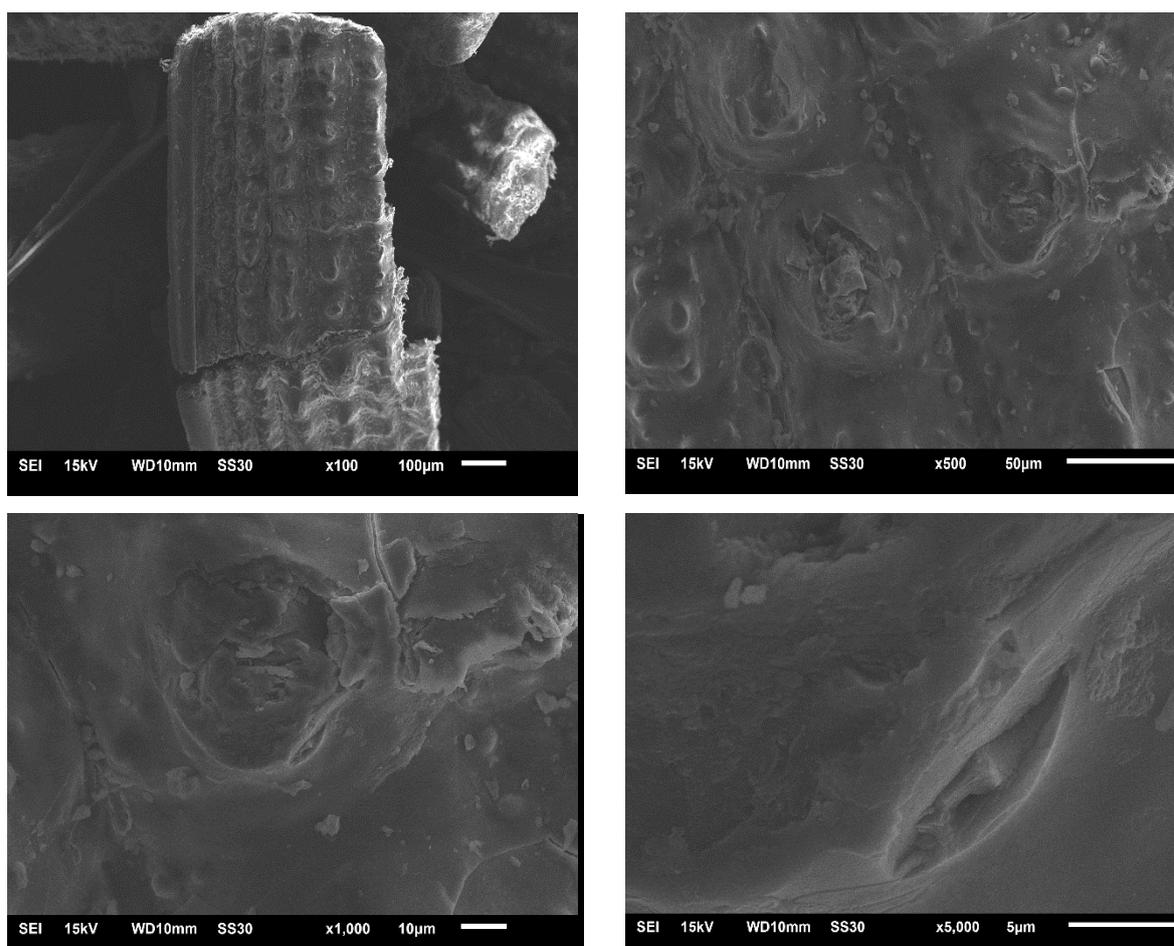
5.4.1 Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A análise morfológica da casca de arroz tratada com tamanho de partícula 0,5 mm está representada na Figura 15. Tipicamente, a casca de arroz apresenta uma estrutura globular, os principais componentes interligam-se firmemente uns com os outros e estão na forma de lema e pálea, bainhas membranosas que constituem a casca (PARK et al.,

2003). A epiderme externa apresenta um corrugado estrutural altamente sulcado, o qual contém papilas e pêlos de tamanhos variados com um perfil linear bem organizado (cristas lineares e sulcos), enquanto seus cumes são pontuados por proeminentes protrusões globulares (CHANDRASEKHAR et al., 2003). As imagens do MEV mostram que a capacidade de adsorção da casca de arroz pode ser decorrente devido a presença de ranhuras na sua estrutura, as quais já foram detectadas em outros estudos (FOO, HAMEED, 2009; JOHAR et al., 2012; SCAGLIONI, BADIALE FURLONG, 2016).

Fatores como área de superfície, microporoestrutura e grupos de superfície do adsorvente, geralmente possuem influência significativa na sua capacidade de adsorção (SUN et al., 2005). Assim, a determinação da presença dos grupos funcionais nas suas superfícies pode estar correlacionada também com a capacidade adsortiva (LIU et al., 2013).

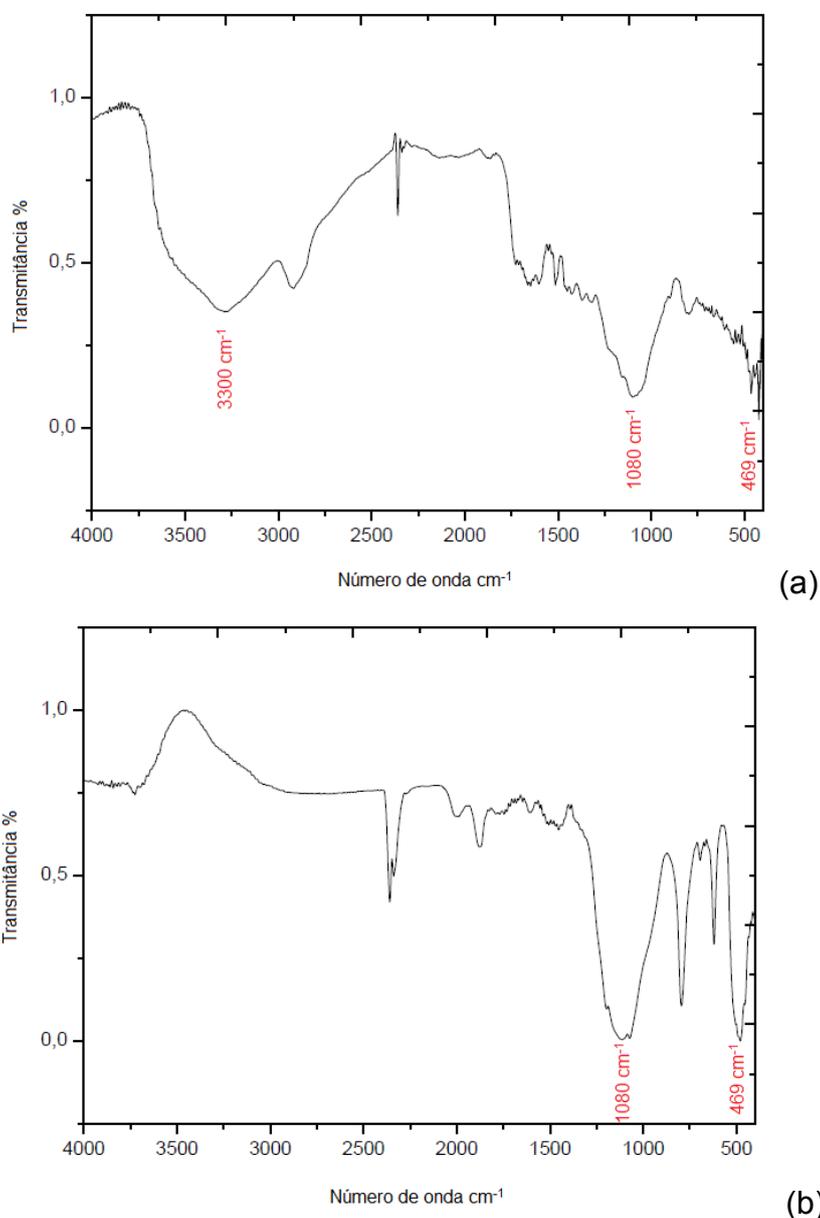
Figura 15. Estrutura da casca de arroz tratada com granulometria de 0,5 mm.



5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

A Figura 16 apresenta uma comparação entre os espectros de infravermelho da casca de arroz tratada e da sílica da casca de arroz, extraída e separada da casca de arroz, de acordo com procedimento descrito por Rosa et al. (2017). Pode-se observar através dos espectros de FTIR similaridade das duas curvas quanto a presença das bandas de estiramento Si-OSi (1080 cm^{-1}) e Si-H (469 cm^{-1}), bandas importantes relacionadas à propriedade adsorvente da casca. Já a banda O-H (3300 cm^{-1}), relacionada a presença de celulose é observada somente no espectro da casca de arroz.

Figura 16. Espectro de infravermelho da casca de arroz (a) e espectro de infravermelho da sílica extraída da casca de arroz (b).



5.5 ENSAIO DO MÉTODO PARA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DAS MICOTOXINAS EM CERVEJA UTILIZANDO A CASCA DE ARROZ COMO ADSORVENTE

A quantidade de casca de arroz tratada mais promissora para a utilização no processo de adsorção de DON foi 0,5 g, conforme dados da Tabela 22. A cerveja utilizada nos testes foi contaminada artificialmente com 98 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DON, 37 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ZEN e 5,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ de OTA.

Tabela 22. Estimativa da quantidade adsorvida de DON, ZEN e OTA sobre 0,5 g de casca de arroz tratada.

Micotoxina	Micotoxina no extrato inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Micotoxina no extrato final ($\mu\text{g L}^{-1}$)/ RSD(%)	% Adsorvida na casca
DON	98	48,39 / 6,3	51
ZEN	37	< LQ _m	> 90
OTA	5,8	0,73 / 6,3	88

RSD: desvio padrão relativo (%). n=3.

LQ_(m) ZEN: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$

Durante o experimento foi constatado que as quantidades mais elevadas de casca testadas não foram ideais, pois ocorreu um entumescimento da casca, o que tornou difícil a homogeneização com a amostra líquida (cerveja), tanto que no teste que utilizou 1,5 g de casca não foi possível realizar o procedimento de extração pois o volume de amostra de cerveja foi inadequado para aplicação do método de extração QuEChERS padronizado. O mesmo ocorreu com ZEN e OTA, onde a quantidade de casca de arroz que melhor apresentou resultados foi 0,5 g. Padronizada a proporção de casca de arroz tratada e cerveja, a velocidade de agitação avaliada entre 150 e 200 rpm possibilitou concluir que maiores velocidades se tornaram impraticáveis pois a agitação mais elevada fez com que a casca permanecesse na parede do erlenmeyer, reduzindo a área de contato entre o adsorvente e o meio, inviabilizando a completa homogeneização. Assim, optou-se pela realização dos ensaios da cinética com o uso da velocidade de 100 rpm.

Dessa forma, para a realização da cinética de adsorção das micotoxinas sobre a casca de arroz, os seguintes parâmetros foram padronizados: homogeneização de 0,5

g de casca de arroz tratada com 10 mL de cerveja, a uma velocidade de 100 rpm, durante 10 h. Nestes ensaios de cinética, a cerveja foi contaminada na concentração de $98 \mu\text{g L}^{-1}$ de DON, $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de ZEN e $5,8 \mu\text{g L}^{-1}$ de OTA.

5.5.1 Cinética de Adsorção

A Tabela 23 apresenta a quantidade de cada micotoxina adsorvida na massa de casca de arroz (qt) após transcorridos os respectivos tempos de contato entre a cerveja e a casca, bem como o número de amostragens realizadas.

A Figura 17 apresenta o comportamento da adsorção de DON sobre a casca de arroz durante o tempo, podendo-se verificar que a saturação máxima foi atingida no tempo de 420 minutos, definindo o equilíbrio, sendo observada uma redução da taxa de adsorção após este tempo de interação. Para isso, a quantidade de micotoxina adsorvida no equilíbrio (q_e) foi considerada igual a $0,8800 \mu\text{g g}^{-1}$, este valor corresponde a concentração máxima possível de DON a ser encontrada na casca de arroz, considerando a fortificação inicial das amostras de cerveja.

Figura 17. Capacidade de adsorção de DON sobre a casca de arroz.

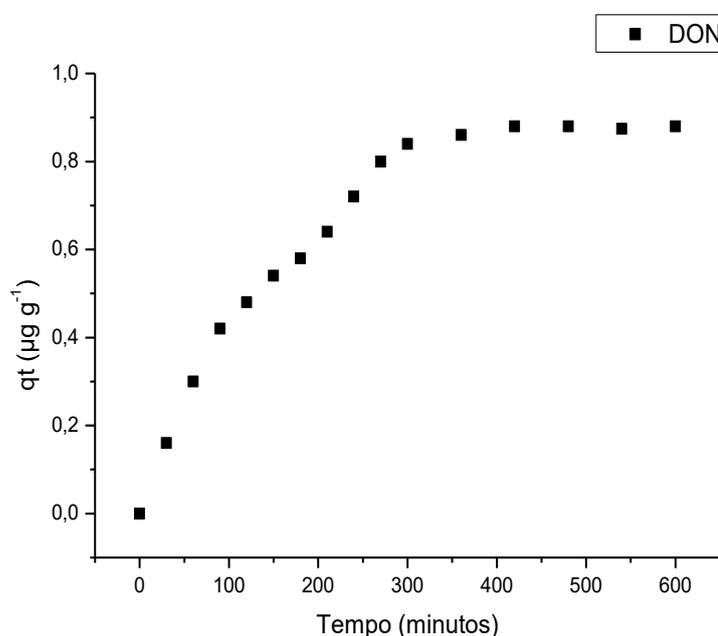


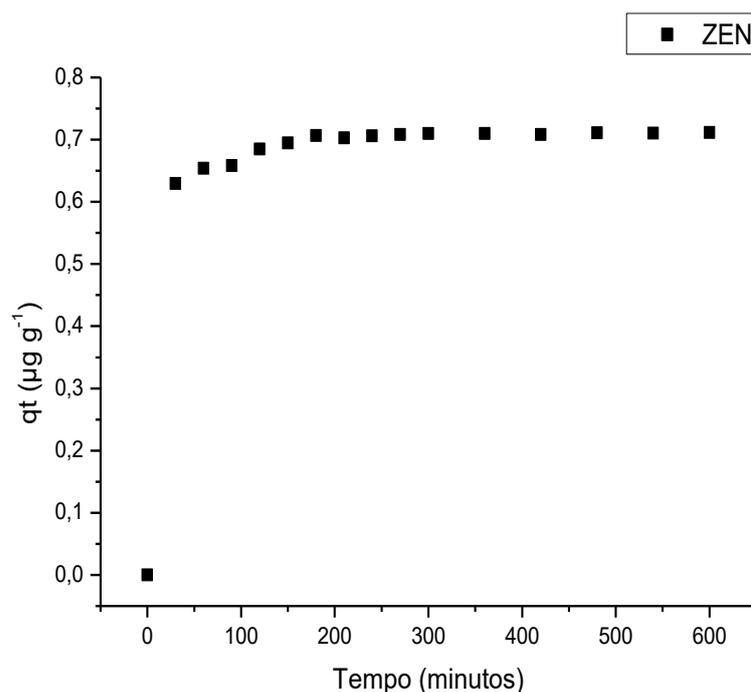
Tabela 23. Capacidade adsortiva de DON, ZEN e OTA da casca de arroz em função do tempo.

Amostragens	Tempo (min)	qt ($\mu\text{g g}^{-1}$) DON	qt ($\mu\text{g g}^{-1}$) ZEN	qt ($\mu\text{g g}^{-1}$) OTA
1	30	0,1600	0,6294	0,0398
2	60	0,3000	0,6537	0,0478
3	90	0,4200	0,6580	0,0605
4	120	0,4800	0,6846	0,0691
5	150	0,5400	0,6947	0,0721
6	180	0,5800	0,7067	0,0789
7	210	0,6400	0,7028	0,0793
8	240	0,7200	0,7062	0,0825
9	270	0,8000	0,7083	0,0838
10	300	0,8400	0,7098	0,0838
11	360	0,8600	0,7096	0,0855
12	420	0,8800	0,7082	0,0858
13	480	0,8800	0,7107	0,0863
14	540	0,8740	0,7106	0,0861
15	600	0,8800	0,7112	0,0864

qt: quantidade de micotoxina adsorvida na casca de arroz ao longo do tempo.

