

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Daniela Stefani Honnef Gai

**Validação de método para determinação de desoxinivalenol e a sua
influência na qualidade tecnológica da farinha de trigo**

Passo Fundo

2018

Daniela Stefani Honnef Gai
(Licenciada em Química)

**Validação de método para determinação de desoxinivalenol e a sua
influência na qualidade tecnológica da farinha de trigo**

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Orientador: Luiz Carlos Gutkoski
Co-orientador: Maria Tereza Friedrich
Linha de pesquisa: Qualidade e propriedades
funcionais de alimentos

Passo Fundo
2018

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINAVETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado


Validação de método para determinação de desoxinivalenol e a sua influência na
qualidade tecnológica da farinha de trigo


Elaborada por

Daniela Stefani Honnef Gai

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora


**Luiz Carlos Gutkoski, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**


Maria Tereza Friedrich, (Coorientadora) Dra., UPF


Marcelo Hemkemeier, Dr., UPF


Eliana Maria Guarienti, Dra., Embrapa Trigo

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

CIP – Catalogação na Publicação

G137v Gai, Daniela Stefani Honnef

Validação de método para determinação de desoxinivalenol e a sua influência na qualidade tecnológica da farinha de trigo / Daniela Stefani Honnef Gai. – 2018.

91 p. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Gutkoski.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Friedrich.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Trigo. 2. Farinhas. 3. Desoxinivalenol. I. Gutkoski, Luiz Carlos, orientador. II. Friedrich, Maria Tereza, coorientadora. III. Título.

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

Á minha família.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida.

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Gutkoski, Professora Dra. Maria Tereza Friedrich e a Dra. Tatiana Oro, quero transmitir o meu sincero agradecimento pela orientação científica prestada ao longo de todo o trabalho, pela paciência, crescimento pessoal e profissional proporcionado e pela disponibilidade investida durante estes dois anos.

Aos membros da banca examinadora: Professora Dra. Eliana Maria Guarienti e ao Professor Dr. Marcelo Hemkemeier.

As colegas do laboratório de cereais da Universidade de Passo Fundo, Gabriela Santetti, Vanessa Esteres, Leticia Gulich, Barbara Zago e Joseane Bressiani.

Aos funcionários do laboratório de cereais da Universidade de Passo Fundo, Tânia Soster Santetti e Jonas Bregalda pelo apoio nas análises e valorosos conselhos.

A funcionária do laboratório de cromatografia da Universidade de Passo Fundo, Karen Bueno de Paula, por todo apoio nas análises cromatográficas.

À Universidade de Passo Fundo (UPF), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGTA), Professores, Alunos e Funcionários, pela amizade, apoio e suporte fornecidos para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha família pela força e confiança em mim depositada na conclusão de mais uma etapa.

Ao meu marido, Rafael, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e acreditando em mim.

A todos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

O trigo é utilizado na indústria de alimentos devido às suas propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais. A contaminação do grão por fungos resulta em decréscimo da qualidade comercial o que prejudica tanto o produtor quanto a indústria de alimentos. A micotoxina de maior incidência no trigo é a desoxinivalenol causada pelo fungo do gênero *Fusarium*, que, mesmo em concentrações baixas, pode ser tóxica para quem o consome, além de desvalorizar o grão junto ao mercado. A fim de minimizar a presença deste contaminante no grão os agricultores têm utilizado fungicidas buscando o controle satisfatório do fungo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência da micotoxina desoxinivalenol no trigo submetido a aplicação de fungicidas e a qualidade tecnológica deste produto. Para a determinação da micotoxina desoxinivalenol e dos fungicidas carbendazin, tebuconazol, metconazol, mancozebe e piraclostrobina em grãos de trigo foi validado um método analítico que apresentou baixos limites de detecção e alta sensibilidade, partindo da fundamentação do método QuEChERS, amplamente utilizado na análise multirresíduo, e determinação cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série. A qualidade tecnológica do trigo foi avaliada através de análises físico-químicas e reológicas na farinha integral. A significância dos dados foi realizada pelo teste de Skott-Knott com probabilidade de erro de 5%. As amostras apresentaram diferentes níveis de contaminação por desoxinivalenol, porém os resultados encontrados indicaram que os fungicidas possuem controle sob a contaminação da micotoxina, sem deixar resíduos no produto final. Os resultados da caracterização físico-química da farinha integral, amostra T1-testemunha diferiu significativamente em relação ao teor de proteína das demais amostras. Nas análises reológicas a amostra T9 apresentou diferença significativa em comparação com as demais amostras nos parâmetros de estabilidade de massa e glúten úmido, porém verificou-se que não existe uma relação direta destes parâmetros com a contaminação pela micotoxina desoxinivalenol, já que a testemunha possui os maiores valores de contaminação e obteve bons resultados nestas análises. As amostras T2, T10 e T11 e T12 apresentaram diferença significativa no parâmetro de viscosidade máxima, na análise de RVA, quando comparada as demais, porém nas amostras T11 e T12 a concentração da micotoxina DON é maior do que nas amostras T2 e T10, ou seja, o nível de DON não interfere no parâmetro de viscosidade máxima. Os resultados do parâmetro de retrogradação, seguiram a mesma tendência dos encontrados no parâmetro de viscosidade máxima e viscosidade final. As amostras T11 e T12 tiveram diferença significativa e em comparação com os diferentes teores de desoxinivalenol encontrados, concentração de DON não aumentou a retrogradação. Analisando os resultados obtidos nas quantificações analíticas em comparação com as análises físico-químicas e reológicas, conclui-se que os diferentes níveis de contaminação obtidos pela micotoxina desoxinivalenol não interfere na qualidade tecnológica do produto final.

Palavras-chave: triticum. DON. qualidade tecnológica.

ABSTRACT

Wheat is used in the food industry because of its functional, technological and nutritional properties. Contamination of grain by fungi results in a decrease in commercial quality, which harms both the producer and the food industry. The mycotoxin with the highest incidence in wheat is deoxynivalenol caused by the fungus of the *Fusarium* species, which, even in low concentrations, can be toxic to those who consume it besides devaluing the grain next to the market. In order to minimize the presence of this contaminant in the grain, the agriculture has used fungicides seeking the satisfactory control of the fungus. The objective of this work was to evaluate the incidence of mycotoxin deoxynivalenol in wheat submitted to fungicide application and the technological quality of this product for baking. In order to determine the mycotoxin deoxynivalenol and the fungicides carbendazin, tebuconazole, metconazole, mancozeb and pyraclostrobin in wheat grains, an analytical method was validated that showed low detection limits and high sensitivity, based on the QuEChERS method, widely used in multiresistant analysis, and determination LC MS / MS. The technological quality of the wheat was evaluated through physicochemical and rheological analyzes in whole grain wheat flour. The significance of the data was performed by the Skott-Knott test with error probability of 5%. The samples showed different levels of contamination by DON, but the results indicated that the fungicides have control under the contamination of the mycotoxin, without leaving residues in the final product. The results of the physico-chemical characterization of the FTGI the T1-control sample differed significantly in relation to the protein content of the other samples, this is believed to have occurred due to the formation of fungal protein. In the rheological analysis, the T9 sample presented a significant difference in comparison to the other samples in the parameters of mass stability and wet gluten, but it was verified that there is no direct relation of these parameters with the contamination by the mycotoxin deoxynivalenol, since the control has the higher values of contamination and obtained good results in these analyzes. Samples T2, T10 and T11 and T12 showed a significant difference in the maximum viscosity parameter in the RVA analysis, when compared to the others, but in samples T11 and T12 the concentration of mycotoxin DON is higher than in samples T2 and T10, or The results of the regression parameter follow the same trend as those found in the parameter of maximum viscosity and final viscosity, the samples T11 and T12 had a significant difference and in comparison with the different levels of deoxynivalenol found, the concentration of DON did not increase the retrogradation. Analyzing the results obtained in the analytical quantifications in comparison with the physical-chemical and rheological analyzes, it is concluded that the different levels of contamination obtained by the mycotoxin deoxynivalenol does not interfere in the technological quality of the final product

Key-words: triticum. mycotoxins. technological quality

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Giberela do trigo	24
Figura 2 – Estrutura química da micotoxina desoxinivalenol	25
Figura 3 – Fases do florescimento do trigo	26
Figura 4 – Fluxograma do procedimento do preparo de amostras utilizando QuEChERS original	31
Figura 5 – Estrutura química do PSA	32
Figura 6 – Esquema de uma análise por MS após a separação cromatográfica	33
Figura 7 – Esquema de um analisador de massas tipo triplo quadrupolo	34
Figura 8 – Fluxograma da matéria prima e das etapas de desenvolvimento do trabalho	41
Figura 9 – Fluxograma das etapas de extração utilizando método QuEChERS adaptado	46
Figura 10 – Relação entre os parâmetros estabilidade, Glúten úmido e micotoxina desoxinivalenol	63
Figura 11 – Relação entre os parâmetros de viscosidade máxima, retrogradação e micotoxina desoxinivalenol	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos toleráveis estabelecidos para o Brasil (ANVISA) e para a União Europeia (European Union Commission Regulation) para micotoxina DON em farinha de trigo integral e algumas moléculas de fungicidas.	29
Tabela 2 - Aplicação sequencial de fungicidas em trigo da cultivar TBIO Toruk®	42
Tabela 3 – Gradiente da fase móvel utilizado para eluição dos compostos	44
Tabela 4 – Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por LC-MS/MS (Tabela).....	45
Tabela 5 – Resultados da análise da regressão dos analitos da solução padrão	51
Tabela 6 – Recuperação da micotoxina desoxinivalenol	52
Tabela 7 – Recuperação dos fungicidas em estudo	52
Tabela 8 – Resultados da avaliação da precisão do procedimento	53
Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método avaliado (em $\mu\text{g kg}^{-1}$)	53
Tabela 10 – Valores encontrados da micotoxina DON (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) na farinha integral	54
Tabela 11 – Caracterização físico-química do grão	56
Tabela 12 – Caracterização físico-química da farinha integral	57
Tabela 13 – Teores de glúten encontrados na farinha integral	59
Tabela 14 – Avaliação das cores das farinhas de trigo de grão inteiro por tratamento	60
Tabela 15 – Propriedades de misturas das diferentes amostras de farinha integral	61
Tabela 16 – Propriedades de pasta das amostras de farinha de trigo de grão inteiro	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DON: Desoxinivalenol

FTGI: Farinha de Trigo de Grão Inteiro

ICH: Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

LMT: Limite Máximo Tolerável

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 TRIGO.....	23
2.2 MICOTOXINAS.....	24
2.2.1 Desoxinivalenol.....	25
2.3 FUNGICIDAS	26
2.3.1 Classe química dos fungicidas.....	26
2.4 QUALIDADE TECNOLÓGICA DA FARINHA DE TRIGO INTEGRAL.....	27
2.5 LEGISLAÇÃO	28
2.6 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E FUNGICIDAS	29
2.6.1 Método QuEChERS	30
2.6.2 Determinação instrumental.....	31
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO.....	33
2.7.1 Linearidade e curva analítica.....	34
2.7.1.1 Avaliação da normalidade.....	35
2.7.2 Exatidão.....	36
2.7.3 Precisão.....	36
2.7.4 Repetibilidade.....	37
2.7.5 Precisão intermediária	37
2.7.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	38
2.7.6.1 Limite de detecção.....	38
2.7.6.2 Limite de quantificação	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 AMOSTRAS UTILIZADAS NO ESTUDO	40
3.1.1 Micotoxina e fungicidas estudados	42
3.1.2 Materiais Utilizados.....	43
3.1.3 Solventes, reagentes e gases	43
3.1.4 Instrumentação.....	43
3.1.5 Preparo das soluções analíticas.....	45
3.1.6 Preparo das amostras para determinação analítica	45
3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DA MICOTOXINA DON E FUNGICIDAS EM FARINHA DE TRIGO DE GRÃO INTEIRO	46

3.2.1 Curva analítica	46
3.2.2 Ensaio de recuperação para avaliação da exatidão	47
3.2.3 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	47
3.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação	48
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO GRÃO INTEIRO.....	48
3.3.1 Peso hectolitro (PH)	48
3.3.2 Teor de umidade.....	48
3.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA INTEGRAL.....	48
3.4.1 Caracterização físico-química da FTGI	48
3.4.1.2 Teor de proteína da FTGI.....	49
3.4.1.3 Teor de cinzas	49
3.4.1.4 Teor de glúten	49
3.4.1.5 Cor	49
3.4.2 Caracterização reológica da FTGI	50
3.4.2.2 Propriedades de pasta	50
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO	51
4.1.1 Curva Analítica	51
4.1.2 Exatidão (recuperação)	51
4.1.3 Precisão	52
4.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	53
4.2 QUANTIFICAÇÃO MICOTOXINA DON E FUNGICIDAS NA FTGI	54
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO GRÃO DE TRIGO	56
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA FTGI	57
4.4.1 Caracterização físico-química da FTGI	57
4.4.2 Teor de Glúten	58
4.4.3 Avaliação da cor.....	59
4.6 ANÁLISES REOLÓGICAS DA FTGI.....	60
4.6.1 Farinografia.....	60
4.6.2 Propriedades de pasta.....	62
5 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	74
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

O trigo principal cultural do período outono- inverno- primavera e muito utilizado na indústria de alimentos devido suas propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais. Na lavoura pode ocorrer a contaminação dos grãos por fungos resultando em decréscimo da qualidade comercial o que prejudica tanto o produtor quanto a indústria de alimentos.

Os principais fungos que atacam o grão de trigo são do gênero *Fusarium*, o qual provoca doenças como giberela levando diretamente a perdas de produtividade e qualidade do produto final. Além dos danos causados pela giberela o trigo pode apresentar contaminação pela micotoxina desoxinivalenol (DON), que se desenvolve através do metabolismo secundário do fungo *Fusarium*, sendo considerada tóxica para humanos e animais (DOMINGUES et al., 2007). Para reduzir esses problemas são utilizados fungicidas, no entanto, estes podem permanecer nos grãos e nos derivados, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores (TIBOLA et al., 2013). Os problemas causados pela exposição a estes resíduos e contaminantes estão relacionadas com efeitos carcinogênicos, mutagênicos, comprometimento do sistema imunológico dentre outras doenças que podem variar de acordo com idade, sexo e forma de exposição. Visando garantir que os produtos consumidos pela população estejam dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira a realização de análises em laboratórios que possuam equipamentos e condições adequadas pode assegurar a qualidade tecnológica da farinha de trigo a partir de possível contaminação por micotoxinas e resíduos de fungicidas, atentando também para a importância do plantio sob condições adequadas e de constante monitoramento.

Alguns métodos analíticos têm se destacado na determinação e quantificação de micotoxinas e agrotóxicos devido as suas características como alta sensibilidade e baixos limites de detecção, como a extração pelo método de preparo de amostra QuEChERS seguido da quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial. A realização de testes físico-químicos, bem como análises reológicas na farinha de trigo pode auxiliar na avaliação da qualidade tecnológica da farinha diante da possível contaminação por resíduos e contaminantes.

Desta forma, o presente estudo visa avaliar a incidência da micotoxina desoxinivalenol no trigo submetido a aplicação de fungicidas e a qualidade tecnológica deste produto. Para este fim, o trabalho contou com os objetivos específicos:

- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação da micotoxina DON em grãos de trigo;

- Desenvolver e validar metodologia analítica para determinação de resíduos dos fungicidas, carbendazim, tebuconazol, piraclostrobina, metconazol em grãos de trigo;
- Avaliar a eficácia dos fungicidas e a ocorrência da micotoxina DON em grão de trigo;
- Avaliar o efeito da contaminação da micotoxina DON sobre a qualidade tecnológica da farinha integral;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRIGO

O trigo é a principal cultura produzida no período outono-inverno-primavera, sendo que a produção se concentra na região Sul, respondendo em média por 90% da produção brasileira.

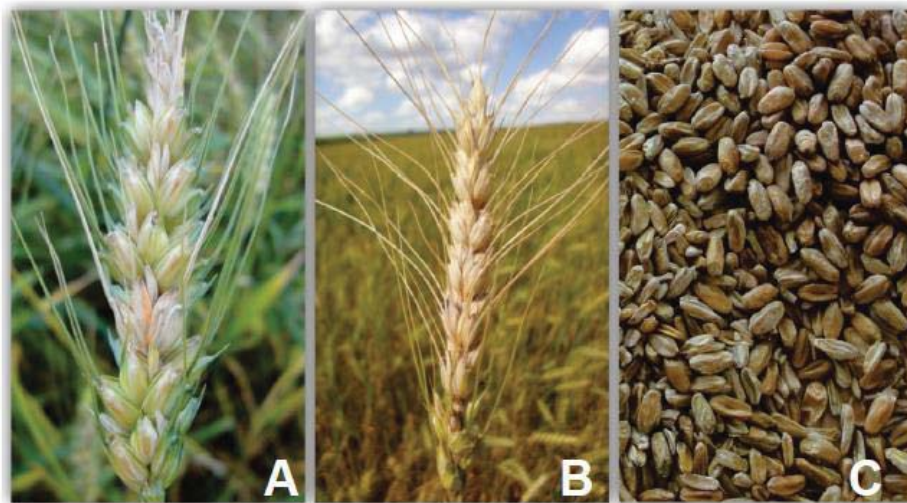
Este importante grão é matéria-prima para a elaboração de alimentos consumidos diariamente, como hábito alimentar, na forma de pães, biscoitos, bolos e massas, alimentos que fazem parte da base da pirâmide alimentar (SCHEURER et al., 2011).

Durante seu ciclo na lavoura o trigo pode ser contaminado por diversas doenças, que são desencadeadas em função das condições climáticas e susceptibilidade das cultivares. A giberela é uma doença que ocorre com frequência neste grão, causada pelos fungos do gênero *Fusarium*. Estes fungos estão entre os patógenos mais destrutivos de cereais em todo o mundo sendo que mais de uma espécie é frequentemente encontrada em uma única safra. Várias espécies deste gênero são agentes infecciosos, conhecidos por causar uma série de doenças em cereais, como infecções da raiz, caule e espiga (SHOLTEN, et al., 2002).

Segundo Rodrigues e Malinarich (2010) o desenvolvimento do *Fusarium* ocorre em cereais com índices de umidade que variam de 22% a 30% e, a contaminação pode ocorrer em temperaturas que variam de 0 °C a 35 °C e umidade relativa entre 60% a 90%. Os fungos produzem toxinas contaminantes com temperaturas entre 8 °C e 15 °C e umidade relativa acima de 80%.

A giberela é uma das doenças mais severas na cultura do trigo devido à escassez de métodos eficientes para o seu controle. Fato este, que preocupa a produção brasileira devido sua alta severidade nas principais regiões tritícolas, causando danos na produtividade e qualidade dos grãos. As epidemias mais graves foram observadas em anos com maior frequência de chuvas, durante as fases de florescimento até a fase de maturação dos grãos. O trigo infectado é visivelmente identificado apresentando, espiguetas descoloridas, camada de esporos do fungo com coloração rosada, grãos chochos, esbranquiçados, e baixo peso específico, como mostra a (Figura 1) (DEL PONTE, FERNANDES, PIEROBOM, 2004). Estes danos que incluem a redução no teor de proteínas nos grãos, redução do poder germinativo e vigor das sementes, além da contaminação com toxinas sintetizadas pelo fungo (WOLF-HALL, 2007), que além de desvalorizar o grão junto ao mercado, também os tornam impróprios para o consumo por colocarem em risco a saúde humana (CALVO, 2005).

Figura 1: Giberela do trigo; A: sinais do patógeno no terço inferior da espiga; B: espiga com severidade da doença de 80%, C: grãos danificados pela presença da giberela na espiga.



Fonte: TIBOLA et al. (2013).

2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de fungos, ou seja, metabólitos não essenciais para o funcionamento normal das células. São, em geral, compostos de baixo peso molecular, tóxicos tanto para animais quanto para seres humanos (BENNETT e KLICH, 2003; GEORGIANNA e PAYNE, 2009). O efeito tóxico geralmente afeta os sistemas nervoso, endócrino e imunológico, atacando também os rins e o fígado. No entanto, o efeito tóxico que as micotoxinas têm sobre cada indivíduo é variável, em função da dose e da forma de exposição (cutânea, oral ou por inalação), da idade e sexo. Como as micotoxinas comprometem o sistema imunológico, o indivíduo fica propenso a infecções bacterianas. Além disso, as micotoxinas estão relacionadas com efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (BENNETT e KLICH, 2003).

Para os fungos desenvolverem-se e produzirem micotoxinas em alimentos, são necessárias condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento (MAZIERO, BERSOT, et al., 2010). A produção de micotoxinas e o crescimento fúngico podem não ter relação direta, pois nem sempre as condições ótimas para o crescimento fúngico são as mesmas para a produção das micotoxinas. Portanto, as micotoxinas podem ser produzidas em qualquer época do cultivo, da colheita ou do armazenamento. Estes metabólitos podem estar presentes nos alimentos mesmo que não haja mais a presença dos fungos produtores (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Segundo Pereira (2008), as micotoxinas podem ser caracterizadas como um problema global, pois resultam em perdas econômicas e humanas significativas: é um desafio garantir

produtividade e biossegurança. Alimento seguro significa saúde e qualidade de vida. A garantia de alimento livre de contaminantes é essencial para prevenção de doenças, principalmente num país como o Brasil, onde parte considerável da população enfrenta sérios problemas de carência nutricional e de acesso ao sistema público de saúde (MIRANDA; MORI; LORINI, 2005).

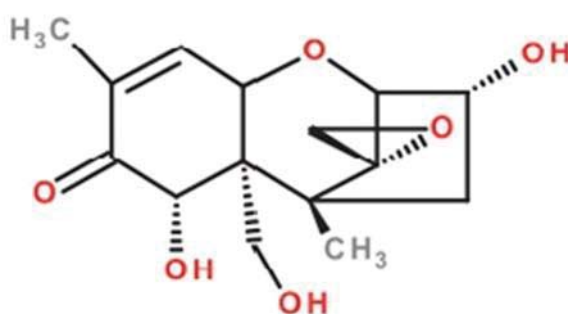
Dentre as micotoxinas produzidas a DON é a de maior relevância na cultura do trigo por ser amplamente distribuída e poder ser encontrada em altos níveis de concentração (GUTERRES, 2013).

2.2.1 Desoxinivalenol

A micotoxina DON ($C_{15}H_{20}O_6$, MM = 296,1260g mol⁻¹) foi descoberta no Japão, a partir da cevada contaminada no campo por *Fusarium* spp e nos Estados Unidos com milho infectado por espécie de *Fusarium* (LAMARDO, 2004). Também é conhecida como vomitoxina em virtude de desencadear crises de vômitos, sobretudo quando consumida por suínos. Possui grande importância toxicológica e é produzida sob baixas temperaturas e alta umidade, tendo grande incidência em cereais de inverno, como trigo e em seus subprodutos de consumo humano (MALLMANN et al., 2003).

Estruturalmente (figura 2), é um composto orgânico polar que pertence à classe dos tricotecenos do Tipo B. Sua molécula contém três grupos hidroxilas livres (-OH), que estão associados com a sua toxicidade (BONNET, 2012).

Figura 2: Estrutura química da micotoxina desoxinivalenol



Fonte: Segurança alimentar, bromatologia e microbiologia dos alimentos.