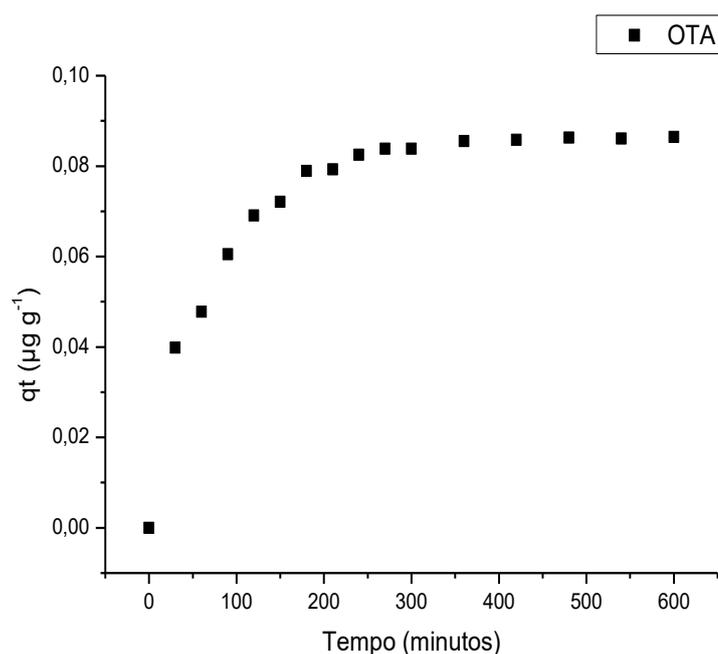
Através da Figura 18 pode-se observar que a adsorção de ZEN sobre a casca de arroz foi inicialmente rápida, pois cerca de 85% de saturação ocorreram nos primeiros 30 minutos. Após, a taxa de adsorção foi diminuindo, o equilíbrio foi alcançado em 270 minutos e a quantidade de ZEN adsorvida neste equilíbrio (q_e) foi considerada igual a $0,7083 \mu\text{g g}^{-1}$.

Figura 18. Capacidade de adsorção de ZEN sobre a casca de arroz.



Por fim, a Figura 19 apresenta o comportamento da adsorção de OTA sobre a casca de arroz durante o tempo e pode-se verificar que nos primeiros 180 minutos ocorreu cerca de 90 % de saturação e o equilíbrio foi atingido no tempo de 360 minutos, demonstrando que a interação entre adsorvente e adsorvato necessita de aproximadamente 6 horas para ocorrer. A quantidade de OTA adsorvida no equilíbrio (q_e) foi considerada igual a $0,0855 \mu\text{g g}^{-1}$

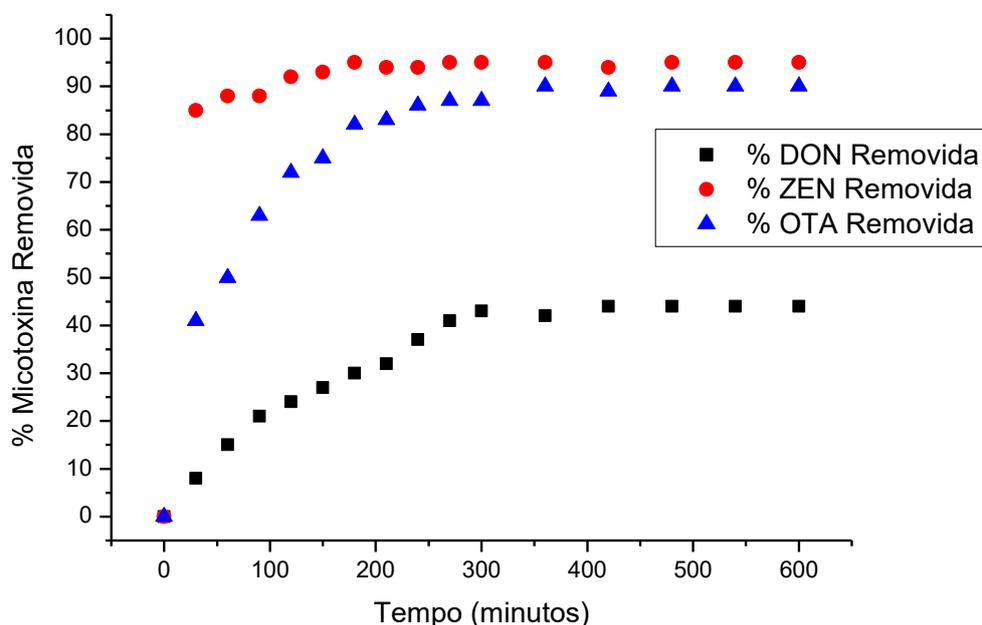
Figura 19. Capacidade de adsorção de OTA sobre a casca de arroz.



A porcentagem removida de cada micotoxina na cerveja ao longo do tempo também foi determinada, de acordo com as Figura 20. Pode-se observar que nos primeiros 30 minutos somente 8% da concentração inicial de DON ficou adsorvida na casca de arroz, o mesmo não ocorreu com ZEN em que 85% da sua concentração já ficaram aderidos sobre a casca de arroz. OTA apresentou nos primeiros 30 minutos uma adsorção de 41% da sua concentração sobre a casca de arroz. Para DON a máxima quantidade adsorvida foi 44% no tempo de 420 minutos, já a adsorção de ZEN sobre a casca de arroz atingiu um valor máximo de 95% no tempo de 270 minutos e OTA uma adsorção máxima de 90% no tempo de 360 minutos, conforme observado na Figura 20.

Dados de adsorção de DON, ZEN e OTA presentes em cerveja sobre a casca de arroz em outros trabalhos não existem, sobretudo de micotoxinas em geral. Somente um estudo foi publicado por Scaglioni e Badiale-Furlong (2016) em que determinaram condições operacionais para a adsorção de outros grupos de micotoxinas, aflatoxinas B1 e M1, presentes em leite. Os autores utilizaram 0,5 g de casca de arroz na granulometria de 42 mesh e 10 mL de leite. Em tais condições se atingiram níveis de adsorção em torno de 100% para as AFLAB1 e AFLAM1 sobre a casca de arroz, inicialmente presentes em leite.

Figura 20. Remoção de DON (%), ZEN (%) e OTA (%) presentes na cerveja ao longo do tempo utilizando a casca de arroz como adsorvente.



Com o objetivo de conhecer o tipo de adsorção que ocorreu em cada operação foram utilizadas as Equações (8, 10 e 11) dos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Elovich. Os parâmetros de ajuste dos modelos cinéticos de pseudo-segunda ordem e Elovich estão apresentados na Tabela 24. O modelo cinético de pseudo-primeira ordem apresentou valores de coeficiente de determinação muito baixos ($R^2 < 0,000$) e erro médio relativo acima de 20% ($EMR > 20\%$) para a adsorção das três micotoxinas sobre a casca de arroz. Após realizar o procedimento de ajuste dos modelos, o fenômeno de adsorção para todas as micotoxinas foi melhor representado pelo modelo de pseudo-segunda ordem (Figura 21), por apresentar valores de R^2 maiores que os do modelo de Elovich e $EMR < 10\%$ para a adsorção de DON, ZEN e OTA sobre a casca de arroz.

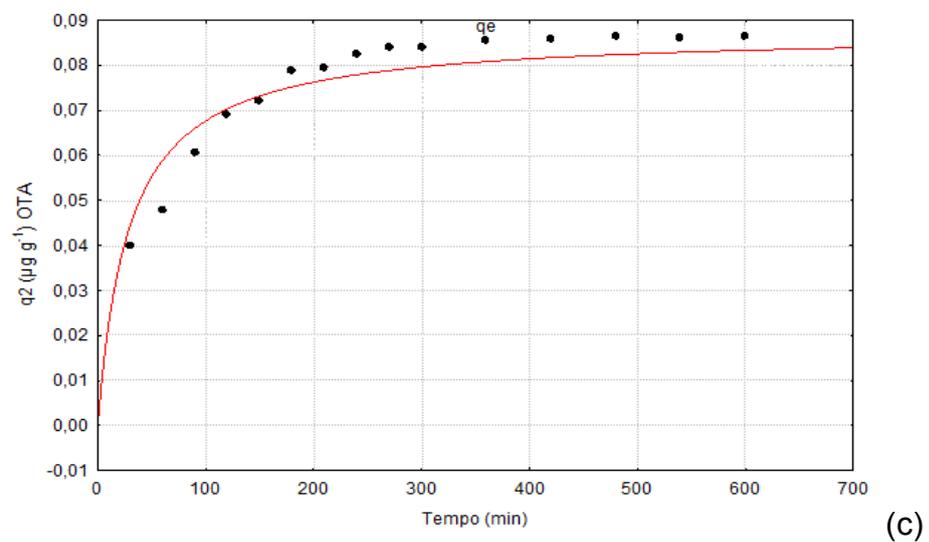
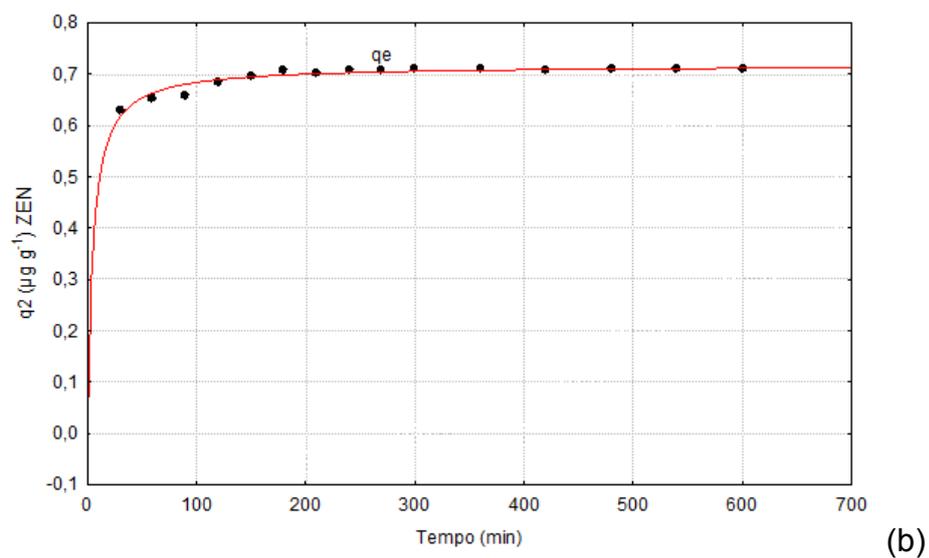
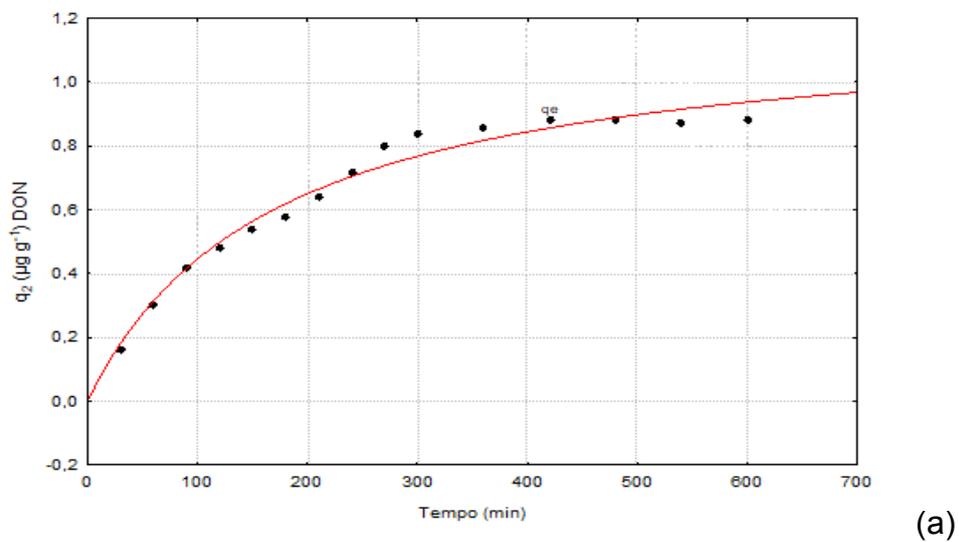
Tem-se por definição que o modelo cinético de pseudo-segunda ordem é baseado no pressuposto de que a etapa determinante da velocidade envolve o mecanismo de interação do analito com o biossorvente, ou seja, depende das interações físico-químicas entre o sorvato e os grupos da superfície (MIMURA et al., 2010). Este modelo também acopla na mesma equação os efeitos interno e externo de transferência de massa, e geralmente é adequado em processos de quimissorção (SKODRAS et al., 2008).

Tabela 24. Parâmetros de ajuste dos modelos cinéticos para adsorção de DON, ZEN e OTA por casca de arroz.

Modelo cinético	Micotoxinas		
	DON	ZEN	OTA
<i>Pseudo-segunda ordem</i>			
q_2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1,20	0,72	0,087
k_2 ($\text{g} \cdot \mu\text{g min}^{-1}$)	0,010	0,076	0,000023
R^2	0,99	0,95	0,94
EMR (%)	4,58	0,74	5,99
<i>Elovich</i>			
a ($\mu\text{g} \cdot \text{g min}^{-1}$)	3,014	35,54	59,29
b ($\text{g } \mu\text{g}^{-1}$)	0,0096	6944614	0,0069
R^2	0,98	0,93	0,93
EMR (%)	6,39	1,09	4,78

Até o presente momento, somente o estudo desenvolvido por Sgaglioni e Badiale-Furlong (2016) descreve os parâmetros cinéticos referentes a aplicação da casca de arroz na adsorção de micotoxinas. Neste estudo os autores verificaram a adsorção de aflatoxinas B1 e M1 em leite, utilizando a casca de arroz como adsorvente, descrevendo um modelo de pseudo-primeira ordem, distinto ao verificado neste estudo. No entanto, deve-se considerar que o valor da constante de velocidade de adsorção depende de fatores como o meio reacional e composto a ser adsorvido e não apenas da natureza do bioadsorvente (LESMANA et al, 2009). Nestes casos, como foram utilizadas matrizes alimentícias com grande variação na composição química (leite e cerveja), o controle do meio reacional torna-se limitado, principalmente quanto a variações de pH, o qual é o fator principal quando deseja-se atingir o equilíbrio de adsorção máxima para outros tipos de solutos e matrizes.

Figura 21. Gráficos de ajuste do modelo cinético de pseudo-segunda ordem para DON (a), ZEN (b) e OTA (c) adsorvidas sobre a casca de arroz.



5.5.2 Aplicação da casca de arroz como um potencial adsorvente de micotoxinas durante o processo cervejeiro

Durante o processo cervejeiro os níveis de micotoxinas podem diminuir devido a vários fatores já citados anteriormente como a limpeza e classificação da matéria-prima, processos de maltagem, torrefação, maceração e por fim a fermentação, no entanto, tais contaminantes não são totalmente eliminados. Frente a este fato, tem-se como possibilidade a inclusão da casca de arroz como um potencial adsorvente destes compostos após o processo de fermentação da cerveja, visto que um processo de homogeneização do fermentado com a casca de arroz possibilitaria a adsorção destes compostos seguido da etapa de maturação e clarificação que já ocorre durante o processamento cervejeiro. Esta etapa de clarificação, através de um processo de filtração ou decantação, retiraria qualquer resíduo de casca de arroz que pudesse permanecer no fermentado. Durante o processo de homogeneização da cerveja com a casca ocorre a liberação do CO₂ formado durante o processo fermentativo, por isso o biossorvente deve ser incluído após o processo fermentativo e antes da nova etapa de maturação, com o objetivo de possibilitar a manutenção das características sensoriais do produto final.

Na inclusão da casca de arroz como adsorvente durante o processo cervejeiro deve-se ainda levar em consideração a condição microbiológica da casca de arroz; manutenção das características organolépticas do produto final visando a permanência do sabor e odor característico de cada cerveja.