Uma das propriedades físico-químicas mais importantes da micotoxina é a sua capacidade de resistir a altas temperaturas, o que aumenta os riscos da sua ocorrência em alimentos. Essa micotoxina é muito estável em condições de temperatura dentro do intervalo de 170 °C a 350 °C. Também não é observada sua redução durante a fritura de alimentos em

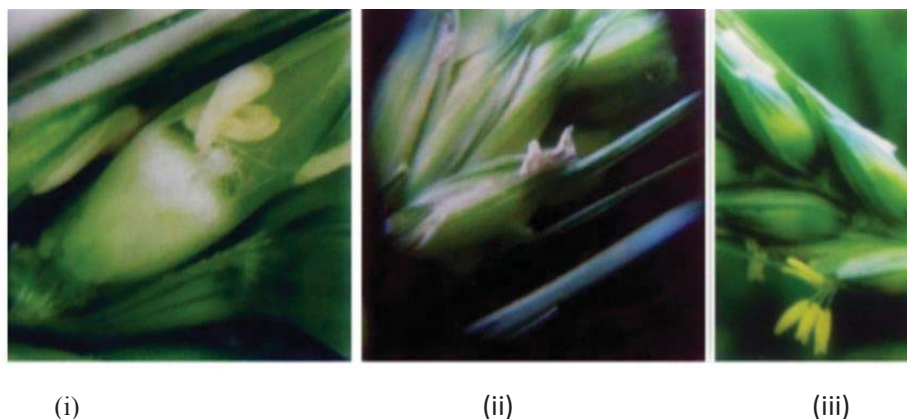
óleo. No entanto, os níveis de DON são reduzidos em massa cozida e macarrão em razão de sua lixiviação para a água de cozimento devido a sua hidrossolubilidade (SOBROVA et al., 2010).

Devido a sua estabilidade a altas temperaturas apresenta alto risco de permanência em alimentos processados (DÖLL e DÄNICKE, 2011), como bebidas, farinhas, produtos de panificação em geral, cereais matinais e alimentos infantis (CREPPY, 2002).

2.3 FUNGICIDAS

Os fungicidas que controlam a giberela são aplicados normalmente na fase de floração da cultura do trigo devido as anteras extrusadas serem locais de infecção primária (Figura 3), embora a vulnerabilidade da infecção pode se estender desde a floração até o enchimento de grão dependendo da cultivar em estudo (SPOLTI et al., 2013).

Figura 3: (i) anteras inclusas; (ii) anteras parcialmente exclusas ou presas; e (iii) anteras totalmente exclusas



Fonte: Reis e Casa Tonin (2011).

As boas práticas agrícolas certamente ajudam a reduzir o risco de epidemias associadas a *Fusarium*, porém a aplicação de fungicidas permanece como a medida mais importante para reduzir os sintomas (AUDENAERT et al., 2009).

2.3.1 Classe química dos fungicidas

A classificação química está relacionada com o modo de ação dos fungicidas. Na classe de fungicidas curativos estão os triazóis, estrobirulinas, benzimidazóis e ditiocarbamatos. Esses

estão classificados como curativos devido os produtos serem absorvidos pelos tecidos vegetais com ação no interior dos mesmos em que se encontra o patógeno (ERLEI, 2016).

A classe dos azóis ou triazóis, são os fungicidas mais utilizados, são penetrantes móveis e apresentam ação protetora. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da biossíntese do ergosterol um importante componente da membrana celular do fungo (ERLEI, 2016). Alguns dos fungicidas desta classe são metconazol e tebuconazol, fungicidas aprovados para aplicação em trigo (ANVISA 2016). A classe das estrobilurinas são em muitos casos são misturados com fungicidas da classe dos triazóis devido a estes não serem recomendados para o controle da giberela. Alguns estudos demonstram que as estrobilurinas podem estar associadas com níveis elevados de DON em cereais. O mecanismo de ação destes fungicidas ocorre com a inibição da respiração mitocondrial dos fungos (ERLEI, 2016), dentre as estrobilurinas a piraclostrobina, fungicida aprovado para aplicação em trigo (ANVISA, 2016). Os ditiocarbamatos são classificados como multissítio, causando uma desorganização do processo enzimático inibindo ou interferindo nos processos bioquímicos do citoplasma e da mitocôndria do fungo (ERLEI, 2016), dentre os ditiocarbamatos o mancozebe, aprovado para aplicação em trigo (ANVISA, 2016). Os fungicidas da classe dos benzimidazóis possuem ação sistêmica com ação protetora e curativa. É absorvido pela raiz e tecidos verdes (ANVISA, 2006a). Nesta classe de fungicidas o carbendazim e também é aprovado para aplicação em trigo (ANVISA 2016).

2.4 QUALIDADE TECNOLÓGICA DA FARINHA DE TRIGO INTEGRAL

A farinha de trigo integral por ser um produto do beneficiamento da matéria-prima alimentar em estado bruto, é considerada um produto alimentício passível de sofrer alterações na sua qualidade nutricional e tecnológica. As diferenças de peso hectolitro, força geral do glúten, tempo de mistura, estabilidade da massa, porcentagem de mistura de grãos danificados, além do teor/quantidade de micotoxinas e presença de resíduos de agrotóxicos (GUTKOSKI, NETO, 2002), podem determinar a qualidade tecnológica do produto final.

Na cultura do trigo, os maiores índices de contaminação são causados no campo pelos fungos do gênero *Fusarium* spp, que prejudica o transporte de nutrientes dentro da planta das raízes para os grãos em desenvolvimento o que leva a formação de grãos esbranquiçados e de baixo específico. Grãos de trigo gravemente infectados por *Fusarium* podem sofrer danos no teor de proteína principalmente as de reserva (gliadinas e gluteninas) decorrente da digestão enzimática da proteína de trigo por enzimas fúngicas (WANG et. al., 2005). A micotoxina DON metabolito secundário do patógeno é principalmente encontrada nos pericarpos de grãos de

trigo e difunde gradualmente ao núcleo dos grãos (HÄLLER GÄRTNER et al., 2005). Portanto, a farinha é geralmente menos contaminada com DON do que o farelo (CHELI et al., 2013), evidenciando a importância de estudos de qualidade tecnológica em farinha de trigo integral que segundo a *American Association of Cereal Chemists* (AACC) definiu a mesma como sendo preparada a partir de todas as proporções do grão (farelo de trigo, germe e endosperma) permaneçam inalteradas.

Alguns trabalhos avaliaram a qualidade tecnológica e o cozimento da farinha de trigo integral contaminada com altas concentrações de *Fusarium* e DON. Os resultados apresentaram uma pequena diminuição nos teores de proteínas e de glúten, as propriedades reológicas e de panificação não foram alteradas, assim como, a estabilidade da massa e não houve redução das propriedades de cozimento (ANTES et. al., 2001, PRANGE et. al., 2005).

2.5 LEGISLAÇÃO

A legislação sobre alimentos serve para proteger a saúde dos consumidores e os interesses econômicos dos produtores de alimentos. Devido aos riscos para saúde, organizações nacionais e internacionais estabeleceram limites máximos de micotoxinas em alimentos a fim de garantir a segurança (GONZÁLEZ; VIDAL; FRENICH, 2010).

No Brasil foi implementada nova legislação específica para grãos e farinhas, a qual determina o limite máximo tolerável (LMT) de DON para farinha de trigo integral. Os limites, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estão publicados na resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011). A resolução nº 59 da ANVISA prorrogou de janeiro de 2016 para janeiro de 2017 alterações nos LMT e que estão vigentes atualmente para o trigo, milho, arroz, cevada e seus derivados (BRASIL, 2013).

Os LMT (Tabela 1) dos fungicidas metconazol, tebuconazol, piraclostrobina, mancozebe, carbendazim para a cultura de trigo são estabelecidos pela ANVISA. A União Europeia estabelece os limites máximos toleráveis de micotoxinas para cereais no regulamento nº 1881 de 2006 e os limites de resíduos de fungicidas no regulamento nº 396 de 2005 (Tabela 1).

O cumprimento dos LMT para comercialização dos produtos torna o controle de resíduos e contaminantes um fator indispensável. Atualmente vários métodos analíticos validados podem ser utilizados como forma de assegurar que estes limites estão sendo respeitados.

Tabela 1 - Limites máximos toleráveis estabelecidos para o Brasil (ANVISA) e para a União Europeia (European Union Commission Regulation) para micotoxina DON em farinha de trigo integral e algumas moléculas de fungicidas.

Desoxinivalenol e fungicidas	Legislação	
	Brasil	União Europeia
DON	1250 $\mu\text{g kg}^{-1}$	1750 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Metconazol	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	150 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Tebuconazol	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	300 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Piraclostrobina	500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	200 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Mancozebe	1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de CS ₂	1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de CS ₂
Carbendazim	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Fonte: ANVISA (2017) e União Europeia (2006).

2.6 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS E FUNGICIDAS

O desenvolvimento de métodos analíticos para análise de micotoxinas e fungicidas não é uma tarefa simples. Exigem baixos limites de detecção, alta sensibilidade e a necessidade de laboratórios especializados, criando assim desafios para estas análises.

Os fatores como precisão e exatidão para procedimentos analíticos são imprescindíveis e são caracterizados por três critérios práticos: (a) a velocidade com que a análise pode ser realizada, (b) o nível de habilidade técnica necessária para efetuar o ensaio, e (c) se o ensaio proporciona um resultado qualitativo ou quantitativo (TIBOLA et al., 2013). Ademais, é importante ser capaz de detectar e quantificar pequenas concentrações para que se atendam as normatizações da legislação.

A determinação com precisão da concentração de micotoxinas em um lote de grande volume se torna difícil devido à variabilidade associada em todos os procedimentos desde a amostragem até a determinação instrumental (RICHARD, 2007). Porém, é imprescindível que os resultados obtidos estejam em conformidade. Resultados falsos positivos podem acarretar na rejeição desnecessária do produto, gerando prejuízos econômicos. Por outro lado, lotes com concentrações acima dos limites estabelecidos podem ser aceitos como lotes com qualidade, podendo levar a aceitação de um produto com baixa qualidade que poderá causar danos à saúde do consumidor (WHITAKER et al., 2010).

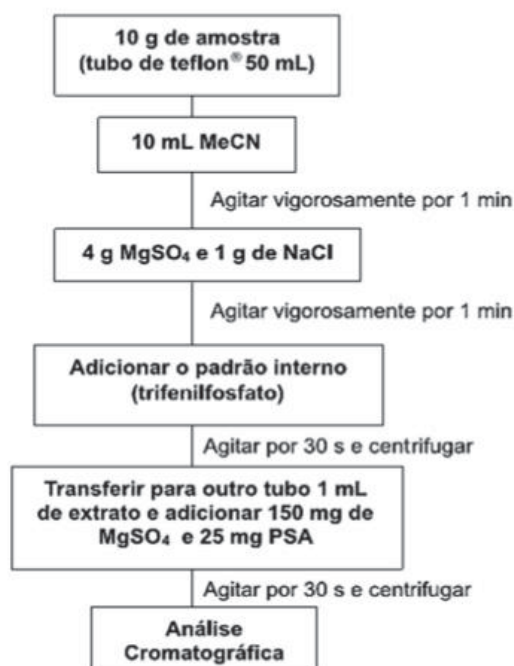
As técnicas de extração tais como: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EPS), extração sólido-líquido (ELS), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), extração líquido pressurizado (PLE), micro-extração em fase sólida, polímeros molecularmente

gravados (MIPs) e QuEChERS têm sido empregadas para a extração de micotoxinas e fungicidas em alimentos (PEREIRA, 2014).

2.6.1 Método QuEChERS

O método que está sendo amplamente utilizado para a análise de micotoxinas, por promover rápida extração e purificação, é o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, Safe*) é a sigla em inglês que traduzida significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (Figura 4). Vários autores utilizaram este método para diferentes matrizes, como arroz natural e parabolizado extraído de forma simultânea DON e zearalenona (ZEA) (HEIDTMANN-BENVENNUTTI et al., 2012); manteiga de gergelim extraído 26 micotoxinas de forma simultânea (LIU et. al., 2014); bebidas à base de aveia, soja e arroz determinando simultaneamente 11 micotoxinas (ABELLA-MIRÓ et. al., 2017).

Figura 4: Fluxograma do procedimento de preparo de amostras utilizando QuEChERS original.