Verificando-se a capacidade promissora da casca de arroz de adsorver micotoxinas em diferentes matrizes alimentícias sugere-se também a aplicação deste resíduo em métodos analíticos de preparo de amostra, como a MSPD, o qual utiliza normalmente adsorventes comerciais e com maior custo como suportes sólidos.

5.6 ESTUDO DA TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRA MSPD UTILIZANDO DIFERENTES SUPORTES SÓLIDOS

Os resultados obtidos para as recuperações dos tricotecenos, ZEN e OTA utilizando os quatro suportes sólidos testados comparados ao controle (sem o uso do suporte sólido) na técnica de extração MSPD estão descritos na Tabela 25.

A fortificação das amostras de grãos de cevada foi de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada tricoteceno e ZEN e $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de OTA correspondendo a valores que estão próximos ao LMT descrito pela legislação brasileira (ANVISA, 2017).

Os compostos adjacentes 15-ADON e 3-ADON, quando extraídos da matriz, apresentaram picos cromatográficos que co-eluíram, dificultando a quantificação isolada. Dessa forma, foi considerado um único pico para representar os ADONS em todos os estudos de extração. Este mesmo sistema de quantificação já foi utilizado por Krska et al., 2007 e Arraché et al., 2018.

As maiores recuperações das micotoxinas em estudo foram obtidas utilizando o suporte sólido C18, considerado como padrão nas técnicas de extração. Quando agentes lipofílicos, como C18, são utilizados em MSPD, além de atuarem como suportes sólidos abrasivos, agem também como solventes, aumentando a capacidade de extração (CAPRIOTTI et al., 2013). Além disso, este suporte sólido é constituído a base de sílica com fase ligada do tipo C18 e a casca de arroz tratada e o adsorvente sílico-celulósico foram os que apresentaram valores de recuperação mais próximos ao suporte sólido padrão C18, confirmando assim a capacidade abrasiva da sílica. A casca de arroz tratada e o adsorvente sílico-celulósico também apresentaram recuperações para algumas micotoxinas como DON, ADONS, ZEN e OTA com valores que se aproximaram da faixa entre 70 e 120%, valores estes aceitos quando se avalia contaminação em matrizes complexas (SANTE, 2016). Estes dados confirmam que o potencial abrasivo da casca de arroz está na sílica e na celulose presentes em sua composição, já que o adsorvente sílico-celulósico produzido apresentou resultados semelhantes a casca de arroz quando utilizada como suporte sólido para a recuperação das micotoxinas. A substituição do uso de C18 como suporte sólido por materiais obtidos de fontes renováveis torna-se uma grande vantagem na técnica MSPD, diminuindo ainda mais o custo da técnica e utilizando os recursos disponíveis de forma aplicada e diferenciada.

Assim, tendo em vista valores de recuperação promissores da utilização da casca de arroz tratada como suporte sólido na técnica MSPD e suas vantagens em relação à geração de resíduos, economia de reagentes de alto valor e produção do adsorvente sílico-celulósico, a casca de arroz tratada foi escolhida para realizar a avaliação da técnica MSPD.

Tabela 25. Recuperações dos tricotecenos, ZEN e OTA utilizando diferentes suportes sólidos na técnica MSPD.

Suporte sólido	Recuperações (%) (RSD %)					
	NIV	DON	ADONS	T2	ZEN	OTA
C18	72(12,5)	83(7,5)	81(4,5)	82(8,5)	82(3,8)	78(3,0)
Casca de arroz tratada	41(9,8) ^a	60(7,6) ^a	63(5,2) ^a	41(4,8) ^a	73(4,1) ^a	72(3,8) ^a
Sílico-celulósico	38(7,8) ^a	62(7,2) ^a	59(6,3) ^a	40(9,6) ^a	68(3,5) ^a	70(3,2) ^a
Areia	20(10,5)	33(8,8)	37(5,6)	35(6,3)	40(4,1)	42(3,5)
Sem suporte	24(8,3)	30(7,6)	29(7,2)	31(5,4)	40(5,2)	31(6,4)

RSD% = desvio padrão relativo. n = 3. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa entre os resultados para casca de arroz e o adsorvente sílico-celulósico ($p < 0,05$).

5.6.1 Padronização da técnica de extração MSPD utilizando casca de arroz tratada como suporte sólido

Visando um aumento da recuperação das concentrações das micotoxinas estudadas pela técnica de extração MSPD utilizando a casca de arroz como suporte sólido, o estudo do método foi direcionado às variações do tempo de maceração, do volume de solvente extrator e do tempo de agitação utilizados na técnica MSPD proposta por Rubert et al. (2011). Os valores de recuperação das micotoxinas obtidas no DCC 2³ estão apresentados na Tabela 26. A fortificação das amostras de cevada para esta avaliação foi de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada tricoteceno e ZEN e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de OTA.

Os resultados obtidos das recuperações de cada tricoteceno, ZEN e OTA foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), utilizando um intervalo de confiança de 95 %. A ANOVA foi utilizada para determinar a adequacidade do modelo gerado pelas variáveis significativas, ou seja, para descobrir os efeitos principais e as interações das variáveis independentes em relação à variável dependente (variável resposta) de acordo com a Tabela 27.

Tabela 26. Matriz do DCC 2³, com variáveis e níveis avaliados em função da recuperação (%) dos tricotecenos, ZEN e OTA utilizando a técnica MSPD com casca de arroz tratada.

Ensaio	Recuperações (%)								
	Tempo de Maceração (min) X1	Volume de solvente (mL) X2	Tempo de Agitação (min) X3	NIV	DON	ADONS	T2	ZEN	OTA
1	-1(1)	-1(5)	-1(1)	35,6	33,2	39,8	37,4	82,1	50,2
2	1(5)	-1(5)	-1(1)	61,3	65,2	68,3	62,6	49,4	33,3
3	-1(1)	1(15)	-1(1)	36,9	42,1	44,8	41,2	36,3	45,2
4	1(5)	1(15)	-1(1)	38,7	47,3	53,2	45,2	34,6	29,8
5	-1(1)	-1(5)	1(5)	30,3	41,3	36,1	36,0	44,1	61,9
6	1(5)	-1(5)	1(5)	28,1	33,7	30,5	28,2	41,3	29,5
7	-1(1)	1(15)	1(5)	73,7	78,2	80,5	85,6	77,3	79,3
8	1(5)	1(15)	1(5)	40,1	52,7	51,2	50,1	47,3	43,4
9	0(3)	0(10)	0(3)	36,9	56,1	60,2	41,8	73,7	78,5
10	0(3)	0(10)	0(3)	35,1	55,9	57,8	41,9	71,0	77,2
11	0(3)	0(10)	0(3)	35,2	54,8	59,7	41,8	74,1	76,7

*Fortificação para tricotecenos e ZEN: 100 µg kg⁻¹; **Fortificação para OTA: 10 µg kg⁻¹

Após a análise estatística dos efeitos das variáveis independentes em relação às variáveis respostas recuperação de NIV (%), DON (%), ADONS (%), T2 (%), ZEN (%) e OTA (%) separadamente, pode-se concluir que as variáveis apresentaram efeitos positivos e negativos para as recuperações de todas as micotoxinas. O tempo de maceração apresentou efeitos negativos para a recuperação de T2, ZEN e OTA e não apresentou efeitos para NIV, DON e ADONS, ou seja, um aumento no tempo de maceração ocasionou menor recuperação de T2, ZEN e OTA como observado nos ensaios 4 e 6. O volume de solvente apresentou efeitos positivos nos resultados das recuperações de todas as micotoxinas, com exceção de ZEN, o qual apresentou um efeito negativo, relativamente baixo, podendo ser observado nos ensaios 3 e 4.

Tabela 27. Efeitos, desvio padrão e coeficientes de regressão do DCC 2³ em relação as variáveis significativas para a recuperação de NIV, DON, ADONS, T2, ZEN e OTA utilizando a técnica MSPD com casca de arroz tratada.

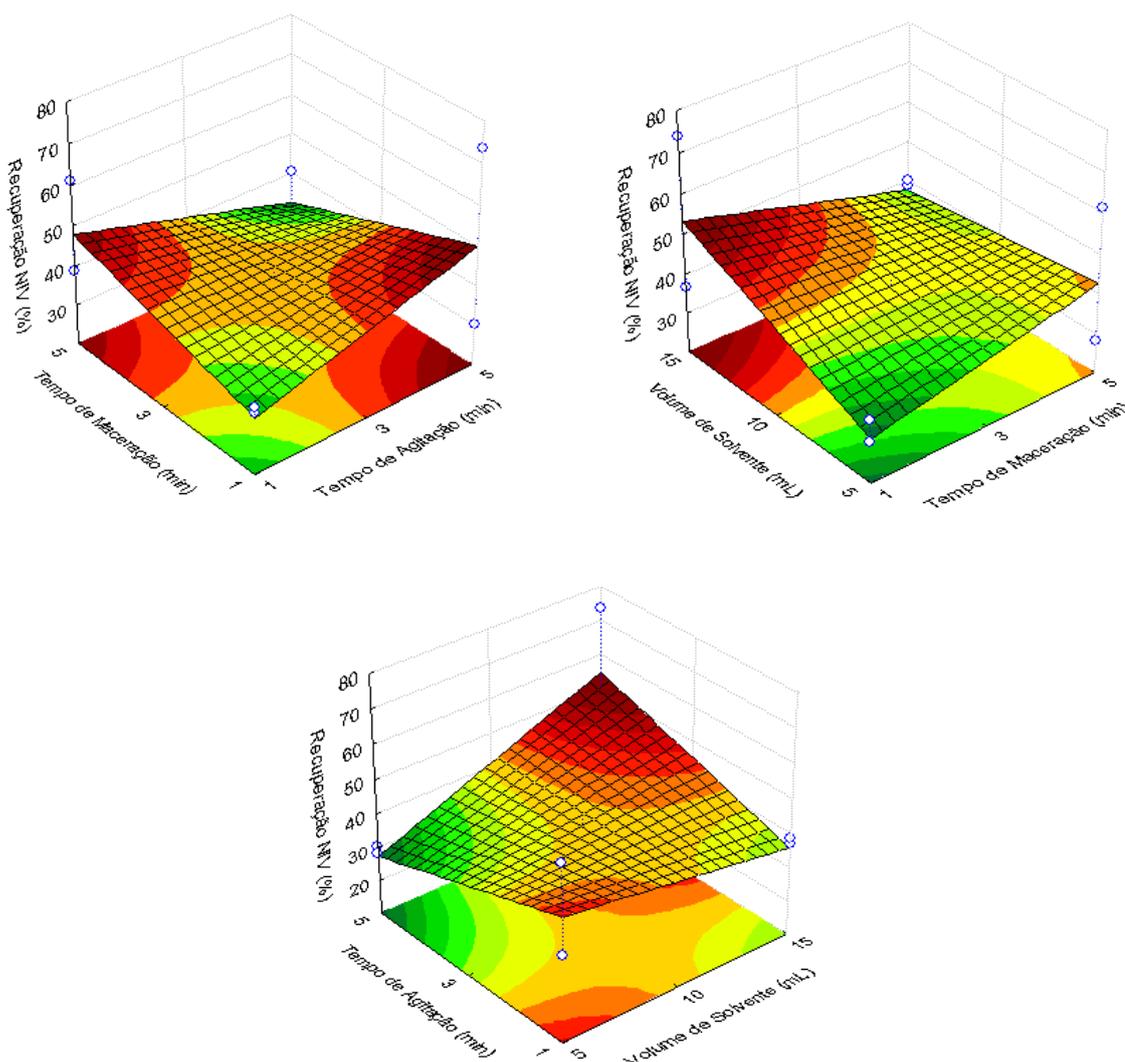
DCC 2 ³	Variáveis Significativas	Efeitos	Desvio Padrão	(p)*	Coeficientes de Regressão
Recuperação NIV	Mean	41,08	0,31	0,0000	41,08
	X2	8,53	0,72	0,0069	4,26
	X1 x X2	-13,83	0,72	0,0027	-6,91
	X1 x X3	-15,83	0,72	0,0020	-7,91
	X2 x X3	19,18	0,72	0,0014	9,59
Recuperação DON	Mean	50,95	0,21	0,0000	50,95
	X2	11,73	0,49	0,0018	5,86
	X3	4,53	0,49	0,0117	2,26
	X1 x X2	-11,18	0,49	0,0020	-5,59
	X1 x X3	-17,58	0,49	0,0008	-8,79
	X2 x X3	16,23	0,49	0,0009	8,11
Recuperação ADONS	Mean	59,92	0,38	0,0000	59,92
	X2	11,73	0,90	0,0042	6,88
	X1 x X2	-10,95	0,90	0,0066	-5,48
	X1 x X3	-17,95	0,90	0,0025	-8,98
	X2 x X3	18,8	0,90	0,0023	9,4
Recuperação T2	Mean	46,53	0,02	0,0000	46,53
	X1	-3,53	0,04	0,0001	-1,76
	X2	14,48	0,04	0,0000	7,24
	X3	3,38	0,04	0,0001	1,69
	X1 x X2	-12,23	0,04	0,0000	-6,11
	X1 x X3	-18,13	0,04	0,0000	-9,06
	X2 x X3	21,28	0,04	0,0000	10,64
Recuperação ZEN	Mean	57,38	0,51	0,0000	57,38
	X1	-16,8	1,19	0,0050	-8,4
	X2	-5,35	1,19	0,0463	-2,68
	X2 x X3	24,95	1,19	0,0023	12,48
Recuperação OTA	Mean	55,0	0,28	0,0000	55,0
	X1	-25,15	0,66	0,0007	-12,58
	X2	5,7	0,66	0,0130	2,85
	X3	13,9	0,66	0,0022	6,95
	X1 x X3	-9,0	0,66	0,0053	-4,5
	X2 x X3	9,95	0,66	0,0043	4,98

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

X1: tempo de maceração (min); X2: volume de solvente (mL); X3: tempo de agitação (min).

O tempo de agitação apresentou efeitos positivos para a recuperação de DON, T2 e OTA, ou seja, um aumento do tempo de agitação ocasionou um aumento de recuperação dessas micotoxinas. Com o objetivo de determinar se as equações de regressão, representativas do modelo, são estatisticamente significativas, foi realizado o teste F (Fischer) através da ANOVA para cada variável resposta. A recuperação de NIV apresentou um coeficiente de correlação (R) igual a 0,96, indicando que o modelo é considerado significativo. O valor do teste F calculado foi de 9,30, sendo maior que o valor de F tabelado (6,16), influenciada pela quantidade de volume de solvente e pelas interações de todas as variáveis. Assim, estes dados resultaram em um modelo preditivo e significativo, o qual pode ser representado pela Equação 15. A Figura 22 apresenta as superfícies de resposta geradas pelo modelo preditivo e significativo para NIV.

Figura 22. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para variável recuperação de NIV (%) na técnica MSPD.