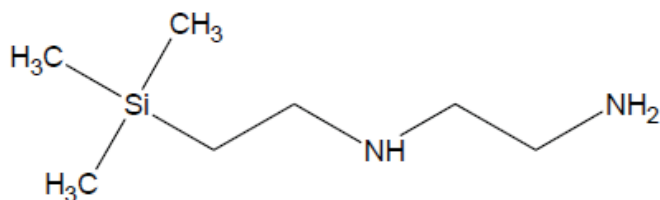
A técnica de preparo de amostra QuEChERS para extração de resíduos de pesticidas e contaminantes tem como objetivo atender os rigorosos LMT estabelecidos por legislações internacionais (ANASTASSIADES; LEHOTAY et al., 2003). O método de extração foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massas em Série (GC-MS/MS e LC-MS/MS) (ZANELLA; ADAIME; PRESTES, 2011). O princípio fundamental do método é a partição do analito entre a acetonitrila e a água, induzida pela adição de sais inorgânicos.

Enquanto que os analitos são transferidos para uma fase orgânica, as impurezas mais polares da matriz são deixadas na camada aquosa (ANASTASSIADES; LEHOTAY et al., 2003).

Adição de sais no método QuEChERS é realizada afim de promover o efeito *salting out* que, dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição, obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares. Utilizando a acetonitrila para a extração, a adição de sais é muito conveniente uma vez que o processo de extração se torna rápido, fácil e apresenta baixo custo, além de se ter como vantagem a não diluição do extrato da amostra e proporcionar a separação das fases orgânica e aquosa (ZANELLA; ADAIME; PRESTES, 2011).

A etapa de limpeza do método é primordial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. O sorvente PSA (do inglês, *primary secondary amine*) (Figura 5) retém as interferências da matriz. Essa remoção pode ocorrer por ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo estabelecidas entre a PSA e os interferentes da matriz (ANASTASSIADES e LEHOTAY, 2003). Esta etapa de limpeza garante uma maior vida útil para insertores e colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico e minimizando o efeito matriz (ZANELLA; ADAIME; PRESTES, 2011).

Figura 5: Estrutura química do PSA



Fonte: Luz (2016)

2.6.2 Determinação instrumental

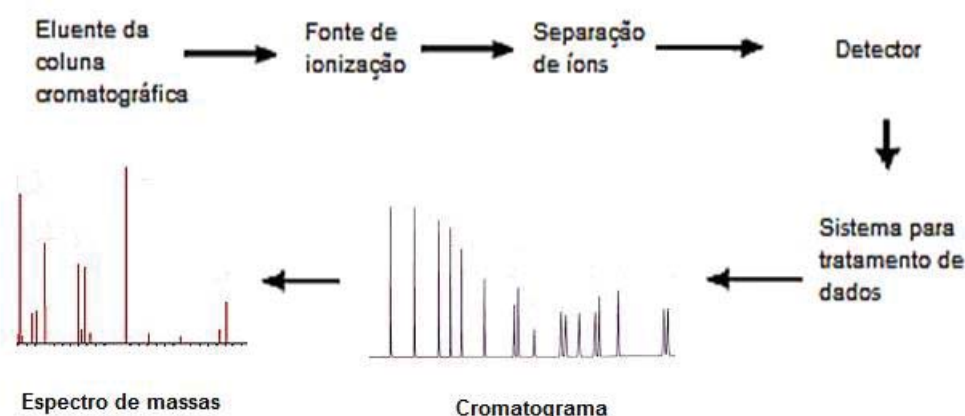
O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de micotoxinas e agrotóxicos em diferentes matrizes vem crescendo. A cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) tem sido a técnica analítica mais utilizada para determinação simultânea de resíduos e contaminantes, considerando seu bom desempenho em termos de exatidão, precisão, sensibilidade e reprodutibilidade (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009). Quando acoplado esta técnica cromatográfica a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) se potencializa a qualidade dos resultados tendo em vista a possibilidade

de informação estrutural e massa molar, com aumento de seletividade (CHIARADIA, 2008; DONATO et al., 2012).

Existem vários exemplos de quantificação simultânea de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos por LC-MS, por exemplo, a quantificação de 117 pesticidas e 30 micotoxinas em café cru (REICHERT et. al., 2018), análise de mais de 90 compostos, incluindo pesticidas, biopesticidas e micotoxinas em produtos orgânicos (GONZÁLEZ et. al., 2011)

Na espectrometria de massas os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte, e a razão massas-carga (m/z) de cada íon é determinada pelo analisador de massas. Os íons atingem o detector gerando sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas. O esquema da espectrometria de massas, a partir da separação cromatográfica está apresentado na Figura 6. A partir do valor de m/z de um íon consegue-se estimar ou obter o valor exato da massa nominal da molécula correspondente.

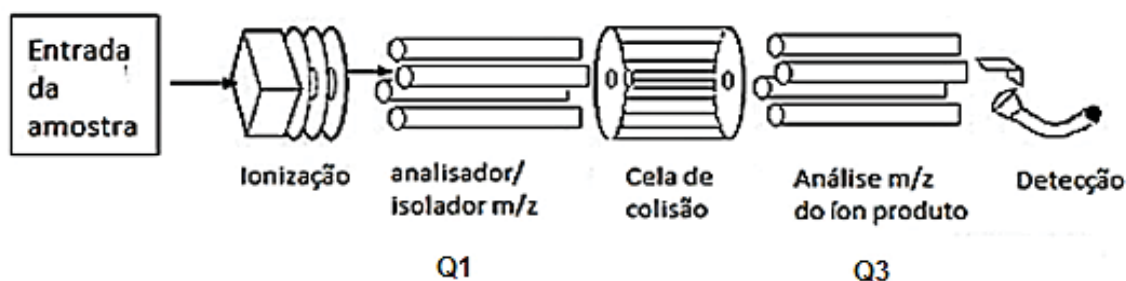
Figura 6 - Esquema de uma análise por MS após a separação cromatográfica



Fonte: Friedrich (2014)

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ) é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo, que pode ser também um hexapolo ou octapolo, não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo. A fragmentação ocorre geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*) A cela de colisão também é empregada como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Os quadrupolos Q1 e Q3 são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A Figura 7 apresenta o esquema de um analisador de massa tipo triplo quadrupolo.

Figura 7: Esquema de um analisador de massas tipo triplo quadrupolo



Fonte: Adaptado de <http://www.espectrometriademassas.com.br>

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método analítico é uma avaliação que garante que as informações geradas por um método analítico possuam rastreabilidade, confiabilidade, comparabilidade e que gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra a que se refere (BRASIL, 2011). No processo de validação deve-se levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (SANCO, 2013).

Todas as diferentes etapas do procedimento analítico para a validação do método, devem considerar em geral a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas: procedimento de amostragem, preparo de amostra, análise cromatográfica, detecção e avaliação estatística dos dados (SANCO, 2013).

No planejamento e execução da validação devem ser consideradas as seguintes informações (BRASIL, 2011): identificação adequada do objetivo e escopo do método,

descrição do item a ser ensaiado, definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação, definir os experimentos de validação, definir o aparato e equipamentos, incluindo os requisitos de desempenho técnico condições, padrões de referência, materiais de referência e condições ambientais, ajustar parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário, executar experimentos completos de validação, definir critérios de reavaliação (mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade, etc).

Os parâmetros avaliados no método são linearidade e curva analítica, exatidão, precisão, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação.

2.7.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade dos métodos analíticos quantitativos é a capacidade de o método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009).

O INMETRO no documento DOC-CGCRE 008 rev 05 de 2016, recomenda a curva analítica com no mínimo, cinco níveis de concentração, assim como a União Europeia (BRASIL, 2016, DIRECTIVE 657, 2002).

É necessário verificar no processo de validação até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação (1) da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx \quad (1)$$

sendo: y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Devem ser mencionados os intervalos de aceitação dos parâmetros da curva, como por exemplo $R^2 > 0,99$ ou $r > 0,9$. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (b).

Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função que modela a concentração do analito na amostra (BRASIL, 2011).

Possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental é denominada efeito matriz (BRASIL, 2011). O efeito matriz pode gerar uma elevada recuperação ($> 120\%$) quando comparada com a determinação do padrão em solvente. Pode-se verificar também uma resposta mais baixa na matriz do que no solvente em função de diferentes problemas como, distorção de pico (incluindo a ampliação e da cauda) ou a degradação térmica que conduz a picos de menor intensidade e, por vezes, o aparecimento de outros picos (RAHMAN et. al., 2013).

2.7.1.1 Avaliação da normalidade

A distribuição normal dos dados requer o uso de testes estatísticos. A estatística paramétrica é um dos melhores exemplos da importância de se assegurar a premissa da normalidade, que consiste usualmente na distribuição normal dos dados (RAZALI; WAH, 2011).

A avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos pode ser determinada utilizando vários testes como, Kolmogorov-Smirnof, Anderson Darling, Shapiro – Wilk (RAZALI; WAH, 2011).

O teste de Anderson – Darling tem a função de distribuição empírica amplamente usado para a hipótese de normalidade. A estatística do teste é apresentada na equação 2:

$$A = -n - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (2i - 1) \ln(p_{(i)}) + \ln(1 - p_{(n-i+1)})$$

(2)

Onde,

$$p_{(i)} = \Phi \left(X_{(i)} - \frac{\bar{X}}{S} \right) \quad (3)$$

Sendo que Φ é função distribuição acumulada da distribuição normal padrão, e \bar{X} (média) e S são a média e o desvio padrão dos valores. O p-valor também pode ser calculado pela estatística modificada de acordo com a equação 4 (RAZALI; WAH, 2011).

$$Z = A \left(1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{n^2} \right) \quad (4)$$

2.7.2 Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro de um mensurando. A exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro (ALBANO, RODRIGUEZ, 2009). A avaliação da exatidão de um método envolve ensaios com materiais de referência certificados e/ou materiais de referência e/ou amostras fortificadas e amostras brancas (INMETRO, 2011).

Os materiais de referência na área de alimentos são raros, em função das dificuldades de preparo e homogeneização das amostras como também a garantia da estabilidade durante o transporte e armazenamento. Segundo o INMETRO (2011), quando não há material de referência certificado disponível a utilização da amostra branca da matriz de interesse pode ser utilizada adicionando-se quantidade conhecidas do analito na forma de material puro ou de pureza conhecida para realizar ensaios de recuperação.

Relaciona-se com a exatidão o erro absoluto de uma medida que é geralmente dependente da concentração do analito devendo ser determinadas por um número diferente de concentrações (INMETRO, 2011).

2.7.3 Precisão

A precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos: quanto menor for a amplitude das medidas maior será a precisão. Esta medida reflete a tendência de

maior ou menor afastamento (erros) entre os resultados dos ensaios. (ALBANO, RODRIGUEZ, 2009). A precisão geralmente é geralmente dependente da concentração do analito. Pode ser expressa de diferentes maneiras dependendo das condições em que for calculada (BRASIL,2005).

A precisão também pode ser avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ) que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática calcula-se a estimativa do padrão do desvio padrão absoluto (s). Pode-se ainda utilizar o desvio padrão relativo (RSD do inglês *relative standard deviation*) ou coeficiente de variação (CV). A AOAC (2012) estabelece que a repetibilidade é aplicada para parâmetros calculados de replicatas analisadas simultaneamente. Representa a variabilidade dentro do laboratório e pode ser expressa em forma de desvio padrão, variância, coeficiente de variação e desvio padrão relativo.

Os valores da precisão do método podem ser melhorados aumentando o número de repetições da determinação. O guia ICH recomenda que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com amostras em triplicata, ou um mínimo de seis determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração (RIBEIRO et. al., 2008). O INMETRO recomenda que sejam realizadas sete a nove replicatas para o cálculo do RSD (INMETRO, 2011).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

2.7.4 Repetibilidade

A repetibilidade é definida como grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

Segundo a ANVISA (2005) a repetibilidade deve ser verificada a partir de um mínimo de nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste.