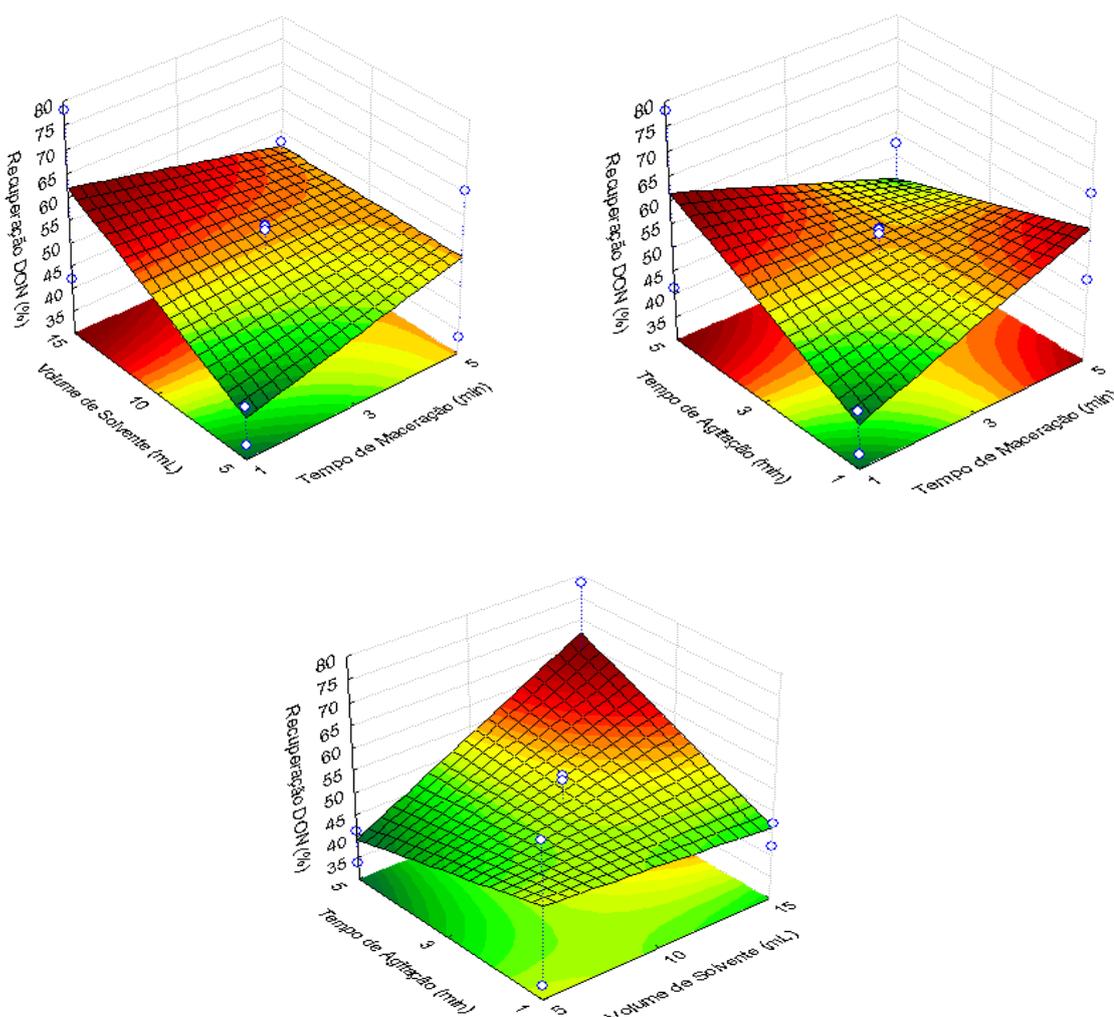


$$\text{Recuperação de NIV (\%)} = 41,08 + 4,26X_2 - 6,91X_1.X_2 - 7,91X_1.X_3 + 9,59X_2.X_3$$

Equação (15)

A recuperação de DON apresentou um coeficiente de correlação (R) igual a 0,97, o que também indicou que o modelo é considerado significativo. O valor do teste F calculado foi de 11,42, sendo maior que o valor de F tabelado (6,16), influenciada individualmente pela quantidade de volume de solvente e tempo de extração e pelas interações de todas as variáveis. Assim, estes dados resultaram em um modelo preditivo e significativo, o qual pode ser representado pela Equação 16. A Figura 23 apresenta as superfícies de resposta para a variável recuperação de DON (%).

Figura 23. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável resposta recuperação DON (%) na técnica MSPD.

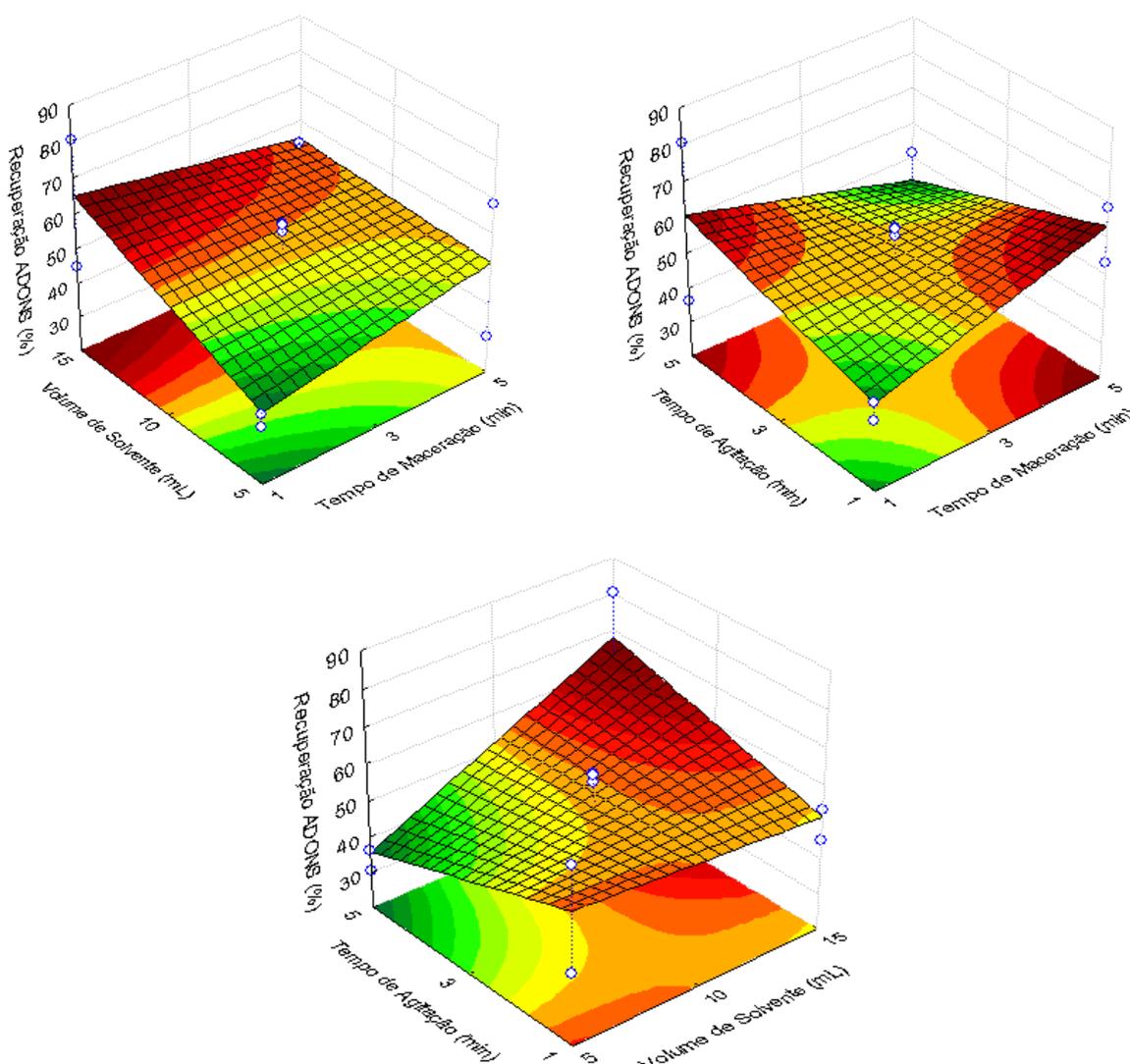


$$\text{Recuperação de DON (\%)} = 50,95 + 4,26X_2 + 2,26X_3 - 5,59X_1.X_2 - 8,79X_1.X_3 + 8,11X_2.X_3$$

Equação (16)

O coeficiente de correlação (R) para a recuperação de ADONS foi de 0,96, indicando que o modelo é considerado significativo. O valor do teste F calculado foi de 7,78, sendo maior que o valor de F tabelado (6,16), influenciada individualmente pela quantidade de volume de solvente e pelas interações de todas as variáveis. Estes dados resultaram em um modelo preditivo e significativo, o qual pode ser representado pela Equação 17. A Figura 24 apresenta um diagrama de superfície de resposta gerado pelo modelo preditivo e significativo em relação à recuperação de ADONS.

Figura 24. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável recuperação de ADONS (%) na técnica MSPD.

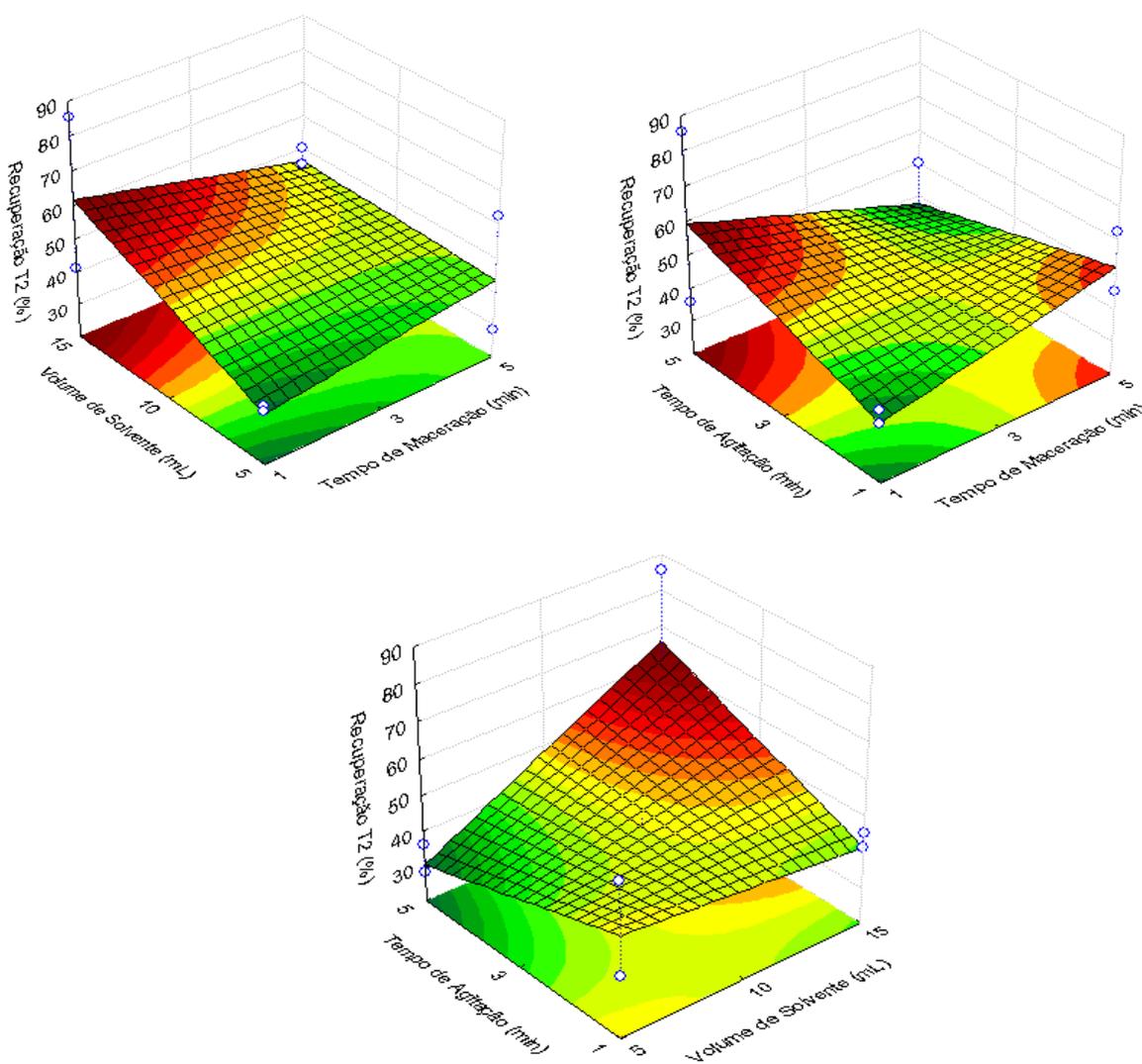


$$\text{Recuperação de ADONS (\%)} = 59,92 + 6,88X_2 - 5,48X_1.X_2 - 8,98X_1.X_3 + 9,40X_2.X_3$$

Equação (17)

A recuperação de T2 apresentou um coeficiente de correlação (R) igual a 0,98, o que também indicou que o modelo é considerado significativo. O valor do teste F calculado foi de 16,13, sendo maior que o valor de F tabelado (6,16), influenciada individualmente por todas as variáveis e suas interações. Assim, estes dados resultaram em um modelo preditivo e significativo, o qual pode ser representado pela Equação 18. A Figura 25 apresenta um diagrama de superfície de resposta gerado pelo modelo preditivo e significativo em relação à recuperação de T2.

Figura 25. Superfícies de resposta do modelo preditivo e significativo para a variável recuperação de T2 (%) na técnica MSPD.



$$\text{Recuperação de T2 (\%)} = 46,53 - 1,76X_1 + 7,24X_2 + 1,69X_3 - 6,11X_1.X_2 - 9,06X_1.X_3 + 10,64X_2.X_3$$

Equação (18)

As recuperações de ZEN e OTA, embora tenham apresentado efeitos para as variáveis independentes, geraram modelos que não foram preditivos e significativos, com valores de F calculado (ZEN = 0,88, OTA = 0,66) bem abaixo do valor tabelado (6,16). Dessa forma, foram considerados somente os modelos preditivos e significativos gerados para os tricotecenos. Assim, considerando os efeitos das variáveis significativas para a eficiência da extração dos tricotecenos optou-se por utilizar no método o tempo de maceração de 1 minuto com um volume de solvente de extração de 15 mL e com um tempo de agitação de 5 minutos no método modificado padronizado com o objetivo de aumentar o percentual das recuperações, conforme o ensaio 7.

O procedimento MSPD padronizado neste estudo apresentou as seguintes condições: 1 g de amostra de cevada em homogeneização com 1 g de suporte sólido casca de arroz (32 mesh) durante 1 minuto utilizando gral e pistilo. Em seguida, a adição de 15 mL da mistura de solventes (MeCN: MeOH; 1:1 v/v), agitação em vórtex por 5 min e centrifugação a 2800 xg durante 10 min. A separação de um volume de 10 mL do sobrenadante e evaporação até a secura em banho maria a 45 °C. Os valores obtidos para a recuperação e para o RSD através das determinações por MSPD padronizado em amostras de cevada estão demonstrados na Tabela 28. Pode-se observar que os resultados foram adequados para a determinação dos tricotecenos, ZEN e OTA em cevada, pois apresentaram valores de recuperação dentro da faixa de 60 – 120%.

Tabela 28. Resultados das recuperações para as micotoxinas em estudo utilizando o método MSPD padronizado com casca de arroz tratada.

Níveis de Contaminação $\mu g\ kg^{-1}$	Recuperações (%) (RSD%)					Níveis de Contaminação $\mu g\ kg^{-1}$	Recuperações (%) (RSD%)
	NIV	DON	ADONS	T2	ZEN		
50	67,9 (8,2)	78,5 (6,5)	77,7 (6,7)	73,4 (5,8)	73 (9,8)	5	82,4 (6,8)
100	74,2 (5,8)	80,2 (3,5)	79,3 (7,9)	77,6 (4,2)	76,8 (4,2)	10	78 (5,4)
200	72,6 (6,5)	81,3 (5,1)	80,3 (5,2)	81,4 (3,8)	75,1 (3,3)	20	80 (4,3)

RSD% = desvio padrão relativo. n = 3.

A validação da técnica MSPD utilizando a casca de arroz tratada como suporte sólido foi realizada. Os coeficientes de correlação linear (R) obtidos através de todas as curvas analíticas foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações dos órgãos reguladores SANTE (2016) e INMETRO (2016). A Tabela 29 apresenta os limites de detecção e quantificação, efeito matriz (%), exatidão através das recuperações (%) e precisão do método (% RSD) para os testes realizados para o estudo dos tricotecenos, ZEA e OTA em amostra de cevada malteada.

Tabela 29. Validação do método MSPD adaptado para uso com a casca de arroz tratada como suporte sólido: limite de detecção do método (LOD) e limite de quantificação do método (LOQ), efeito matriz (%), porcentagem de recuperação (média dos três níveis), precisão avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária (% RSD) em nível baixo ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) e em nível alto ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) para os tricotecenos e ZEN e nível baixo ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) e nível alto ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) para OTA.