2.7.5 Precisão intermediária

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna ou reprodutibilidade intralaboratorial, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra,

amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições podem variar, tais como (ALBANO, RODRIGUEZ, 2009): diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes condições ambientais.

A ANVISA (2003) recomenda para a determinação da precisão intermediária um mínimo de dois dias diferentes. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do RSD.

2.7.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

2.7.6.1 Limite de detecção

O LD pode ser calculado através da comparação entre o sinal da amostra com baixa concentração do analito com o de um branco (matriz isenta do composto de interesse). A relação sinal ruído usualmente utilizada na proporção de 3:1. Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base (RIBEIRO et. al., 2008)

O limite de detecção do método (LD_m) é definido como a concentração mínima de uma substância medida, com 95% ou 99% de confiança que é maior que zero. O critério de sensibilidade mais utilizado equivale a concentração média do branco (contendo a matriz) acrescida três desvios padrão. Se for obtido um sinal na região de interesse inferior ao valor do limite de detecção, o resultado deve ser emitido como “ND”, ou seja, “ não detectado”. Neste caso, deve-se apresentar o valor do Limite de Detecção (ALBANO, RODRIGUEZ, 2009).

2.7.6.2 Limite de quantificação

O Limite de Quantificação (LQ, do inglês *Limit of Quantification*) do método analítico é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão, aceitáveis, sob determinadas condições experimentais (BARROS C. B.; 2002).

O LQ é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável ou Incerteza Máxima Aceitável (I_{max}). Para calcular o LOQ usando a Incerteza Máxima Aceitável, procede-se inicialmente ao cálculo da incerteza da medição analítica. Devem-se considerar as concentrações mais baixas do analito a partir do nível mais baixo calibrado até se encontrar a concentração que atinge a I_{max} (BRASIL, 2011).

Os métodos de determinação do limite de quantificação são semelhantes aos utilizados no limite de detecção. Quando se utiliza o método relação sinal-ruído deve-se considerar a

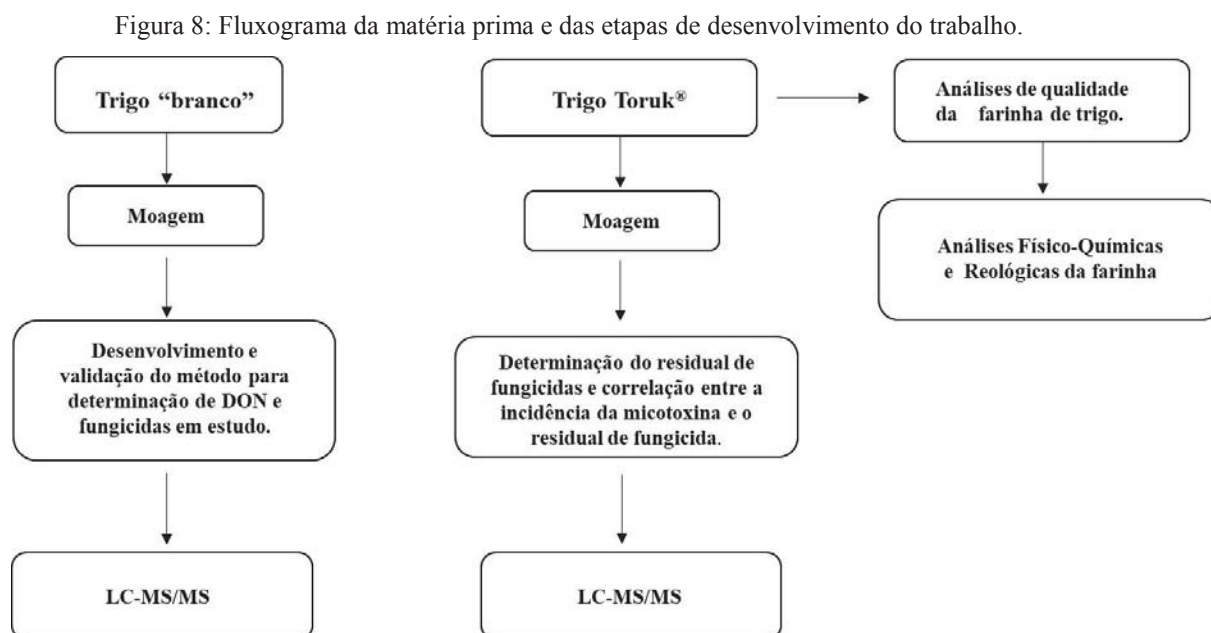
relação 10:1. Quando se utiliza o método da curva analítica também se utiliza a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e da curva analítica (S), conforme a equação (5) (RIBANI et. al., 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Cromatografia e de Cereais do Centro de Pesquisa em Alimentação da Universidade de Passo Fundo.

3.1 AMOSTRAS UTILIZADAS NO ESTUDO

A Figura 8 representa o fluxograma geral das atividades experimentais realizadas na pesquisa (trigo “branco” e amostras de trigo de campo) nas etapas de validação, quantificação e qualidade tecnológica do trigo.



Fonte: elaborado pelo autor (2018).

A validação do método para a quantificação dos teores de DON e princípios ativos de fungicidas em farinha integral foi realizada com o emprego de uma amostra de trigo com ausência de contaminantes e resíduos (trigo branco), fornecida por uma empresa local.

A determinação dos compostos foi realizada em amostras de trigo obtidas através de trabalho conjunto realizado por docentes e acadêmicos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo. O experimento de campo utilizou diferentes princípios ativos de fungicidas, irrigação artificial e foi conduzido na safra agrícola de 2016, em área experimental da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, cidade de Passo Fundo, RS, apresentado coordenadas geográficas 28°13'29,9" S, 52°23'06,1" O, em

altitude de 703 metros. O solo da área é classificado como latossolo vermelho distrófico húmico, da Unidade de Mapeamento Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul (STRECK et al., 2008). O clima é classificado como Cfa (subtropical úmido), de acordo com a classificação de Köppen (PEEL et al., 2007).

A semeadura de trigo foi realizada em 01 de julho de 2016, obedecendo ao calendário indicado pelo Zoneamento de Risco Agroclimático para o Município de Passo Fundo (MAPA, 2015), utilizando-se 350 sementes viáveis por metro quadrado, distribuídas mecanicamente por semeadora com linhas espaçadas em 0,17 m, sob semeadura direta, sobre preparo convencional do solo. Cada parcela mediu 1,2 m de largura x 5 m de comprimento, com área total e útil 6 m². A distribuição dos tratamentos nas parcelas seguiu o delineamento em blocos casualizados com 4 repetições. As parcelas foram irrigadas durante todo o florescimento da cultura (20 dias), com sistema de formação de neblina sob as espigas. A irrigação foi iniciada quando o trigo atingiu o estágio 10.5 (espigas emergidas da bainha) até o estágio 11.1 (grãos em estágio leitoso) (LARGE, 1954). Além disso, foram depositados grãos de trigo contendo peritécios do fungo *Gibberella zeae* inoculados artificialmente (LIMA, 2007) na quantidade de 7 g.m² por parcela no estágio 10.1 (primeiras espigas visíveis).

Os tratamentos para o controle de giberela foram aplicados nos dias 01 de outubro de 2016 e 08 de outubro de 2016 (Tabela 2). Nas aplicações, as plantas de trigo estavam nos estádios 10.5.1 (início do florescimento) e 10.5.2 (florescimento até o topo da espiga), respectivamente, de acordo com a escala de Feekes & Large (LARGE, 1954). Os fungicidas foram aplicados com pulverizador costal pressurizado com CO₂, equipado com uma barra provida de três bicos com ponta TTJ60 110 02 jatos plano duplo 30° para frente e 30° para trás, sob volume de calda de 150 L ha⁻¹, na pressão de trabalho de 3.5 bar, formando gotas médias.

A determinação de DON e dos princípios ativos de fungicidas foi realizada em amostras de experimento de campo realizado com 12 tratamentos e 3 blocos, em replicatas (Tabela 2). O trigo utilizado no experimento de campo foi o da cultivar TBIO Toruk[®] (trigo pão) e moderadamente suscetível a giberela.

Tabela 2 - Aplicação sequencial de fungicidas em trigo da cultivar TBIO Toruk®

T	Primeira Aplicação		Segunda Aplicação	
1	Testemunha		Testemunha	
2	Testemunha com controle de doenças foliares		Testemunha com controle de doenças foliares	
3	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol **
4	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Solist 430 SC 350 mL/ha*	Carbendazin + Tebuconazol **	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Solist 430 SC 350 mL/ha*	Carbendazin + Tebuconazol**
5	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Solist 430 SC 350 mL/ha*	Carbendazin + Tebuconazol**
6	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Solist 430 SC 350 mL/ha*	Carbendazin + Tebuconazol**	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol**
7	Solist 430 SC 350 mL/ha* Unizeb Gold 1,5 kg/ha*	Tebuconazol+ Mancozebe**	Solist 430 SC 350 mL/ha* Unizeb Gold 1,5 kg/ha*	Tebuconazol+ Mancozebe**
8	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol**	Solist 430 SC 350 mL/ha*	Tebuconazol+ Mancozebe**
9	Solist 430 SC 350 mL/ha* Unizeb Gold 1,5 kg/ha	Tebuconazol+ Mancozebe**	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol**
10	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Unizeb Gold 1,5 kg/ha	Carbendazin+ Mancozebe**	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Unizeb Gold 1,5 kg/ha	Carbendazin+ Mancozebe**
11	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol**	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Unizeb Gold 1,5 kg/ha	Carbendazin+ Mancozebe**
12	Carbomax 500 SC 600 mL/ha Unizeb Gold 1,5 kg/ha	Carbendazin+ Mancozebe	Opera Ultra 750 mL/ha*	Piraclostrobina + Metconazol**

*Nome Comercial

**Princípio Ativo

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

3.1.1 Micotoxina e fungicidas estudados

Os padrões dos compostos estudados foram adquiridos da companhia Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha) e utilizado para a micotoxina DON o da marca Sigma-Aldrich (CAS NUMBER: 51-481-10-8). Para os fungicidas Piraclostrobina foi utilizado o da marca Sigma-Aldrich (CAS NUMBER: 175013-18-0), Carbendazim, marca Aksci (CAS NUMBER: 10605-21-7), Metconazole e Tebuconazol, da marca Trc Canada (CAS NUMBER:228440).

3.1.2 Materiais Utilizados

Os materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram: Filtros de nylon de 13 mm de diâmetro e 0,2 µm de tamanho de poro (Vertical Chromatography, Tailândia); Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL; ponteiras de polipropileno com capacidade de 200 µL e 1 mL (Brand, Alemanha); Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha); Frascos de vidro com tampas rosqueadas, capacidade de 10 e 15 mL; Vidrarias de laboratório em geral.

3.1.3 Solventes, reagentes e gases

Os solventes reagentes e gases utilizados neste trabalho: acetato de sódio anidro p.a. (Química Moderna, Brasil); Acetato de amônio (Vetec, Brasil); acetonitrila grau HPLC (Merck, Brasil); ácido acético glacial 99,9% (Anidrol, Brasil); água ultrapura, purificada em sistema Milli - Q[®] (resistividade de 18,2 mΩ cm⁻¹) (Millipore, EUA), detergente Detertec[®] neutro (Vetec, Brasil), gás argônio usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS com 99,9999% de pureza (Air Products, Brasil), metanol grau HPLC (J.T Baker, EUA); sorvente Bondesil C18 com tamanho de partícula 40 µm, (Agilent, EUA); sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA).

3.1.4 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram: cromatógrafo sistema LC-MS/MS equipado com cromatógrafo líquido LC 8040, amostrador Nexera, analisador de massas tipo triplo quadrupolo (Shimadzu, Japão), balança Analítica de precisão, modelo AUX-220 (Shimadzu, Japão), centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Nova técnica, Brasil), sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA).