Micotoxina	LOD _(m) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ _(m) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	EM ^a (%)	Rec (%)	Repetibilidade ^b		Precisão Intermediária ^c	
					(%)	(%)	(%)	(%)
					Nível baixo	Nível alto	Nível baixo	Nível alto
NIV	15,2	50	60,5	71,6	5,4	3,9	7,2	6,6
DON	13,8	45,5	7,5	80,3	5,5	5,2	7,9	7,5
ADONS	13,8	45,5	79,5	81,1	5,8	4,5	6,8	7,0
T2	13,8	45,5	3,5	85,8	6,3	5,9	6,6	5,8
ZEA	12,2	40,2	4,8	75,4	6,9	6,2	5,3	5,0
OTA	1,5	5	4,2	80,3	7,6	6,5	7,9	7,2

^a EM (%): (inclinação da curva preparada no extrato da matriz - inclinação da curva preparada no solvente / inclinação da curva preparada no solvente) x 100

^b Repetibilidade (número de replicatas: 10)

^c Precisão intermediária (dias diferentes: 5)

O efeito matriz apresentou enriquecimento de sinal para todas as micotoxinas em estudo. Estes efeitos foram considerados baixos para DON, toxina T2, ZEA e OTA, valores encontrados ficaram entre -20 e +20 %. Para NIV e ADONS estes efeitos foram altos, pois os valores ficaram acima de +50% (ECONOMOU, 2009). Dessa forma, para

compensar todos esses efeitos, foi realizada a calibração com o extrato branco da matriz correspondente para cada uma das micotoxinas.

A exatidão do método, através dos testes de recuperação, apresentou valores adequados para compostos traços, como as micotoxinas, dentro da faixa aceitável que é de 70 – 120% (SANTE, 2016).

5.6.2 Ocorrência de micotoxinas em cevada malteada

A validação possibilitou a aplicação em amostras de cevada malteada, adquiridas nos mercados do sul do Rio Grande do Sul (Brasil, RS) com o objetivo de verificar ou não a presença das micotoxinas. A Tabela 30 apresenta a ocorrência das micotoxinas em cevada malteada e pode-se observar que DON foi detectado em quatro das dez amostras de cevada analisadas e sua concentração variou de 75,5 a 180,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A ocorrência de ADONS também foi observada em quatro amostras, variando de 60,8 a 110,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e a ocorrência de NIV foi observada em três amostras em uma concentração que variou de 58,2 a 88,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Já a ocorrência de T2 foi observada em uma única amostra na concentração de 55,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. ZEN variou de 70,2 a 80,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em três amostras e a presença de OTA foi verificada em 2 amostras variando de 9,4 a 12,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estes dados indicam que a contaminação presente em duas amostras (1 e 3) pode ter ocorrido tanto no campo quanto no armazenamento, pois estão presentes as micotoxinas produzidas pelo *Fusarium* (tricotecenos e ZEN) e a OTA, uma micotoxina que pode ser produzida durante o armazenamento por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

No sul do Brasil, onde as amostras foram coletadas, as condições climáticas (temperatura e umidade alta) tendem a contribuir com a proliferação fúngica, principalmente do gênero *Fusarium* e, conseqüentemente, maximizar a produção de DON e demais tricotecenos. Em outro estudo que investigou DON em amostras de cevada malteada produzidas no Brasil, Piacentini et al., 2015 detectaram 9 amostras de um total de 50 contaminadas com DON na média de concentração de 340 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 30. Ocorrência de micotoxinas em cevada malteada aplicando a técnica MSPD com casca de arroz tratada como suporte sólido.

Amostras	NIV ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*	ADONS ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*	T2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*	ZEN ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*	OTA ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*
1	58,2 \pm 0,04	75,5 \pm 0,38	<LOQ	55,7 \pm 0,24	<LOQ	12,5 \pm 0,04
2	101,3 \pm 0,04	90,4 \pm 0,11	85,7 \pm 0,04	<LOQ	70,2 \pm 0,18	<LOQ
3	<LOQ	95,6 \pm 0,2	110,8 \pm 0,13	<LOQ	80,6 \pm 0,44	9,4 \pm 0,06
4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
5	<LOQ	<LOQ	60,8 \pm 0,04	<LOQ	<LOQ	<LOQ
6	88,9 \pm 0,22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
8	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
9	<LOQ	180,6 \pm 0,14	<LOQ	<LOQ	78,9 \pm 0,2	<LOQ
10	<LOQ	<LOQ	70,2 \pm 0,03	<LOQ	<LOQ	<LOQ

*Resultados expressos como média ($\mu\text{g kg}^{-1}$) \pm desvio padrão.

Entre as dez amostras analisadas de cevada malteada, pode-se verificar que a concentração de DON está abaixo dos limites toleráveis da legislação brasileira, limite máximo tolerável de $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ para cevada malteada, segundo a ANVISA (2017). Para os outros tricotecenos não há descrição dos LMT na legislação brasileira permitidos para a cevada malteada. Entre as três amostras que apresentaram contaminação de ZEN, todas ficaram abaixo do limite máximo permitido que é de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Já para a OTA existe legislação vigente no Brasil e esta apresenta como limite máximo tolerável em cevada malteada de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. De acordo com a Tabela 30, as duas amostras de cevada malteada onde os níveis de OTA foram quantificados ainda estão abaixo do limite máximo. No entanto, de acordo com os regulamentos da Comissão Europeia (CE, 2006), estas amostras estão acima do nível máximo de OTA em cereais crus sendo, pela legislação em vigor, $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, não podendo ser exportadas ou consumidas em países europeus regidos pela CE. A co-ocorrência de micotoxinas foi verificada em quatro amostras, ou seja, quatro amostras apresentaram níveis quantificáveis de NIV, DON, ADONS, T2, ZEA e OTA. Três amostras estavam isentas de qualquer uma das micotoxinas em estudo.

O estudo atual, apesar de apresentar níveis de micotoxinas na cevada malteada abaixo dos limites da legislação, é importante pois evidencia que estes níveis podem ser difundidos da matéria-prima para o produto final no caso da produção cervejeira. Estudos que relacionam a ocorrência de micotoxinas na cevada e na cerveja tornam-se importante devido ao fato de que o consumo de cerveja e a produção da bebida, principalmente por microcervejeiros, cresce ano após ano. A cevada utilizada para a produção de cerveja deve ser armazenada adequadamente e também monitorada durante as etapas entre o cultivo e a indústria, pois a qualidade da matéria-prima é um parâmetro importante que deve ser avaliado pela indústria como a garantia de consumo de um alimento seguro.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo conseguiu avaliar o emprego da casca de arroz tratada como suporte sólido de um grupo de tricotecenos, zearalenona e ocratoxina A na técnica de extração MSPD em amostras da matéria-prima cevada e, de maneira inovadora, como adsorvente na redução dos níveis de DON, ZEN e OTA do produto final cerveja.

Um método analítico para determinação e separação dos tricotecenos A e B, ZEN e OTA em HPLC-UV/FL foi validado e conseguiu-se padronizar a técnica QuEChERS de preparo de amostra e aplicá-la em um estudo de ocorrência dessas micotoxinas em 85 amostras de cerveja tipo lager das principais marcas consumidas no Brasil. Entre as amostras, 74 apresentaram níveis quantificáveis de micotoxinas, possivelmente devido à adição de cevada contaminada e outros adjuntos passíveis de contaminação.

Desde a validação do método e sua aplicabilidade a amostras de cerveja comercializadas na região sul, foi possível também avaliar a ingestão diária (ID) tolerável, onde verificou-se que as IDs estimadas foram inferiores à ID tolerável máxima provisória de 1 μg / kg de peso corporal / dia para DON. No entanto, os resultados do estudo de ocorrência indicaram a necessidade de estratégias para reduzir a contaminação por micotoxinas na matéria-prima utilizada na fabricação de cervejas, sendo que níveis máximos destes contaminantes na cerveja do Brasil e de outros países precisam ser estabelecidos pelas agências reguladoras.

A caracterização da cinética de adsorção de DON, ZEN e OTA sobre a casca de arroz tratada em amostras de cerveja foi realizada e ficou demonstrado que este estudo segue um modelo de pseudo-segunda ordem. As quantidades de DON, ZEN e OTA adsorvidas no equilíbrio (q_e) pela casca de arroz tratada foram de 0,8800 $\mu\text{g g}^{-1}$, 0,7083 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,0855 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, concluindo-se que um tempo de homogeneização de 420 minutos (7 horas) a 100 rpm entre 10 mL de cerveja contaminada e 0,5 g de casca de arroz pode diminuir quase a metade da concentração de DON, praticamente 100% da concentração de ZEN e em torno de 90% da concentração de OTA presentes na bebida.

A técnica MSPD foi avaliada utilizando a casca de arroz tratada, sendo que as etapas padronizadas foram o tempo de maceração, volume de solvente e tempo de extração. Com este estudo também pode-se comprovar que a maior parte do potencial

abrasivo da casca de arroz está na sílica e na celulose presentes em sua composição, já que o adsorvente sílico-celulósico produzido a partir da casca de arroz apresentou resultados semelhantes a casca de arroz para a recuperação das micotoxinas. A avaliação da amostra de cevada malteada possibilitou a verificação da contaminação por micotoxinas em sete das dez amostras analisadas e a co-ocorrência foi observada em quatro amostras. Somente três amostras analisadas de cevada malteada estavam isentas de qualquer quantidade de micotoxinas.

Finalmente, a potencial utilização da casca de arroz tratada como adsorvente de micotoxinas após a etapa de fermentação do processo cervejeiro, visando a redução dos níveis de DON, ZEN e OTA no produto final ficou demonstrada através de todas as determinações obtidas neste trabalho.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Este estudo abre caminho para o desenvolvimento de outras investigações sobre o assunto e, para dar continuidade a esse trabalho, propõe-se:

- Estudar o emprego da casca de arroz tratada como adsorvente de micotoxinas na etapa de fermentação alcoólica ou como aditivo no processamento cervejeiro;
- Avaliar as características físicas, químicas e sensoriais da cerveja após a aplicação da casca de arroz tratada como adsorvente;
- Avaliar o emprego do bagaço de malte como adsorvente no processo cervejeiro;
- Avaliar o potencial de adsorção da casca de arroz no tratamento de resíduos e efluentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMOYERO, A.A., DALVI, R.R. Efficacy of activated charcoal and other agents in the reduction of hepatotoxic effects of a single dose of aflatoxin B1 in chickens. **Toxicology Letters**, v. 16, p. 153–157, 1983.

ALBERTS, J. F.; LILLY, M.; RHEEDER, J. P.; BURGER, H. M.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLOM, W. C. A. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. **Food Control**, v. 73, p. 101-109, 2017.

ALEXANDER, N.J., PROCTOR, R.H., MCCORMICK, S.P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. **Toxin Reviews**, v. 28, p. 198-215, 2009.

ALLAMEH, A., SAFAMEHR, A., MIRHADI, S.A., SHIVAZAD, M., RAZZAGHI-ABYANEH, M., AFSHAR-NADERI, A. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. **Animal Feed Science Technology**, v.122, p. 289–301, 2005.

ALMEIDA, F. S.; SILVA, C. A. A.; LIMA, S. M. L.; SUAREZA, Y. R.; ANDRADE, L. H. C. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. **Food Chemistry**, n. 263, p. 112–118, 2018.

ALMEIDA, M. I.; ALMEIDA, N. G.; CARVALHO, K. L.; GONÇALVES, G. A. A.; SILVA, C. N.; SANTOS, E. A.; GARCIA, J. C.; VARGAS, E. A. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, p. 694–703, 2012.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of Association Official Analytical Chemistry International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ARAÚJO, T. M. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de dornas de fermentação de cachaça para produção de cervejas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2013.

ARESTA, A.; VATINNO, R.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Determination of ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, p. 196-201, 2006.

ARIAS, J. L.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66-75, 2014.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. INTERNATIONAL: **Official Methods of Analysis of International**. 17 th, 2000, CD-ROM.

AVANTAGGIATO, G., HAVENAAR, R., VISCONTI, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 817–824, 2004.

BALZER, A., TARDIEU, D., BAILLY, J.D., GUERRE, P. The trichothecenes: the nature of toxins, natural occurrence in foods and feeds and ways of combating their occurrence. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 155, p. 299–314, 2004.

BAMFORTH, C.W. 2003. Barley and malt starch in brewing: a general review. **Technical Quaterly-Master Brewers Association of the Americas**, v. 40, p. 89-97, 2003.

BARISIC, K; PETRIK, J.; RUMORA, L.; CEPELAK, I.; GRUBISIC, T.Z., Expression of Hsp 70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. **Archives of toxicology**, v. 76, p. 218-226, 2002.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 151-162, 2007.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n.2, p. 353-361, 1989.

BATATINHA, M. J. M.; SIMAS, M. M. S.; BOTURA, M. B.; BITENCOURT, T. C.; REIS, T.A.; CORREA, B. Fumonisin in brewers grain (barley) used as dairy cattle feed in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, v.18, p. 608-612, 2007.

BAUER, J.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. **Food Control**, v. 63, p. 135-139, 2016.

BAXTER, E.D.; SLAIDING, I. R.; KELLY, B. Behavior ochratoxin A in brewing. **American Society of Brewing Chemists**, v. 59, p. 98-100, 2001.

BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., ČÁSLAVSKÝ, J., SVOBODA, Z., & MIKULÍKOVÁ, R. The occurrence of the selected Fusarium mycotoxins in Czech malting barley. **Food Control**, v. 37, p. 93–98, 2014.

BELAKOVA, S.; BENESOVA, K.; MIKULIKOVA, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, p. 321 – 325, 2011.

BEMVENUTI, R. H.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E.; DORS, G. C.; FAGUNDES, C. A. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e hplc/uv-fl. **Química Nova**, v XY, nº 0, p. 1-6, 2012.

BENESOVA, K.; BELAKOVA, S.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Control**, v. 25, p. 626-630, 2012.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v.73, p.270-275, 1990.

BERSOT, L. S.; MAZIERO, M. T. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 89-99, 2010.

BEVILAQUA, D. B. Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química)**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

BIN-UMER, M.A., MCLAUGHLIN, J.E., BASU, D., MCCORMICK, S., TUMER, N.E. Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation-implication for the mechanism of toxicity. **Toxins**, v. 3, p. 1484–1501, 2011.

BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y. Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 970, n. 1-2, p. 201-212, 2002.

BOHATCH, A. **Cerveja: fabricação em pequena escala**. Curitiba, p.74, 1994.

BOHM-SCHRAML, M.; STETTNER, G.; GEIGER, E. Studies into the influence of yeast on *Fusarium*-toxins in wort. **Cereal Research Communications**, v.25, p. 729 – 730, 1997.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. Microbiology and molecular biology reviews. **American society for microbiology**, v. 77, p. 157-172, 2013.

BOLECHOVA, M.; BENESOVA, K.; BELAKOVA, S.; CASLAVSKÝ, J.; POSPÍHALOVA, M.; MIKULÍKOV, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **Food Control**, v. 47, p.108-113, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução - RDC nº 138, de 8 de Fevereiro de 2017. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 fevereiro 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em abril, 2019.

BRATICH, P.M., BUCK, W.B., HASCHEK, W.M. Prevention of T-2 toxin-induced morphologic effects in the rat by highly activated charcoal. **Archives of Toxicology**, v. 64, p. 251–253, 1990.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Brewing science and practice. Flórida: CRC Press **LLC and Woodhead Publishing Limited**, p. 863, 2004.

BRIGGS, D.E. **Barley**. Chapman & Hall, p. 1-38, 1978.

BRIONES-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.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 20, p. 134-158, 2012.

BRYDEN, W.L. Mycotoxins and mycotoxicoses: significance, occurrence and mitigation in the food chain. **General and Applied Toxicology**. Third ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, p. 3529–3553, 2009.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, p. 95-101, 2007.

CALDAS, S.S.; MARIAN BOLZAN, C.; JAIME DE MENEZES, E.; LAURA VENQUEARUTI ESCARRONE, A.; DE MARTINEZ GASPAR MARTINS, C.; BIANCHINI, A.; GILBERTO PRIMEL, E. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fishliver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 2013b.

CAMPAGNOLLO, F. B., FRANCO, L. T., ROTTINGHAUS, G. E., KOBASHIGAWA, E., LEDOUX, D. R., DAKOVIĆ, A., & OLIVEIRA, C. A. F. In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. **Food Research International**, v. 77, p. 643–648, 2015.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; LAGANÁ, A.; PIOVESAN, S.; SAMPERI, R. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.43, p. 53-66, 2013.

CARRASCO, Y. R.; FATTORE, M.; ALBRIZIO, S.; BERRADA, H.; MAÑES, J. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. **Food Chemistry**, v. 178, p. 149-155, 2015.

CARVALHO, A. P. M. G.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Use of rice husk as an adsorbent for performing MSPD technique for determining the aflatoxins occurrence in onion. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.**, v. 71, p. 630-637, 2012.

CASTELLS, M., MARÍN, S., SANCHIS, V., RAMOS, A.J. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, p. 150–157, 2005.

CERAIN, A.L.; JIMÉNEZ, A.M.; EZPELETA, O.; BELLO, J. Efectos tóxicos de La ocratoxina A. **Reviews in Toxicology**, v. 17, p. 61-69, 2000.

CERQUEIRA, M. B.; CALDAS, S. S. PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 10-22, 2014.

CHANDRASEKHAR, S. A. T. H. Y.; SATYANARAYANA, K. G.; PRAMADA, P. N.; RAGHAVAN, P.; GUPTA, T. N. Review processing, properties and applications of reactive silica from rice husk—an overview. **Journal of materials science**, v. 38, p. 3159-3168, 2003.

CHELI, F., PINOTTI, L., ROSSI, L., DELL'ORTO, V. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: a review. **Food Science and Technology International**, v. 54, p. 307–314, 2013.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191-219, 2008.

CHANDRASEKHAR, S.; SATYANARAYANA, K.G.; PRAMADA, P.N.; RAGHAVAN, P.; GUPTA, T.N. Processing, properties and applications of reactive silica from rice husk – an overview. **Journal of Materials Science**, v. 38, p. 3159–3168, 2003.

CHUAH, T. G.; JUMASIAH, A.; AZNI, I.; KATAYON, S.; CHOONG, S. Y. T. Rice husk as a potentially low-cost biosorbent for heavy metal and dye removal: an overview. **Desalination**, v. 175, p. 305-316, 2005.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p. S5-S9, 2006.

COSTA, E. P.; SANTANA, S. A. A.; SILVA, H. A. S.; BEZERRA, C. W.; SCHULTZ, M. S. Uso da casca de arroz como adsorvente na remoção do corante têxtil vermelho remazol 5R. **Caderno de Pesquisa**, v.16, p.44-50, 2009.

COVARELLI, L.; BECCARI, G.; MARINI, A.; TOSI, L. A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. **Food Control**, v. 26, p. 347–356, 2012.

CRINI, G.; BADOT, P.M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 399-447, 2008.

CUNHA, S.C., SÁ, S., FERNANDES, JOSÉ, O. Multiple mycotoxin analysis in nut products: occurrence and risk characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v.114, p. 260-269, 2018.

DALVI, R.R., MCGOWAN, C. Experimental induction of chronic aflatoxicosis in chickens by purified aflatoxin B1 and its reversal by activated charcoal, phenobarbital, and reduced glutathione. **Poultry Science**, v. 63, p. 485–491, 1984.

DE SOUZA, T. D.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E. Exposure to deoxynivalenol, Ht-2 and T-2 toxins by consumption of wheat-based product in southern Brazil. **Food Control**, v. 50, p. 789-793, 2015.

DEGRAEVE, S.; MADEGE, R. R.; AUDENAERT, K.; KAMALA, A.; ORTIZ, J.; KIMANYA, M.; TIISEKWA, B.; DE MEULENAER, B.; HAESAERT, G. Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of *Fusarium* species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania. **Food Control**, v. 59, p. 225-233, 2016.

DELREGNO, M.; ADESSO, S.; POPOLO, A.; QUARONI, A.; AUTORE, G.; SEVERINO, L.; MARZOCCO, S. Nivalenol induces oxidative stress and increases deoxynivalenol pro-oxidant effect in intestinal epithelial cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 285, n. 2, p. 118-127, 2015.

DEMIRBAS, A. Agricultural based activated carbons for the removal of dyes from aqueous solutions: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 1-3, 2009.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology*. **APS Press**, St. Paul. p. 1-260, 2006.

DEVEGOWDA, G., RAJU, M.V.L.N., AFZALI, N., SWAMY, H.V.L.N. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. In: Lyons, T.P., Jacques, K.A. (Eds.), **Biotechnology in the Feed Industry**. Proceedings of the 14th Annual Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 241–255, 1998.

DEYU, H., LUQING, C., XIANGLIAN, L., PU, G., QIRONG, L., XU, W., ZONGHUI, Y. Protective mechanisms involving enhanced mitochondrial functions and mitophagy against T-2 toxin-induced toxicities in GH3 cells. **Toxicology Letters** v. 295, p. 41–53, 2018.

DÖLL, S.; SCHRICKX, J. A.; DÄNICKE, S.; FINK-GREMMELS, J. Deoxynivalenol-induced cytotoxicity, cytokines and related genes in unstimulated or lipopolysaccharide stimulated primary porcine macrophages. **Toxicology Letters**, v.184, 97–106, 2009.

DOMENICO, A. S. D.; BUSO, C.; HASHIMOTO, E. H.; FRATA, M. T.; CHRIST, D.; COELHO, S. R. M. Occurrence of *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., and aflatoxins in corn hybrids with different systems of storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, p. 111-121, 2016.

DONG, F.; QIU, J.; XU, J.; YU, M.; WANG, S.; SUN, Y.; G. ZHANG, SHI, J. Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu province, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 230, p. 58-63, 2016.

DORS, G. C.; BIERHALS, V. S.; BADIALE-FURLONG, E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. **Food Science and Technology**, v. 31, p. 172-177, 2011.

EBLINGER, H.; NARZIB, L. Beer. In: **Encyclopedia of Industry Chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012.

EC - EUROPA, COMMISSION REGULATION N° 401. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p. 12 – 34, 2006.

EC - EUROPA, COMMISSION REGULATION N° 1881. **Official Journal of the European Union**, v. 364, p. 5 – 24, 2006.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multiclass pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

ELFVERSON, C.; ANDERSSON, A.A.M.; ÅMAN, P.; REGNÉR, S. Chemical composition of barley cultivars fractionated by weighing, pneumatic classification, sieving, and sorting on a specific gravity table. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 434-438. 1999.

EL-HOSHY, S. M. Occurrence of zearalenone in milk, meat and their products with emphasis on influence of heat treatments on its level. **Archiv fur Lebensmittelhygiene**, v. 50, p. 140-143, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cevada BR-2. **Embrapa portal de pesquisa agropecuária**, 2012. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/pesquisa/tecnologia/cevada2.htm>> Acesso em: 20 de março 2019.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Indicações técnicas sobre a produção de cevada cervejeira nas safras 2017 e 2018. **Embrapa portal de pesquisa agropecuária**, 2018. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/trigo/cultivos/cevada>> Acesso em: 5 de março 2019.

ERDEM, E.; ÇÖLGEÇEN, G.; DONAT, R. The removal of textile dyes by diatomite earth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 282, p. 314-319, 2005.

ERIKSEN, G.S.; ALEXANDER, J. Fusarium Toxins in Cereals – A Risk Assessment, **Tema Nord 502**. Copenhagen: Nordic Council of Ministers, 1998.

EUROMONITOR - Provedora global de inteligência estratégica de mercado. Disponível em: <http://www.euromonitor.com/> Acesso em julho, 2018.

EUROPEAN COMMISSION REGULATION (EC) 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, L50, p. 8–12, 2010.

EYNI-NARGESEH, H., DEIHIMFARD, R., SOUFIZADEH, S., HAGHIGHAT, M., & NOURI, O. Predicting the impacts of climate change on irrigated wheat yield in Fars province using APSIM model. **Electronic Journal of Crop Production**, v. 8, p. 203–224, 2016.

FAZELI, M. R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H.; KHOSHAYAND, M. R.; VAGHARI, E.; POURAGAH, S. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v.72, n.1, p.189-192, 2009.

FATIMA, Z., GUO, P., HUANG, D., LU, Q., WU, Q., DAI, M., CHEN, G., PENG, D., TAO, Y., AYUB, M., UL QAMAR, M.T., ALI, M.W., WANG, X., YUAN, Z. The critical role of p16/Rb pathway in the inhibition of GH3 cell cycle induced by T-2 toxin. **Toxicology**, v. 400, p. 28–39, 2018.

FELTRIN, A. C. P.; GARCIA, S. D. O.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Characterization and application of the enzyme peroxidase to the degradation of the mycotoxin DON. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 10, p. 777-783, 2017.

FERNANDES, P. J.; BARROS, N.; SANTO, J. L.; CÂMARA, J. S. High-throughput analytical strategy based on modified QuEChERS extraction and dispersive solid-phase extraction clean-up followed by liquid chromatography-triple- quadrupole tandem mass spectrometry for quantification of multiclass mycotoxins in cereals, **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 841-856, 2015.

FERREIRA, I.; FERNANDES, J.O.; CUNHA, S.C. Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography e mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. **Food Control**, v. 27 p. 188-193, 2012.

FIGUEIRÊDO, A. F. R. **Seleção de leveduras e produção de cerveja artesanal suplementada com selênio**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2017.

FIGUEIREDO, B. I. C. **Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial para produção de cervejas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2016.

- FIGUEIREDO, S. A.; BOAVENTURA, R. A.; LOUREIRO, J. M. Color removal with natural adsorbents: modeling, simulation and experimental. **Separation and Purification Technology**, v. 20, p.129-141, 2000.
- FOLETO, E.L.; HOFFMANN R.; PORTUGAL JR. U.L.; JAHN S.L. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. **Quimica Nova**, v. 28, p. 1190-1198, 2005.
- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Utilization of rice husk ash as novel adsorbent: Ajudicious recycling of the colloidal agricultural waste. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 152, p. 39-47, 2009.
- FORNSTEDT, T.; FORSSÉN, P.; WESTERLUND, D. Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. **Analytical Separation Science**, 2015.
- FORONUD, N. A.; EUDES, F. Trichothecenes in cereal grains. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 1, p. 147-173, 2009.
- FOX, G.P. Chemical composition in barley grains and malt quality. In: Zhang, G., Li, C. (Ed.), **Genetics and Improvement of Barley Malt Quality**, p. 63-98, 2010.
- FRICKE, R.F., JORGE, J. Assessment of efficacy of activated charcoal for treatment of acute T-2 toxin poisoning. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 28, p. 421-431, 1990.
- FU, L. *et al.* Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 285-289, 2009.
- GALEY, F.D., LAMBERT, R.J., BUSSE, M., BUCK, W.B. Therapeutic efficacy of superactive charcoal in rats exposed to oral lethal doses of T-2 toxin. **Toxicol**, v. 25, p. 493-499, 1987.
- GAO, H. P.; YOSHIZAWA, T. Further study on *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat from a high-risk area for human esophageal cancer in China. **Mycotoxins**, v. 45, p. 51-55, 1997.
- GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, p. 1819-1831, 2018.
- GARCIA-LOPEZ, M. CANOSA, P.; RODRIGUEZ, I. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 3, p. 963-74, 2008.
- GARDA, J.; MACEDO, R. M.; FARIA, R.; BERND, L.; DORS, G.C.; BADIALL-FURLONG, E. Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v. 16, p. 423-428, 2005.

- GARDA-BUFFON, J.; MACEDO, R. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n. 4, p.657-663, 2004.
- GAUMY, J. L.; BAILLY, J. D.; BURGAT, V.; GUERRE, P. Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.152, p. 219-234, 2001.
- GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 1998-2008, 2017.
- GIL-SERNA, J., MATEO, E. M., GONZÁLEZ-JAÉN, M. T., JIMÉNEZ, M., VÁZQUEZ, C., & PATIÑO, B. Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: An integrated approach. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, p.372–380, 2013.
- GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Divulgação Técnica do Instituto Biológico**, Centro de Sanidade Animal, São Paulo, v.63, n1/2, p.15-19, 2001.
- GONZALES-MARINO, I.; RODRIGUEZ, I.; QUINTANA, J. B.; CELA, R.; Matrix solid phase dispersion followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of triclosan and methyl triclosan in sludge and sediments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 2289-2297, 2010.
- GUILARDUCI, V. V. S.; MESQUITA, J. P.; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, H. F. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Química Nova**, v.29, p.1226-1232, 2006.
- GUNDOGDU, A.; OZDES, D.; DURAN, C.; BULUT, V. N.; SOYLAK, M.; SENTURK, H. B. Biosorption of Pb (II) ions from aqueous solution by pine bark (*Pinus brutia* Ten.), **Chemical Engineering Journal**, v. 153, p. 62-69, 2009.
- HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; SCAGLIONI, P. T.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Método quechers para determinação de ocratoxina a e citrinina em arroz e farelo de arroz. **Química Nova**, v. 35, p. 1733-1737, 2012.
- HASSAN, Y.I., HE, J.W., PERILLA, N., TANG, K., KARLOVSKY, P., ZHOU, T. The enzymatic epimerization of deoxynivalenol by *Devosia* mutans proceeds through the formation of 3-keto-DON intermediate. **Science Rep. 7 Article number: 6929**, 2017.
- HATCH, R.C.; CLARK, J.D.; JAIN, A.V.; WEISS, R. Induced acute aflatoxicosis in goats: treatment with activated charcoal or dual combinations of oxytetracycline, stanozolol, and activated charcoal. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 644–648, 1982.

HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; BOLAND, G. J.; SCOTT, T. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 21, p.67-76, 2010.

HEINL, S.; HARTINGER, D.; THAMHESL, M.; VEKIRU, E.; KRŠKA, R.; SCHATZMAYR, G.; MOLL, W-D.; GRABHERR, R. Degradation of fumonisin B₁ by the consecutive action of two bacterial enzymes. **Journal of biotechnology**, v. 145, p. 120-129, 2010.

HERNÁNDEZ, M.J., VALME GARCÍA-MORENO, M., DURÁN, E., GUILLÉN, D., BARROSO, C.G. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, p. 117–121, 2006.

HEWITT, M.A.; GIRGIS, G.N.; BRASH, M., SMITH, T.K. Effects of feed-borne Fusarium mycotoxins on performance, serum chemistry, and intestinal histology of New Zealand White fryer rabbits. **Journal of Animal Science**, v.90, p.4833-4838, 2012.

HOSENEY, R.C. **Principles of Cereal Chemistry and Technology**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal chemists, Inc. v. 2, 1994.

HOUGH, J. S. **Biología de la cerveza y de la malta**. Zaragoza: Acribia, p. 9-20, 1990.

HOUSE, J.D., NYACHOTI, C.M., ABRAMSON, D. Deoxynivalenol removal from barley intended as swine feed through the use of an abrasive pearling procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5172–5175, 2003.

HUGHES, P. Beer Flavor. In. BAMFORTH, C.W., (Ed.). **Beer: A Quality Perspective San Diego: Academic Press**, 2009.

HUMPF, H.-U., VOSS, K.A. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 255–269, 2004.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; K"APPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179–188, 2001.

IARC - 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, v. 56, p. 397 - 444, 1993.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC–MS. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1428-1434, 2011.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E. GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A. L. Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 81-88, 2012.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ – CGCRE – 008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasília, p. 1 – 31, 2016.

INOUE, T., NAGATOMI, Y., UYAMA, A., & MOCHIZUKI, N. Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, p.1410–1415, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, v.1, 2ª edição, São Paulo, 1976.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Sixth International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Prtoria, Republic of South Africa. **Pure and Applied Chemistry**, v.58, n. 2, 1986.

JACKSON, L.S., BULLERMAN, L.B. Effect of processing on *Fusarium* mycotoxins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 459, p. 243–261, 1999.

JALILI, M.; JINAP, S. Role of sodium hydrosulphite and pressure on the reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black pepper. **Food Control**, n.27, p.11-15, 2012.

JALILI, M.; JINAP, S.; NORANIZAN, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. **Food Control**, v. 21, p. 1388-1393, 2010.

JECFA (2000). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Deoxynivalenol, HT-2 and T-2 toxin.WHO/FAO. **Food and Nutrition**, v. 74, p. 419 – 680.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v.37, p. 93-99, 2012.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 342–362, 2007.