O desenvolvimento do método e a análise da micotoxina DON e dos fungicidas estudados em amostras de farinha de trigo de grão inteiro foi realizado no sistema LC-MS/MS utilizando cromatografia em fase reversa utilizando coluna analítica XR-ODS III (150 x 2,0 mm x 2,0 µm), marca Shimadzu, fase móvel utilizada teve como referência o pacote de método do fornecedor LC/MS/MS *Method Package* e constituída de: Fase móvel A: acetato de amônio

5 mmol L⁻¹ e B: metanol com 5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio, no modo gradiente conforme, (Tabela 3).

Tabela 3 - Gradiente da fase móvel utilizado para a eluição dos compostos.

Tempo (min)	% A	% B
1,70	60	40
3,00	50	50
4,00	45	55
9,50	5	95
13,51	85	15
15,00	85	15

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Vazão da fase móvel: 0,3 mL min⁻¹; Volume de injeção: 10 µL; Fonte de ionização: ESI; Analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, operando no modo MS/MS; Tempo da análise cromatográfica: 15 min; Temperatura da coluna: 40 °C; Voltagem capilar: 4,5 kV; Temperatura de dessolvatação: 400 °C; Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹; Vazão do spray: 80 L h⁻¹; Vazão do gás de colisão (Argônio): 0,10 mL min⁻¹; Temperatura da fonte: 150 °C. A espectrometria de massas em série foi utilizada para a operação do equipamento, no modo de varredura SRM e ionização por eletronebulização no modo positivo. Utilizou-se as condições do pacote de método LC-MS/MS *Method Package*, onde estão as condições cromatográficas tais como os íons precursores e íons produtos, as energias de colisão e as energias do cone. Para estas otimizações foi utilizada solução analítica na concentração de 250 µg L⁻¹. A partir destas injeções foram definidos os íons característicos de cada composto estudado, os quais foram monitorados no modo SRM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo (Q3) foi realizada a varredura do íon produto. O modo de ionização da fonte utilizado foi eletronebulização positiva, em função das características dos analitos, voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos. Em seguida, foram avaliadas as transições, no modo SRM a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior intensidade) e confirmação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados e estes dados foram inseridos no banco de dados LC-MS/MS *Method Package*. Posteriormente, realizou-se a análise de uma solução analítica contendo todos os agrotóxicos na concentração de 100 µg L⁻¹ preparada em acetonitrila, a fim de verificar o tempo de retenção dos analitos e a intensidade do sinal analítico.

A Tabela 4 apresenta a micotoxina e os fungicidas que foram analisados por LC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+) e modo de aquisição SRM. A tabela também mostra os tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas. Neste estudo foram selecionadas duas transições características para cada composto, sendo a transição mais intensa (mais estável) utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação da identidade dos mesmos.

Tabela 4 - Compostos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas dos compostos analisados por LC-MS/MS.

PRINCÍPIO ATIVO	t_R (min)	TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO			TRANSIÇÃO DE CONFIRMAÇÃO		
		ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA (eV)	ÍON PRECURSOR	ÍON PRODUTO	ENERGIA (eV)
Desoxinivaleol	3,3	279,1	149,1	15	279,1	57,2	12
Piraclostrobina	3,8	388,1	163,1	13	388,1	194,1	24
Tebuconazol	3,7	307,9	70,1	23	307,9	125,1	35
Carbendazin	2,9	191,9	160,1	18	191,9	64,95	46
Metconazol	4,1	320,1	124,8	25	320,1	70,1	6

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

3.1.5 Preparo das soluções analíticas

Preparou-se inicialmente as soluções analíticas na concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila, de cada princípio ativo, individualmente. Foi medida a massa de todos os reagentes sólidos, considerando seu grau de pureza. A partir das soluções de concentração 1000 mg L⁻¹, preparou-se 50 mL de uma solução de trabalho na concentração 5 mg L⁻¹ contendo todos os analitos. Esta solução foi utilizada para o estudo da linearidade do método e para os ensaios de fortificação. A partir da mistura 5,0 mg L⁻¹, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 200, 250, 350, 400, 500 e 600 µg L⁻¹ para a micotoxina DON e 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500 e 600 µg L⁻¹ para os fungicidas em estudo em acetonitrila:água (70:30) v/v e no extrato da matriz avaliada.

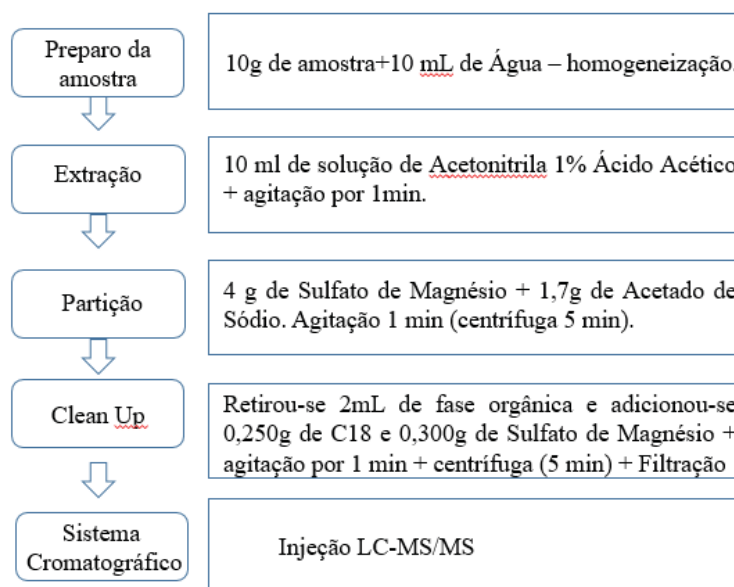
3.1.6 Preparo das amostras para determinação analítica

As amostras de trigo “branco” foram moídas em moinho Multi-Usos Tecnal TE-631-3 e armazenadas em freezer até o momento da utilização para validação do método analítico.

As amostras de campo passaram por processo de moagem, oriundas do mesmo tratamento em moinho Multi-Usado Tecnall TE-631-3 e armazenadas em freezer até o momento da utilização para as análises de quantificação da micotoxina DON e dos fungicidas estudados. Durante o processo de moagem das amostras realizou-se procedimento de limpeza no equipamento afim de se evitar contaminação das amostras com resíduos da anterior.

A Figura 9 apresenta as etapas de extração realizadas para validação do método e quantificação da micotoxina DON e fungicidas.

Figura 9: Fluxograma das etapas de extração utilizando método QuEChERS adaptado.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DA MICOTOXINA DON E FUNGICIDAS EM FARINHA DE TRIGO DE GRÃO INTEIRO

Para a validação do método analítico foram utilizados os seguintes parâmetros: linearidade e curva analítica, efeito matriz, limite de quantificação e limite de detecção, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão (INMETRO, 2016).

3.2.1 Curva analítica

A curva analítica foi preparada contendo a micotoxina DON e os fungicidas em estudo. As soluções para obtenção da curva analítica foram injetadas em triplicata nas concentrações

de 200, 250, 350, 400, 500 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a micotoxina DON e 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os fungicidas. Posteriormente foi realizado o cálculo da média das áreas e a avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos foi determinada utilizando o teste de Anderson-Darling. Para estimar os parâmetros da regressão foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários e gráficos de resíduos (erros) da regressão que foram construídos e analisados para investigar se os dados demonstraram homocedasticidade ou desvio de linearidade.

3.2.2 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Para avaliar a exatidão foram realizadas fortificações com a mistura de fungicidas estudados nas concentrações de 50, 200 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para a DON nas concentrações 200, 400 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ na etapa de preparo de amostra. Os ensaios de fortificação foram realizados utilizando a amostra de trigo “branco”. O procedimento de extrações fortificadas foi realizado em triplicata para cada um dos níveis de fortificação.

3.2.3 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Os resultados obtidos foram inicialmente avaliados utilizando o teste de Grubbs a fim de verificar a presença de valores extremos (GRUBBS, 1969; BURKE, 2001). Foi utilizado o teste para um valor extremo (G_1) ou dois valores extremos (G_2). A indicação de valor extremo por um dos testes foi suficiente para remoção do dado. O teste de Grubbs foi aplicado até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

Para avaliar a precisão do método em termos de repetibilidade foram realizadas 8 extrações da amostra de trigo “branco” que foram fortificadas com o padrão misto de fungicidas e DON na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ e injetadas em triplicata. Os resultados foram avaliados pela equação de HorRat, (WOOD, 1999) nas replicatas das amostras adicionadas em cada nível de concentração. Este parâmetro foi considerado adequado quando os valores foram menores que 2 (INMETRO, 2016).

A precisão intermediária do método foi avaliada realizando o procedimento analítico em 8 repetições na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ injetadas em triplicata, comparando os resultados entre dois diferentes analistas. Os dados foram estatisticamente avaliados utilizando teste t pareado para estes três níveis de fortificação e em quatro replicatas dos resultados das

recuperações. Foram considerados resultados significativamente iguais os valores que não apresentaram diferença estatística no nível de 5%.

3.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação, LQ_m , do método foi considerado como sendo a menor concentração que, fortificada na matriz, apresentar resultados de recuperação entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20%. A partir destes valores, o limite de detecção do método, LD_m , foi determinado como sendo a concentração 3,33 vezes menor que o LQ_m (SANCO, 2013).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO GRÃO INTEIRO

3.3.1 Peso hectolitro (PH)

A massa específica aparente dos grãos foi determinada de acordo com a metodologia descrita nas Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009), com três repetições em balança marca Dalle Molle. Os resultados foram expressos em $kg\ hL^{-1}$.

3.3.2 Teor de umidade

O teor de umidade do grão foi determinado em triplicata pelo analisador NIRS (FOSS Infratec 1241, Grain Analyzer).

3.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA INTEGRAL

As amostras dos ensaios conduzidos em campo foram submetidas a limpeza em equipamento de laboratório (Sintel, Intecnial, Brasil) e a moagem foi realizada em moinho de laboratório (3100, Perten Instruments, Suécia) para obtenção da FTGI.

3.4.1 Caracterização físico-química da FTGI

3.4.1.1 Teor de Umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada em triplicata de acordo o método nº 44-15.02 da AACC (2010), em estufa com circulação de ar a 130 °C por uma hora.

3.4.1.2 Teor de proteína da FTGI

O teor de proteína bruta foi determinado em triplicata analisador NIRS (DS 2500, FOSS, Dinamarca).

3.4.1.3 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado em triplicata, realizado de acordo com o método n° 08-12.01 da AACC (2010) e corresponde ao resíduo obtido por incineração em temperatura de 550 °C por 5 h.

3.4.1.4 Teor de glúten

O teor de glúten foi determinado em duplicata, realizado de acordo com o método n° 38-12.02 da AACC (2010), em Sistema Glutomatic (2100, Perten Instruments, Suécia), obtendo os valores de índice de glúten e glúten úmido. Para as farinhas integrais foi empregada peneira fina de poliéster usualmente utilizada neste método (de 88 μ m de abertura) durante 120 segundos, até que a massa fosse formada. Após este período, foi utilizada peneira de abertura maior (840 μ m) para que fosse possível a eliminação das camadas fibrosas das farinhas integrais durante o restante do período de lavagem.

3.4.1.5 Cor

As avaliações de cor das amostras foram realizadas em triplicata utilizando espectrofotômetro de refletância difusa (ColorQuest II, HunterLab, EUA), com sensor óptico geométrico de esfera para obtenção dos valores L* (luminosidade), que varia entre zero (preto) e 100 (branco) e das coordenadas de cromaticidade a*, que varia de -60 (verde) até +60 (vermelho), e b*, que varia entre -60 (azul) e +60 (amarelo) de cor.

3.4.2 Caracterização reológica da FTGI

3.4.2.1 Farinografia

As análises de propriedades de mistura foram realizadas em duplicata em equipamento Promilógrafo (T6-E, Koloman Egger, Áustria), de acordo com o método nº 54-21.02 da AACC (2010), utilizando 200 g de FTGI corrigida para a umidade de 14%. Os parâmetros avaliados foram absorção de água, tempo de desenvolvimento da massa, índice de tolerância à mistura e estabilidade da massa.

3.4.2.2 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta foram avaliadas em equipamento viscosímetro (RVA-3D, Newport Scientific, Austrália), equipado com software *Termocline for Windows*, versão 3.1, de acordo com o método nº 76-21.01 da AACC (2010) e realizado em duplicata. Foram utilizados aproximadamente 3,5 g de farinha corrigidos para 14% de umidade e $25 \pm 0,1$ mL de água destilada. O perfil de temperatura *Standard 1* foi empregado, em que as amostras são mantidas a 50 °C por 1 minuto, aquecidas até 95 °C em 3,5 minutos e mantidas nesta temperatura durante 2,5 minutos, resfriadas a 50 °C em 3,8 minutos e mantidas nesta temperatura até completar o tempo total de 13 minutos de análise. Os parâmetros considerados foram: viscosidade máxima, viscosidade mínima à temperatura constante, quebra e tendência à retrogradação.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de quantificação de DON, de fungicidas e de qualidade tecnológica das amostras de FTGI foram analisados estatisticamente pela determinação da análise de variância (Anova) e nos modelos significativos as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 95% de intervalo de confiança, com o emprego do programa computacional SASM-Agri.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO

4.1.1 Curva Analítica

Os diferentes fenômenos potencialmente induzidos pelos componentes da matriz podem afetar drasticamente o desempenho do método em termos de capacidade de detecção, seletividade, repetibilidade, precisão, linearidade de resposta (sinal *versus* concentração) e limite de quantificação (GOSETTI et. al., 2010). Estudos anteriores mostraram que os analitos estudados apresentam efeito matriz, desta forma para minimizar este efeito a curva analítica foi preparada no extrato da matriz (FRIEDRICH, 2014).

A faixa de trabalho de cada fungicida estudado e da micotoxina DON foram determinadas através da injeção em triplicata das soluções nas concentrações de 200, 250, 350, 400, 500 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a micotoxina DON e 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os fungicidas. Os resíduos da regressão foram confirmados pelo teste de Anderson-Darling e tiveram distribuição normal, ou seja, os desvios da normalidade não são significativos. O teste rejeita a hipótese de normalidade quando os valores de $p < 0,05$.

Os dados do teste de linearidade da curva no extrato branco da matriz se mostraram adequados apresentando valores superiores as 0,99 para o coeficiente de determinação (R^2) atendendo a recomendação da (INMETRO, 2016), conforme Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Resultados da análise da regressão dos analitos da solução padrão

Amostra	Teste de Normalidade $p < 0,05$	Faixa linear (μgL^{-1})	R^2
Desoxinivalenol	0,13	200 a 600	0,9942
Piraclostrobina	0,06	50 a 600	0,9927
Tebuconazol	0,36	50 a 600	0,9937
Carbendazin	0,57	50 a 600	0,9978
Metconazol	0,06	50 a 600	0,9976

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

4.1.2 Exatidão (recuperação)

Os parâmetros de exatidão e recuperação dos analitos foram avaliados através da injeção de três níveis de concentração em oito repetições. A avaliação de valores extremos foi realizada

através do teste de Grubbs. Foram excluídos valores discrepantes até o limite máximo de 22,2% e posteriormente foi calculada a recuperação para cada nível de concentração. As Tabelas 6 e 7 apresentam as recuperações para os níveis avaliados.

Tabela 6 – Recuperação da micotoxina desoxinivalenol

Amostra	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	200	400	600
Desoxinivalenol	113,50	120,11	85,63

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Tabela 7 – Recuperação dos fungicidas em estudo

Amostra	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	100	200	600
Piraclostrobina	97,8	92,8	104,93
Tebuconazol	94,93	99,5	99,1
Carbendazin	97,4	108	93,8
Metconazol	100,06	97,33	97,46

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Os resultados mostraram que o procedimento tem boa recuperação para os analitos estudados. Todos os níveis de fortificação apresentaram recuperação entre 85 e 120%. O INMETRO (2016) e SANCO (2013) estabelece a faixa aceitável entre 70% e 120% e a AOAC (2002) recomenda entre 70% a 125% para analitos em concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$.

4.1.3 Precisão

A avaliação da precisão instrumental foi obtida a partir da repetitividade e da precisão intermediária. Os resultados da repetitividade foram inicialmente avaliados estatisticamente através do teste de Grubbs a fim de verificar a presença de valores extremos na concentração intermediária de $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ e após foi aplicado o teste de HorRat. O método apresentou repetitividade, pois os resultados do teste ficaram menores que o valor de referência. O

parâmetro é considerado aceitável quando o resultado do teste de for < 2 (AOAC, 2016). A precisão intermediária foi realizada através da análise dos mesmos níveis de concentração da repetitividade, mas com resultados de análises realizadas por analistas diferentes, no mesmo dia. Foram tratados os resultados dos analitos que apresentaram recuperações acima de 70% em todos os níveis de fortificação estudados. Os resultados foram avaliados utilizando o teste t em quatro repetições. O valor crítico para aceitar a hipótese nula de que os resultados são significativamente diferentes é de 3,182, estabelecido pela Tabela do Teste t. Os resultados da análise estatística estão apresentados na Tabela 8. Os resultados mostraram boa precisão intermediária do procedimento avaliado.

Tabela 8 – Resultados da avaliação da precisão do procedimento

Micotoxina e Fungicidas	Repetitividade	Precisão Intermediária
	Teste de HorRat (200 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Teste t (200 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Desoxinivalenol	0,92	0,87
Piraclostrobina	0,13	0,94
Tebuconazol	0,09	0,91
Metconazol	0,06	0,13
Carbendazin	0,01	0,13

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

4.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O LOQ_m , obtido como sendo o menor nível de fortificação, foi de 50 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOD_m , de concentração 3,33 vezes menor que este valor, conforme apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Limites de detecção e quantificação do método avaliado (em $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Micotoxina e Fungicida	Método	
	LD_m	LQ_m
Desoxinivalenol	60,0	200
Piraclostrobina	15,0	50
Tebuconazol	15,0	50
Carbendazin	15,0	50
Metconazol	15,0	50

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Os limites de detecção e quantificação determinados para o procedimento são adequados para atender a legislação vigente para os princípios ativos recomendados para a cultura do trigo.

4.2 QUANTIFICAÇÃO MICOTOXINA DON E FUNGICIDAS NA FTGI

Na tabela 10 estão expressos os valores de contaminação por DON nas amostras de FTGI, as quais foram submetidas a diferentes tratamentos de fungicidas como mostrado na (Tabela 2) com exceção da testemunha -T1.

Tabela 10: Valores encontrados da micotoxina DON (em $\mu\text{g Kg}^{-1}$) na FTGI.

Amostras	DON
T1(testemunha)	7084,75 ^a ±37,29
T2	451,245 ^b ±95,12
T3	309,222 ^c ±185,47
T4	224,754 ^c ±109,34
T5	301,198 ^c ±192,89
T6	176,281 ^c ±96,84
T7	539,863 ^b ±257,62
T8	233,925 ^c ±171,72
T9	525,155 ^b ±363,71
T10	154,181 ^c ±94,34
T11	505,307 ^b ±142,03
T12	479,805 ^b ±135,62

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott.

Resultados expressos como média de três determinações \pm desvio padrão.

As amostras avaliadas apresentaram diferentes níveis contaminação por DON. Sabe-se que no processamento do trigo a para obtenção da farinha branca partes do grão, como o farelo, onde se encontram os maiores níveis de contaminação, e o gérmen, são removidas reduzindo a concentração de micotoxinas (NOGUEIRA e OLIVEIRA, 2006). Assim os níveis de contaminação por DON encontrados nas amostras deste estudo podem ser justificados devido à utilização do grão inteiro durante o processo de moagem, que seriam menores se fossem analisados em farinha refinada.

Os teores de DON encontrados estão dentro dos limites toleráveis estabelecidos pela RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017 (BRASIL,2017), evidenciando a eficácia dos tratamentos com fungicidas. Este resultado pode ser comprovado pela avaliação da amostra T1-

testemunha que apresentou valores acima do permitido pela legislação, devido ao não uso do controle químico durante a fase de floração e desenvolvimento da cultura.

Quando comparados os tratamentos, observou-se que a utilização do fungicida carbendazim apresentou melhor efeito na redução nos níveis de DON (tratamentos T3, T4, T5 e T6). A utilização em sequência de carbendazim + tebuconazol – T4 ou carbendazim + tebuconazol e metconazol + piraclostrobina, nesta ordem, apresentaram redução do valor de DON quando comparadas as amostras T3 e T5 possivelmente pelo menor controle obtido pela utilização de piraclostrobina + metconazol em sequência (sem carbendazim) ou na primeira aplicação (sem carbendazim).

Na comparação das amostras T5 e T8, podemos observar que a combinação de mancozebe + tebuconazol na segunda aplicação apresentou melhor controle de DON quando comparado a carbendazim + tebuconazol. Isto pode ser explicado a diversas características da molécula do mancozebe em apresentar propriedades químicas em reduzir os efeitos fitotóxicos que podem ser gerados na utilização de triazóis em diversas culturas (BALARDIN et. al., 2017). Ressalta-se que a aplicação de mancozebe + tebuconazol na primeira aplicação foi inferior efetivamente a utilização de carbendazim + tebuconazol na mesma.

A combinação de carbendazim + mancozebe – T10 em sequência mostrou-se mais eficiente no controle de DON do que todos os outros tratamentos realizados. Em análise ao restante dos resultados de controle de DON, e comparando os diferentes posicionamentos dos fungicidas nas aplicações, a utilização de carbendazim + tebuconazol em sequência com carbendazim + mancozebe possivelmente apresentaria satisfatórios resultados de eficácia de controle de DON na cultura do trigo.

Os fungicidas desempenham um importante papel no controle da presença de fungos nas culturas agrícolas. Estes têm de ser considerados seguros para o meio ambiente e seres humanos (PEREIRA,2008), ou seja, é necessário que o resíduo dos mesmos em alimentos destinados a população e animais esteja dentro dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, evitando-se assim riscos para a saúde humana e animal.

Os resultados dos resíduos de fungicidas estudados neste trabalho em FTGI nos 12 diferentes tratamentos apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método, com exceção do fungicida mancozebe que não foi possível sua quantificação devido as suas características poliméricas e dificuldade de solubilização deste composto.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO GRÃO DE TRIGO

A Tabela 11 apresenta os valores da caracterização físico-química dos grãos.

Tabela 11: Caracterização físico-química do grão

Amostra	Peso do Hectolitro (kg h L ⁻¹)	Umidade (g/100g)
T1 (testemunha)	77,65 ^a ±1,42	14,50 ^b ±0,10
T2	77,10 ^a ±1,05	14,70 ^a ±0,20
T3	78,24 ^a ±1,30	14,25 ^c ±0,25
T4	78,53 ^a ±1,20	14,55 ^b ±0,05
T5	77,39 ^a ±1,80	14,65 ^a ±0,15
T6	77,34 ^a ±2,28	14,60 ^a ±0,10
T7	78,26 ^a ±2,62	14,65 ^a ±0,15
T8	77,88 ^a ±0,41	14,65 ^a ±0,15
T9	79,03 ^a ±0,93	14,25 ^c ±0,08
T10	78,64 ^a ±0,59	14,55 ^b ±0,05
T11	77,66 ^a ±1,15	14,60 ^a ±0,10
T12	77,50 ^a ±0,54	14,45 ^b ±0,15

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott. Resultados expressos como média de três determinações ± desvio padrão.

O peso hectolitro (PH), massa de 100 litros de trigo expressa em quilogramas, é utilizado como medida tradicional de comercialização em vários países, e expressa indiretamente a qualidade de grãos. Sabe-se que quanto maior o valor do PH, maior a aceitação e valorização de mercado do produto (MAZZUCO et al., 2002). As amostras apresentaram valores de pH superiores a 77 kg h L⁻¹ caracterizando grãos de trigo de Tipo 1, conforme a Instrução Normativa Nº 38, de 30 de novembro de 2010 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2010), sem diferenças significativas entre os tratamentos avaliados.