JOUANY, J.; YIANNIKOURIS, A.; BERTIN, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. **Archiva Zootechnica**, p. 26–50, 2005.

JUAN, C.; BERRADA, H.; MAÑES, J.; OUESLATI, S. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. **Food and Chemical Toxicology**, v.103, p. 148-156, 2017.

KABAK, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 549–554, 2009.

KABAK, B.; DOBSON, A.D.W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593–619, 2006.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess desing and optimization. **Process Biochemistry**, v.35, p. 539-550, 2000.

KARLOVSKY, P. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 491–504, 2011.

KERKADI, A., BARRIAULT, C., TUCHWEBER, B., FROHLICH, A.A., MARQUARDT, R.R., BOUCHARDAND, G., YOUSEF, I.M. Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 3, p. 231–250, 1998.

KHAYOON, W. S.; SAAD, B.; SALLEH, B.; ISMAIL, N. A.; MANAF, N. H. A.; LATIFF, A. A. A reversed phase high performance liquid chromatography method for the determination of fumonisins B1 and B2 in food and feed using monolithic column and positive confirmation by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 679, p. 91–97, 2010.

KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S., FUJIMURA, M. Molecular and genetic studies of *Fusarium trichothecene* biosynthesis pathways, genes, and evolution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 2105-2123, 2007.

KIRINČIČ, S.; ŠKRJANC, B.; KOS, N.; KOZOLC, B.; PIRNAT, N.; TAVČAR-KALCHER, G. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia e Official control of foods in the years 2008 and 2012. **Food Control**, v. 50, p. 157-165, 2015.

KOEL, M. Do we need Green Analytical Chemistry? **Green Chemistry**, v.18, p. 923–931, 2016.

KOLF-CLAUW, M.; CATELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology in vitro**, v. 23, p. 1580-1584, 2009.

KOSTELANSKA, M., ZACHARIASOVA, M., LACINA, O., FENCLOVA, M., KOLLOS, A. L., & HAJŠLOVA, J. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1870–1876, 2011.

KRAMER, G. V. **Recuperação de CO₂ e microcervejaria**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

- KRISHNANI, K. K.; MENG, X.; CHRISTODOULATOS, C. BODDU, V. M. Biosorption mechanism of nine different heavy metals onto biomatrix from rice husk. **Journal of Hazardous Materials**, v.153, p.1222-1234, 2008.
- KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH P.; JOSEPHS, R. D.; EMTEBORG, H.; BUTTINGER, G.; PETTERSSON, H.; VAN EGMOND H. P.; SCHOTHORST, R. C.; MACDONALD, S.; CHAN, D. Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 5-6, p. 1215-1226, 2007.
- KRYSIŃSKA-TRACZYK, E.; PERKOWSKI, J.; DUTKIEWICZ, J. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in Eastern Poland. **Annals of Agricultural Environmental Medicine**, v. 14, p. 159-167, 2007.
- KUMAR, P. S.; RAMAKRISHNAN, K.; KIRUPHA, S. D.; SIVANESAN, S. Thermodynamic and kinetic studies of cadmium adsorption from aqueous solution onto rice husk. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 347-355, 2010.
- KUNZE, W. **Technology, brewing and malting**. Berlin: VLB. p.726, 1996.
- KUZDRALINSKI, E.; SOLARSKA, E.; MUSZYŃSKA, M. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immune sorbent assay method. **Food Control**, v. 29, p. 22 – 24, 2013.
- LANCOVA, K., HAJŠLOVA, J., POUŠTKA, J., KRPLOVA, A., ZACHARIASOVA, M., DOSTALEK, P. Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' Deoxynivalenol (Deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 732 – 744, 2008.
- LEGARDA, T. M.; BURDASPAL, P. A. Ocratoxina A en cervezas elaboradas em España y en otros países europeos. **Alimentaria**, v. 291, p. 115 – 122, 1998.
- LESMANA, S. O.; FEBRIANA, N.; SOETAREDJO, F. E.; SUNARSO, J.; ISMADJI, S. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.19-41, 2009.
- LEWIS, M.J., YOUNG, T.W. **Brewing**. Chapman & Hall, p. 233-250, 1995.
- LI, Y.; WEN, S.; CHEN, Z.; XIAO, Z.; MA, M. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2, zearalenone and its metabolites in eggs using a QuEChERS based extraction procedure. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4145-4151, 2015.
- LIU, X.; LI, H.; XU, Z.; PENG, J.; ZHU, S.; ZHANG, H. Development of hyperbranched polymers with non-covalent interactions for extraction and determination of aflatoxins in cereal samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 797, p. 40–49, 2013.

LIU, Z-Y.; YU, C-H.; WAN, L.; SUN, Z-L. Fragmentation study of five trichothecenes using electrospray hybrid ion trap/time-of-flight mass spectrometry with accurate mass measurements. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 309, p. 133-140, 2012.

LIU, Z.; GAO, J.; YU, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, v. 42, p. 468–479, 2006.

LODOLO, E. J.; KOCK, J. L. F.; BARRY C. AXCELL, B. C.; BROOKS, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing. **FEMS Yeast Research**, v. 8 n. 7, 2008.

MACHADO, L. V.; MALLMANN, C. A.; MALLMANN, A. O.; COELHO, R. D.; COPETTI, M.V. Deoxynivalenol in wheat and wheat products from a harvest affected by fusarium head blight. **Food Science and Technology**, n. 37, p. 8-12, 2017.

MACHINSKI JR, M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 1001-1007, 2001.

MADEIRA, J. S. **Perfil do consumidor de cervejas especiais**. Monografia (TCC em Ciências Sociais) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

MAJORS, R.E. QuEChERS — A New Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples. **LCGC Asia Pacific**, v. 11, p. 22-31, 2008.

MALACHOVA, A., CERKAL, R., EHRENBARGEROVA, J., DZUMAN, Z., VACULOVA, K., & HAJŠLOVA, J. Fusarium mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90(14), 2495–2505, 2010.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. **Sociedade Vicente Pallotti**, v.1, p. 238, 2007.

MALONE, B.M., RICHARD, J.L., ROMER, A.S., JOHNASSON, A.S., WHITAKER, T. Fumonisin reduction in corn by cleaning during storage discharge. In: O'Brien, L., Blakeney, A.B., Ross, A.S., Wrigley, C.W. (Eds.), **Cereals 98, Proceedings of the 48th Australian Cereal Chemistry Conference**. Royal Australian Chemical Institute. North Melbourne, Australia, August, p. 372–379, 1998.

MANKEVICIENĖ, A.; BUTKUTĖ, B.; GAURILCIKIENĖ, I.; DABKEVICIUS, Z.; SUPRONIENĖ, S. Risk assessment of Fusarium mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. **Food Control**, v. 22, p. 970-976, 2011.

MANKEVIČIENĖ, A.; BUTKUTĖ, B.; DABKEVIČIUS, Z.; SUPRONIENĖ, S. *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 14, p. 103-107, 2007.

MARESCA, M. From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. **Toxins**, v.5, p.784-820, 2013.

MARROQUÍN-CARDONA, A.G.; JOHNSON, N.M.; PHILLIPS, T.D.; HAYES, A.W. Mycotoxins in a changing global environment – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220-230, 2014.

MASSAROLO, K.C., FERREIRA, C.F.J., KUPSKI, L., BADIALE-FURLONG, E. Optimization of Matrix Solid-Phase Dispersion Method for Extraction of Aflatoxins from Cornmeal. **Food Analytical Methods**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2018.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, p.89-99, 2010.

MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E. M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 79-83, 2007.

MATUMBA, L., VAN POUCKE, C., EDIAGE, E.N., JACOBS, B., DE SAEGER, S. Effectiveness of hand sorting, flotation/washing, dehulling and combinations thereof on the decontamination of mycotoxin-contaminated white maize. **Food Additives and Contaminants Part A**, v. 32, p. 960–969, 2015.

MCCORMICK, S. P.; PRICE, N. PJ; KURTZMAN, C. P. Glucosylation and other biotransformations of T-2 toxin by yeasts of the *Trichomonascus clade*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8694-8702, 2011.

MCKENZIE, K.S., KUBENA, L.F., DENVIR, A.J., ROGERS, T.D., HITCHENS, G.D., BAILEY, R.H., HARVEY, R.B., BUCKLEY, S.A., PHILLIPS, T.D. Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**, v. 77, p. 1094–1102, 1998.

MCKENZIE, K. S.; SARR, A. B.; MAYURA, K.; BAILEY, R. H.; MILLER, D. R.; ROGERS, T. D.; NORRED, W. P.; VOSS, K. A.; PLATTNER, R. D.; KUBENA, L. F.; PHILLIPS, T. D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 8, p. 807-820, 1997.

MEDINA A, JIMÉNEZ M, GIMERNO-ADELANTADO JV, VALLE- ALGARRA FM, MATEO R. Determination of Ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 7-13, 2005.

MENDES, G. R. L.; REIS, T. A.; CORRÊA, B.; BADIALE-FURLONG, A. Mycobiota and occurrence of Fumonisin B1 in wheat harvested in Southern Brazil Micobiota e ocorrência de Fumonisin B1 em trigo colhido no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 45, p.1050-1057, 2015.

- MENEELY, J.P.; RICCI, F.; EGMOND, H.P.V.; ELLIOTT, C. T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 192-203, 2011.
- MEREDITH, W.O.S., ANDERSON, J.A., HUDSON, L.E. Evaluation of malting barley. In: Cook, A.H. (Ed.), **Barley and Malt. Biology, Biochemistry and Technology**, Academic Press, p. 207-270, 1962.
- MERTENS, S.; STEENSELS, J.; SAELS, V.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; VERSTREPEN, K. J. A Large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in *Lager* beers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 8202-8214, 2015.
- METHA, P. K. Rice Husk Ash – a unique supplementary cementing material. In: MALHOTRA, V. M. (ed.) Advances in concrete technology, **Energy Mines and Resources**, Ottawa, p.407-432, 1992.
- MICHLIG, N.; REPETTI, M. R.; CHIERICATTI, C.; GARCÍA, S. R.; GAGGIOTTI, M.; BASÍLICO, J. C.; BELDOMÉNICO, H. R. Multiclass compatible sample preparation for UHPLC-MS/MS determination of aflatoxin M1 in raw milk. **Chromatographia**, v. 79, p. 1091-1100, 2016.
- MIMURA, A. M. S.; VIEIRA, T. V. A.; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, H. F. Aplicação da casca de arroz na adsorção dos íons Cu^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . **Química Nova**, v.33, p.1279-1284, 2010.
- MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M.; NELSON, G. H. Estrogenic Metabolite Produced by *Fusarium graminearum* in Stored Corn. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 497-503, 1967.
- MUNCK, L. Advances in barley quality. Experiences and Perspectives. **Options Méditerranéennes – Série Séminaires. New Trends in Barley Quality for Malting and Feeding**, n. 20, p. 9-18, 1991.
- MUNROE, J. H. Fermentation. In: Hardwick, W. A. **Handbook of brewing**. New York: Marcel Dekker, p. 323 -353, 1994.
- MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Institute of Food Technologists**, v. 71, p. 51-65, 2006.
- MYERS A. L.; Thermodynamics of Adsorption. **Chemical Thermodynamics for Industry** - Ed. T.M. Letcher, 2004.
- NEME, K.; MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**, v. 78, p. 412-427, 2017.
- NGAH, W. S. W.; HANAFIAH, M. A. K. M. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: a review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3935-3948, 2008.

NIESSEN, L. M. Entwicklung and anwendung immunchemischer verfahren zum nachweis wichtiger Fusarium - toxine bei der bierbereitung sowie mycologische untersuchungen im zuasammenhang mit dem widwerded (gushing) von bieren, (**Doctoral thesis**) Technical University Munick, Program for Technical Microbiology and Brewing Technology, p. 2, 1993.

NORA, N. **Redução dos níveis de ocratoxina a por ação da enzima peroxidase.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2015.

NOVO, P.; MOULAS, G.; PRAZERES, D. M. F.; V.; CHU, V; CONDE, J. P. Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, p. 232-240, 2013.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OLKKU, J., KOTAVIITA, E., SALMENKALLIO-MARTILLA, M., SWEINS, H., HOME, S. Conection between structure and quality of barley husk. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 63, p. 17-22, 2005.

ONORIO, O. C.; RIOS, O. G.; GUYOT, B.; FONTANA, T. A.; GUIRAUD, J. P.; GALLINDO, S. S.; DURAND, N.; QUIROZ, M. S. Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Control**, v. 22, p. 1184-1188, 2011.

OSSELAERE, A.; DEVREESE, M.; GOOSSENS, J.; VANDENBROUCKE, V.; BAERE, S.; BACKER, P.; CROUBELS, S. Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 350–355, 2013.

PAGKALI, V.; PETROU, P.S., SALAPATAS, A.; MAKARONA, E.; PETERS, J.; HAASNOOT, W.; JOBST, G.; ECONOMOU, A.; MISIAKOS, K.; RAPTIS, I.; KAKABAKOS, S.E. Detection of ochratoxin A in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor. **Journal of Hazardous Materials (Part A)**, v. 323, p. 75-83, 2017.

PALMER, G.H. Barley and malt. In: Priest, F.G., Stewart, G.G. (ed.) - **Handbook of Brewing.** CRC Press, p. 139-160, 2006.

PALMER, G.H. Cereals in Malting and Brewing. In: Palmer, G.H. **Cereal Science and Technology.** UK: Aberdeen University Press, p. 61-242, 1989.

PALMER, G.H. Malting and mashing. In: **An Introduction to Brewing and Science Technology.** The Institute of Brewing, p. 10-27, 1983.

PAN, J.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; LI, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p.1-15, 2014.

PAN, D.; BONSIGNORE, F.; RIVAS, F.; PERERA, G.; BETTUCCI, L. Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 149-152, 2007.

PARK, B.D.; WI, S.G.; LEE, K.H.; SINGH, A.P.; YOON, T.H.; KIM, Y.S. Characterization of anatomical features and silica distribution in rice husk using microscope and micro-analytical techniques. **Biomass & Bioenergy**, v. 25, p. 319–327, 2003.

PASCALE, M.; PANZARINI, G.; VISCONTI, A. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Talanta**, v. 89, p. 231-236, 2012.

PASCARI, X.; SOLÁ, J. O.; MARÍN, S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain. **LWT**, v. 92, p. 87-91, 2018 a.

PASCARI, X.; RAMOS, A.J.; MARÍN, S.; SANCHIS, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 121-129, 2018 b.

PATTONO, D.; GALLO, P. F.; CIVERA, T. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. **Food Chemistry**, v. 127, p. 374-377, 2011.

PAVLOVIC, D. M.; BABIC, S.; HORVAT, A. J. M.; KASTELAN-MACAN, M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1062-1075, 2007.

PEDROZO, É. C. Estudo da utilização de cinza da casca do arroz residual em concretos estruturais: uma análise da durabilidade aos cloretos. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Civil), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

PENG, W. X.; MARCHAL, J.L.M.; VAN DER POEL, A.F.B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. **Animal Feed Science and Technology**, v.237, p. 129–153, 2018.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Comparative assessment of three cleanup procedures after QuEChERS extraction for determination of trichothecenes (type A and type B) in processed cereal-based baby foods by GC–MS. **Food chemistry**, v. 182, p. 143-149, 2015.

PÉREZ-ORTEGA, P.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; RAMOS-MARTOS, N.; MOLINA-DÍAZ, A. Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1249, p. 32–40, 2012.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 663-679, 2010.

PESTKA, J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p. 283-298, 2007.

PETERS, J.; VAN DAM, R.; VAN DOORN, R.; KATERERE, D.; BERTHILLER, F.; HAASNOOT, W.; NIELEN, M. W. F. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. **PLoS One**, v. 12, e0185887, 2017.

PIACENTINI, K. C.; SAVI, G. D.; PEREIRA, M. E. V.; SCUSSEL, V. M. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). **Food Chemistry**, v. 187, p. 204-209, 2015.

PIACENTINI, K. C.; SAVI, G. D.; OLIVO, G.; SCUSSEL, V. M. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. **Food Control**, v.50, p. 925 – 929, 2014.

PICKERELL, A. T. W.; HWANG, A.; AXCELL, B. C. Impact of yeast-handling procedures on beer flavor development during fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 49, p. 87 -92, 1991.

PIETRI, A., BERTUZZI, T., AGOSTI, B., & DONADINI, G. Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. **Food Additives & Contaminants. Part A**, v. 27, p.1431–1439, 2010.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRIETO-SIMON, M. B.; CAMPAS, J.L.; MARTY, T. N. Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 995–1002, 2008.

POEHLMAN, J.M. Adaptation and Distribution. In: RASMUSSEN, D.C. Barley. Wisconsin, USA: American Society of Agronomy. **Crop Science Society of America, Soil Science Society of America**, 1985.

POREDA, A.; CZARNIK, A.; ZDANIEWICZ, M.; JAKUBOWSKI, M.; ANTKIEWICZ, P. Corn grist adjunct – Application and influence on the brewing process and beer quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, p. 77 – 81, 2014.

PRIEST, F. G.; STEWART, G.G. **Handbook of brewing**. Boca Raton: CRC. p. 853, 2006.

QIU, H.; LV, L.; PAN, B.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, Q. Critical review in adsorption kinetic models. **Journal of Zhejiang University Science A**. v. 10, p. 716-724, 2009.

QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. O.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M.; RIBEIRO, P. E. A.; COSTA, R. V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, p. 83-86, 2012.

QUINTANA, M. C.; RAMOS, J.J.; HERNÁNDEZ, L.; RAMOS, L. Determination of residual phenothiazines in liver by matrix solid phase dispersion combined with HPLC with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p. 270-282, 2009.

RAMOS, A.J., FINK-GREMMELES, J., HERNANDEZ, E. Prevention of the toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive absorbent compounds. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 631-641, 1996.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry**, v. 13, p. 980-1010, 2015.

REMIRO, R.; IBÁÑEZ-VEA, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 8249-8256, 2010.

RIBEIRO, J.M.M. et. al. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 179-184, 2006.

RICHARD, J. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3-10, 2007.

RIOS, G., PINSON-GADAIS, L., ABECASSIS, J., ZAKHIA-ROZIS, N., LULLIEN-PELLERIN, V. Assessment of dehulling efficiency to reduce deoxynivalenol and Fusarium level in durum wheat grains. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 387-392, 2009 a.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369-378, 2005.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ VIDAL, J.L.; AGUILERA-LUIZ, M.M.; GARRIDO FRENICH, A. Application of conventional solid-phase extraction for multimycotoxin analysis in beers by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9385-9392, 2009.

ROSA, M.P.; BECK, P.H.; MÜLLER, D.G.; MOREIRA, J.B.; SILVA, J.S.; DURIGON, A.M.M. Extraction of Organosolv Lignin from Rice Husk under Reflux Conditions. **Biological and Chemical Research**, v. 4, p. 87 - 98, 2017.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 2, p. 98-105, 2015.

- ROTTER, R.G., ROTTER, B.A., THOMPSON, B.K., PRELUSKY, D.B., TRENHOLM, H.L. Effectiveness of density segregation and sodium carbonate treatment on the detoxification of *Fusarium*-contaminated corn fed to growing pigs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 68, p. 331–336, 1995.
- RUBERT, J.; SOLER, C.; MARÍN, R.; JAMES, K. J.; MAÑES, J. Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. **Food Control**, v. 30, p. 122-128, 2013.
- RUBERT, J.; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C.; HAJLSLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. **Talanta**, v. 99, p. 712-719, 2012.
- RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-mycotoxin determination in different flours using LC–MS/MS. **Talanta**, v. 85, p. 206–215, 2011.
- RUTHVEN, D.M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. John Wiley & Sons. New York, 1984.
- RYCHLIK, M.; HUMPF, H. U.; MARKO, D.; DÄNICKE, S.; MALLY, A.; BERTHILLER, F.; KLAFFKE, H.; LORENZ, N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. **Mycotoxin Research**, v. 30, p. 197-205, 2014.
- SAENZ DE RODRIGUEZ, C. A., BONGIOVANNI, A., CONDE DE BORREGO, L. An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. **The Journal of Pediatrics**, v. 107, p. 393-396, 1985.
- SANCHEZ, R. G.; SOLODOVNIKOVA, N.; WENDLAND, J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. **Yeast**, v. 29, p. 343-355, 2012.
- SANTE. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, 2015. Available at: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf.
- SANTOS, J.S.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y. S.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; MIRANDA, M. Z. D.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, v. 138, p. 90– 95, 2013.
- SAVI, D. G.; PIACENTINI, K. C.; ROCHA, L. O.; CARNIELLI-QUEIROZ, L.; FURTADO, B. G.; SCUSSEL, R.; ZANONI, E. T.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; CORRÊA, B.; ANGIOLETTO, E. Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 270, p. 5-13, 2018.

SAVI, G.D., PIACENTINI, K.C., BITTENCOURT, K.O., SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. **Journal of Stored Products Research**, v. 59, p. 245–253, 2014.

SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E. Rice husk as an adsorbent: A new analytical approach to determine aflatoxins in milk. **Talanta**, v. 152, p. 423-431, 2016.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial, **Engenharia bioquímica**, Editora Edgard Blucher, v. 2, 2001.

SCHMIDT-HEYDT, M.; RÜFER, C. E.; ABDEL-HADI, A.; MAGAN, N.; GEISEN, R. The production of aflatoxin B1 or G1 by *A. parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. **Mycotoxin Research**, v. 26, p. 241-246, 2010.

SCHOENTAL, R. Precocious sexual development in Puerto Rico and oestrogenic mycotoxins (zearalenone). **Lancet** 1:537, 1983.

SCHWAKE-ANDUSCHUS, C., LANGENKÄMPER, G., UNBEHEND, G., DIETRICH, R., MÄRTLBAUER, E., MÜNZING, K. Occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 toxins in oats from cultivar studies in Germany and degradation of the toxins during grain cleaning treatment and food processing. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, p. 1253–1260, 2010.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin A in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, p. 591-598, 1995.

SCOTT, P.M., LAWRENCE, G.A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 541–545, 1994.

SCUSSEL, V. M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Biogeneziz. p. 675-691, 2002.

SCUSSEL, V.M. Micotoxinas em Alimentos. Florianópolis: **Insular**, p. 144, 1998.

SENYUVA, H. Z.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p.115–132, 2010.

SEUS-ARRACHÉ, E.R.; FONTES, M. R. V.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Trichothecenes in wheat: Methodology, occurrence and human exposure risk. **Journal of Cereal Science**, v. 82, p. 129-137, 2018.

SIWELA, A.H., SIWELA, M., MATINDI, G., DUBE, S., NZIRAMASANGA, N. Decontamination of aflatoxin-contaminated maize by dehulling. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2535–2538, 2005.

SKODRAS G., DIAMANTOPOULOU I., PANTOLEONTOS G., SAKELLAROPOULOS G.P., Kinetic studies of elemental mercury adsorption in activated carbon fixed bed reactor: **Review Journal of Hazardous Materials**, v. 158, p. 1–13, 2008.

SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, p. 836, 2002.

SMITH, T.K.; CHOWDHURY, S.R.; SWAMY, H.V.L.N. Comparative aspects of *Fusarium mycotoxicoses* in broiler chickens, laying hens and turkey and the efficacy of polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent: GME. In: **Biotechnology in the Feed Industry**, 22. Nottingham. Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium. Nottingham University Press. Nottingham. p. 103-109, 2006.

SPAGGIARI, M; RIGUETTI, L.; GALAVERNA, G.; GIORDANO, D.; SCARPINO, V.; BLANDINO, M.; DALL'ASTA, C. HR-MS profiling and distribution of native and modified *Fusarium* mycotoxins in tritordeum, wheat and barley whole grains and corresponding pearled fractions. **Journal of Cereal Science**, v. 87, p. 178-184, 2019.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Recent Advances and Developments in the QuEChERS Method. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 76, p. 1-55, 2017.

SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; ABAS, F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1055-1060, 2012.

SOLFRIZZO, M., VISCONTI, A., AVANTAGGIATO, G., TORRES, A., CHULZE, S. In vitro and in vivo studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. **Mycopathologia**, v. 151, p. 147–153, 2001.

SORIANO J.M.; BLESA J.; BERRADA H.; MOLTÓ J. C.; MAÑES J. Rapid determination of ochratoxin A in Rice cereals and cereal products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, p. 127-131, 2004.

STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 843-851, 1995.

STREIT, E.; SCHWAB, C.; SULYOK, M.; NAEHRER, K.; KRŠKA, R.; SCHATZMAYR, G. Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. **Toxins**, v. 5, p. 504–523, 2013.

STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I.P. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—focus on Europe. **Toxins**, v. 4, p. 788–809, 2012.

SUN, Y.; CHEN, J.; LI, A.; LIU, F.; ZHANG, Q. Adsorption of resorcinol and catechol aqueous solution by aminated hypercrosslinked polymers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 64, p. 63–73, 2005.

SUZUKY, M. **Adsorption Engineering**, Kodansha. Tokyo, 1990.

- SYLOS, C.M.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R.M. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, p. 123-130, 2003.
- SZUETS, P.; MESTERHAZY, A.; FALKAY, G.Y.; BARTOK, T. Early telarche symptoms in children and their relations to zearalenon contamination in foodstuffs. **Cereal Research Communications**, v. 25, p. 429-436.
- TABUC, C., MARIN, D., GUERRE, P., SESAN, T., & BAILLY, J. D. Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 662–665, 2009.
- TAJKARIMI, M., RIEMANN, H.P., HAJMEER, M.N., GOMEZ, E.L., RAZAVILAR, V., CLIVER, D.O. Ammonia disinfection of animal feeds—laboratory study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 23–28, 2008.
- TAN, H.; ZHANG, Z.; HU, Y.; WU, L.; LIAO, F.; HE, J.; LUO, B.; HE, Y.; ZUO, Z.; REN, Z.; PENG, G.; DENG, J. Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* TH-N1 capable of degrading Zearalenone. **Food Control**, v. 47, p. 285-290, 2015.
- 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, 2000.
- TARLEY C.R.T.; ARRUDA M.A.Z. Adsorventes naturais: potencialidades e aplicações da esponja natural (*Luffa cylindrica*) na remoção de chumbo em efluentes de laboratório. **Revista Analytica**, v. 4, p. 25-31, 2003.
- TIBOLA, C.S.; FERNANDES, J.M.C.; GUARIENTI, E.M. Effect of cleaning, sorting and milling processes in wheat mycotoxin content. **Food Control**, v. 60, p. 174–179, 2016.
- TIWARI, B.K., BRENNAN, C.S., CURRAN, T., GALLAGHER, E., CULLEN, P.J., O'DONNELL, C.P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 248–255, 2010.
- TOBISZEWSKI, M. Metrics for green analytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 2993–2999, 2016.
- TOMASZEWSKI, J.; MITURSKI, R.; SEMCZUK, A.; KOTARSKI, J.; JAKOWICKI, J. Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. **Ginekol Polska**, v. 69, p.363–366, 1998.
- TORRES, M. R., SANCHIS, V., & RAMOS, A. J. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 139 – 143, 1998.
- TOZLOVANU, M.; FAUCET-MARQUIS, V.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R A. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA ad- duction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 1241–1247, 2006.

TRALAMAZZA, S. M.; BRAGHINI, R.; CORRÊA, B. Trichothecene Genotypes of the *Fusarium graminearum* Species Complex Isolated from Brazilian Wheat Grains by Conventional and Quantitative PCR. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, article 246, 2016.

TSAI, W.; CHANG, C. Y.; ING, C. H.; CHANG, C. F. Adsorption of acid dyes from aqueous solution on activated bleaching earth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 72-78, 2004.

TURNER, C. Sustainable analytical chemistry—More than just being green. **Pure and Applied Chemistry**, v.85, p. 2217–2229, 2013.

UENO, Y., NAKAYAMA, K., ISHII, K., TASHIRO, F., MINODA, Y., OMORI, T. Metabolism of T-2 toxin in *Curtobacterium sp.* Strain 114-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 120–127, 1987.

UNDERHILL, K.L., ROTTER, B.A., THOMPSON, B.K., PRELUSKY, D.B., TRENHOLM, H.L. Effectiveness of cholestyramine in the detoxification of zearalenone as determined in mice. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 54, p. 128–134, 1995.

URBANO, L. H. **Fermentação etanólica em mostos de hidrolisados de amido de mandioca**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, São Paulo, 2012.

URRY, W.H.; WEHRMEISTER, H. L.; HODGE, E.B.; HIDY, P.H. The structure of zearalenone. **Tetrahedron Letters**, v. 7, p. 3109-3114, 1966.

VACLAVIKOVA, M., MALACHOVA, A., VEPRIKOVA, Z., DZUMAN, Z., ZACHARIASOVA, M., & HAJŠLOVA, J. “Emerging” mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. **Food Chemistry**, v. 136, p. 750–757, 2013.

VARGA, E.; GLAUNER, T.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R.; SULYOK, M. Development and validation of a (semi-) quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5087-5104, 2013.

VASANTHI, S., BATH, R.V. Mycotoxins in foods: occurrence, health, and economic significance and food control measures. **Indian Journal of Medical Research**, v. 108, p. 212–224, 1998.

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. **Chemie potravin II**. OSSIS, Havlíčkův Brod. ISBN: 978-80-86659-16-9, 2009.

VENTURA, M.; GUILLÉN, D.; ANAYA, I.; BROTO-PUIG, F.; LLIBERIA, J.L.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 3199– 3204, 2006.

VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas alcoólicas. **Ciência e tecnologia**, São Paulo, Editora Edgard Blucher, v. 1, 2 ed., 2016.

VEPRIKOVA, Z.; ZACHARIASOVA, M.; DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, A.; FENCLOVA, M.; SLAVIKOVA, P.; VACLAVIKOVA, M.; MASTOVSKA, K.; HENGST, D.; HAJLSLOVA, J. Mycotoxins in plant-based dietary supplements: hidden health risk for consumers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 6633-6643, 2015.

VILLAVERDE-DE-SÁA, E.; QUINTANA, J.; RODIL, R.; FERRERO-REFOJOS, R.; RUBÍ, E.; CELA, R. Determination of perfluorinated compounds in mollusks by matrix solid phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 509-518, 2012.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 200-212, 2007.

WALTER, M.; MARCHESAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, p.1184–1192, 2008.

WANG, S.; XU, Y.; PAN, C.; JIANG, S.; LIU, F. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 673–685, 2007.

WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; LIU, D. Recent advances in solid phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 26-41, 2014.

WHO - World Health Organization. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot / published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme. **International Labour Organisation and the World Health Organization**, 1990. <http://www.who.int/iris/handle/10665/39552>.

WOLF-HALL, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 89 – 94, 2007.

WU, F. C.; TSENG, R.L.; JUANG, R.S. Characteristics of Elovich Equation Used for the Analysis of Adsorption Kinetics in Dye Chitosan Systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 150, p. 366-373, 2009.

WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v.41, p.1-7, 2009.

WU, F. A tale of two commodities: how EU mycotoxin regulations have affected food industries. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, p. 71–78, 2008.

WU, X., MURPHY, P., CUNNICK, J., HENDRICH, S. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1846–1855, 2007.

XU, W.; HAN, X.; LI, F. Co-occurrence of multi-mycotoxins in wheat grains harvested in Anhui province, China. **Food Control**, v. 96, p. 180-185, 2019.

YANG, J.Y.; ZHANG, Y.F.; WANG, Y.Q. Toxic effects of zearalenone and α -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. **Toxicology in Vitro**, v.21, p. 558– 65, 2007.

YIANNIKOURIS, A., FRANCOIS, J., POUGHON, L., DUSSAP, C.-G., BERTIN, G., JEMINET, G., JOUANY, J.-P. Adsorption of zearalenone by β -d-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1195–1200, 2004 a.

YOUNG, J.C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 417–424, 2006.

ZACHARIASOVA, M., LACINA, O., MALACHOVA, A., KOSTELANSKA, M., POUSTKA, J., GODULA, M. Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 51–61, 2010.

ZHANG, J.; GAO, L.; ZHOU, B.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; HUANG, B. Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 193-197, 2011.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MANES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of Zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.