Os teores de umidade de todas as amostras analisadas foram superiores a 13% valor máximo determinado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), para garantir conservação e armazenagem dos grãos. Porém, a não necessidade de armazenamento dos grãos devido ao processamento imediato tornou desnecessário o processo de secagem dos mesmos.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA FTGI

4.4.1 Caracterização físico-química da FTGI

A composição química influencia diretamente nas características tecnológicas das farinhas e é um dos fatores determinantes para sua qualidade (BRESSIANI, 2016). A Tabela 12 apresenta a caracterização química das amostras de FTGI.

Tabela 12: Caracterização físico-química da FTGI

Amostras	Umidade (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
T1 (testemunha)	13,85 ^a ±0,49	12,30 ^a ±0,01	1,46 ^b ±0,03
T2	14,08 ^a ±0,16	11,94 ^b ±0,09	1,14 ^c ±0,01
T3	13,37 ^a ±0,31	11,57 ^c ±0,03	1,24 ^d ±0,04
T4	14,54 ^a ±1,20	11,74 ^c ±0,06	1,32 ^c ±0,02
T5	14,30 ^a ±0,13	11,90 ^b ±0,01	1,42 ^b ±0,01
T6	14,20 ^a ±0,12	11,91 ^b ±0,02	1,40 ^b ±0,07
T7	14,22 ^a ±0,19	11,76 ^c ±0,02	1,42 ^b ±0,09
T8	14,16 ^a ±0,16	11,92 ^b ±0,06	1,43 ^b ±0,07
T9	14,00 ^a ±0,16	11,90 ^b ±0,01	1,56 ^a ±0,02
T10	13,91 ^a ±0,18	11,66 ^d ±0,05	1,07 ^e ±0,04
T11	14,03 ^a ±0,15	11,37 ^f ±0,02	1,13 ^e ±0,01
T12	14,24 ^a ±0,08	11,30 ^f ±0,05	1,08 ^e ±0,09

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott. Resultados expressos como média de três determinações ± desvio padrão.

Os teores de umidade nas amostras analisadas estão dentro do limite estipulado na legislação brasileira (BRASIL,2005), a qual estabelece que o mesmo não deve ser superior a 15%. Os valores encontrados de proteínas e cinzas estão de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de trigo nº 8, de 02 de junho de 2005 (BRASIL, 2005). Embora a legislação não estabeleça padrões para farinha integral, está se encontra dentro dos limites estipulados para farinha de trigo como integral, ou seja, mínimo de 8,0% proteínas e máximo de 2,5% cinzas.

Analisando os diferentes resultados obtidos através da análise de proteínas nos diferentes tratamentos observou-se que não houve relação entre a concentração de DON e o teor de proteínas entre os tratamentos que tiveram a ação dos fungicidas. O T1-testemunha

diferiu dos demais apresentando um teor maior de proteína, acredita-se que devido a formação de proteína fúngica, visto que este foi o tratamento que apresentou as maiores concentrações de DON, ou seja, quando os tratamentos com fungicidas foram efetivos, o fungo não interferiu na formação de proteínas pelo grão.

4.4.2 Teor de Glúten

O glúten desempenha um papel fundamental na determinação das propriedades reológicas de massa e qualidade de panificação, entre as principais, a habilidade para formar uma massa resistente, com boas características para panificação (HOSENEY, 1994). Na Tabela 13 estão os resultados obtidos para os teores de glúten úmido e índice de glúten dos tratamentos analisados.

Tabela 13: Teores de glúten encontrados na FTGI

Amostras	Glúten Úmido (%)	Índice de Glúten (%)
T1 (testemunha)	30,40 ^a ±0,45	57,13 ^c ±5,96
T2	30,56 ^a ±0,49	69,37 ^b ±7,20
T3	29,21 ^b ±0,12	70,84 ^b ±0,91
T4	28,21 ^b ±0,04	76,80 ^b ±4,23
T5	27,90 ^c ±0,92	69,92 ^b ±1,33
T6	28,47 ^c ±0,01	66,59 ^b ±0,22
T7	29,06 ^b ±0,19	68,22 ^b ±1,18
T8	29,05 ^b ±0,63	59,13 ^c ±4,36
T9	26,07 ^d ±0,54	74,40 ^a ±1,73
T10	30,68 ^a ±0,15	53,17 ^c ±5,28
T11	29,44 ^b ±0,04	72,57 ^b ±4,32
T12	29,67 ^b ±0,35	66,62 ^b ±5,32

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott.

Resultados expressos como média de três determinações ± desvio padrão.

O glúten úmido representa o rendimento do glúten, indicando a capacidade das proteínas em se agregarem. Analisando os valores encontrados nos diferentes tratamentos observou-se que não houve relação entre a concentração de DON e os teores de glúten úmido e índice de glúten. Em contrapartida, Schimidt, Zannini e Arendt (2017) perceberam que graves infecções pelo fungo *Fusarium* podem reduzir a força da rede de glúten quando as amostras passam por

armazenamento em condições favoráveis para o crescimento fúngico, diferentemente do presente estudo, em que as amostras foram rapidamente processadas.

Os altos teores de glúten úmido encontrados podem ser relacionados com a retenção de água pelo glúten e por se tratar de FTGI, as fibras podem ter ficado retidas no mesmo, ou seja, não foram eficientemente eliminadas no processo de lavagem. As fibras também retêm água, o que pode ter superestimado os valores de glúten úmido.

Os valores encontrados para o índice de glúten apresentaram variabilidade entre os tratamentos, isto pode ter ocorrido por falta de uma melhor homogeneização da amostra.

4.4.3 Avaliação da cor

Dentre as análises de caracterização da FTGI a avaliação da cor é um dos parâmetros levados em consideração na comercialização da matéria-prima e é decisiva para a aceitabilidade dos produtos pelos consumidores (LIU et al., 2015).

A Tabela 14 apresenta os valores para luminosidade (L) e coordenadas de cromaticidades a* e b* das farinhas.

Tabela 14: Avaliação das cores das farinhas de trigo de grão inteiro por tratamento.

Amostra	L*	a*	b*
T1 (testemunha)	83,33 ^b ±0,49	0,89 ^a ±0,20	12,17 ^a ±0,12
T2	84,81 ^a ±0,48	0,59 ^a ±0,17	11,88 ^a ±0,19
T3	85,47 ^a ±0,39	0,37 ^a ±0,17	11,73 ^a ±0,09
T4	85,15 ^a ±0,75	0,46 ^a ±0,26	11,75 ^a ±0,21
T5	84,08 ^b ±0,64	0,77 ^a ±0,22	11,97 ^a ±0,07
T6	83,62 ^b ±0,71	0,87 ^a ±0,23	11,81 ^a ±0,19
T7	83,86 ^b ±0,80	0,76 ^a ±0,25	11,79 ^a ±0,23
T8	83,13 ^b ±0,65	0,94 ^a ±0,20	12,04 ^a ±0,22
T9	84,64 ^a ±0,60	0,52 ^a ±0,23	11,75 ^a ±0,30
T10	83,73 ^b ±0,47	0,68 ^a ±0,14	11,93 ^a ±0,16
T11	82,71 ^b ±0,21	1,03 ^a ±0,07	12,23 ^a ±0,05
T12	85,36 ^a ±0,33	0,51 ^a ±0,11	11,08 ^a ±0,17

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott. Resultados expressos como média de três determinações ± desvio padrão.

Em relação a luminosidade, houve diferença significativa entre as amostras, porém os valores encontrados não possuem relação com a presença da micotoxina DON. Os resultados encontrados podem ser explicados pelo fato da farinha integral não ser tão homogênea quando comparada a farinha branca, por este fato destaca-se a importância de uma boa homogeneização antes da realização de análises. Nas coordenadas de cromaticidade a^* e b^* não houve diferença significativas entre as amostras, porém os valores positivos encontrados indicam tendência a tons de cores avermelhados e amarelados, característico de FTGI.

4.6 ANÁLISES REOLÓGICAS DA FTGI

4.6.1 Farinografia

A qualidade da farinha, massa e do produto final pode ser mensurada através da avaliação das propriedades de mistura da massa, que envolve processos de hidratação da matéria prima e a avaliação de resistência oferecida pela massa quando submetida à ação mecânica de mistura (SINGH et al., 2011). A Tabela 15 apresenta as propriedades de misturas das diferentes amostras de farinha de trigo de grão inteiro.

Tabela 15: Propriedades de mistura das diferentes amostras de FTGI

Amostras	Absorção (%)	TDM (min)	Estabilidade (min)	ITM (UF)
T1 (testemunha)	66,83 ^a ±0,23	4,55 ^a ±0,49	5,75 ^c ±0,21	107,5 ^a ±6,36
T2	63,20 ^a ±0,20	4,95 ^a ±0,21	6,60 ^a ±0,14	98,0 ^a ±8,48
T3	63,2 ^a ±0,20	5,00 ^a ±0,56	6,20 ^b ±0,14	96,50 ^a ±6,36
T4	66,00 ^a ±0,23	5,20 ^a ±0,14	6,05 ^b ±0,07	100,00 ^a ±4,24
T5	65,80 ^a ±0,60	5,30 ^a ±0,14	6,15 ^b ±0,07	104,0 ^a ±1,41
T6	65,30 ^a ±0,63	4,70 ^a ±0,42	5,95 ^b ±0,21	103,0 ^a ±1,41
T7	67,10 ^a ±3,18	5,15 ^a ±0,07	6,45 ^a ±0,70	96,50 ^a ±7,77
T8	66,05 ^a ±0,05	5,00 ^a ±0,14	5,45 ^c ±0,21	100,0 ^a ±23,33
T9	67,20 ^a ±3,18	5,00 ^a ±0,14	5,00 ^d ±0,14	114,5 ^a ±20,5
T10	64,85 ^a ±0,49	4,80 ^a ±0,14	5,65 ^c ±0,42	105,0 ^a ±7,07
T11	64,70 ^a ±0,45	5,20 ^a ±0,14	6,70 ^a ±0,42	98,00 ^a ±7,07
T12	64,00 ^a ±0,40	4,85 ^a ±0,21	6,75 ^a ±0,07	99,00 ^a ±4,24

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott. Resultados expressos como média de três determinações ± desvio padrão.

As 12 diferentes amostras de FTGI não apresentaram diferença significativa para absorção de água. Em relação a contaminação por DON os resultados demonstram que a mesma não interferiu na absorção de água, já que a amostra T1- testemunha que apresentou a maior concentração de micotoxina não apresentou diferença das demais.

Além disso o presente estudo utilizou FTGI, contendo uma grande quantidade de fibras, a presença das mesmas pode causar aumento na absorção de água (AHMED, et. al., 2013)

Para o tempo de desenvolvimento de massa as amostras não apresentaram diferença significativa, variando de 4 a 5 minutos desde a adição de água necessária até o completo desenvolvimento do glúten atingindo a máxima consistência, pode-se explicar estes resultados, como consequência dos valores de absorção de água, por se tratar de FTGI a presença de fibras que pode causar aumento na absorção de água também pode levar ao maior tempo de desenvolvimento de massa.

O parâmetro de estabilidade de massa é reconhecido como um indicador de maior resistência ao amassamento e melhor qualidade tecnológica (INDRANI, 2007). De acordo, com os valores encontrados a amostra T9 apresentou diferença quando comparada as demais amostras, o mesmo ocorreu com o teor de glúten úmido encontrado como ilustra a Figura 10. Em relação a micotoxina DON, verifica-se que não existe relação direta com a estabilidade e glúten úmido, já que a testemunha apresentou os maiores valores de contaminação e alto valor de glúten, não diferiu estatisticamente nos resultados de estabilidade das demais amostras. Antes et. al., (2001) também não observaram diferença significativa nos resultados de estabilidade de massa e glúten em amostras contaminadas por DON em comparação com as amostras controle. Este menor valor de estabilidade de massa da amostra T9 pode estar relacionado diretamente com o seu menor valor de glúten úmido, ou seja, a amostra apresentou menor resistência ao amassamento, devido a menor agregação das proteínas de glúten.

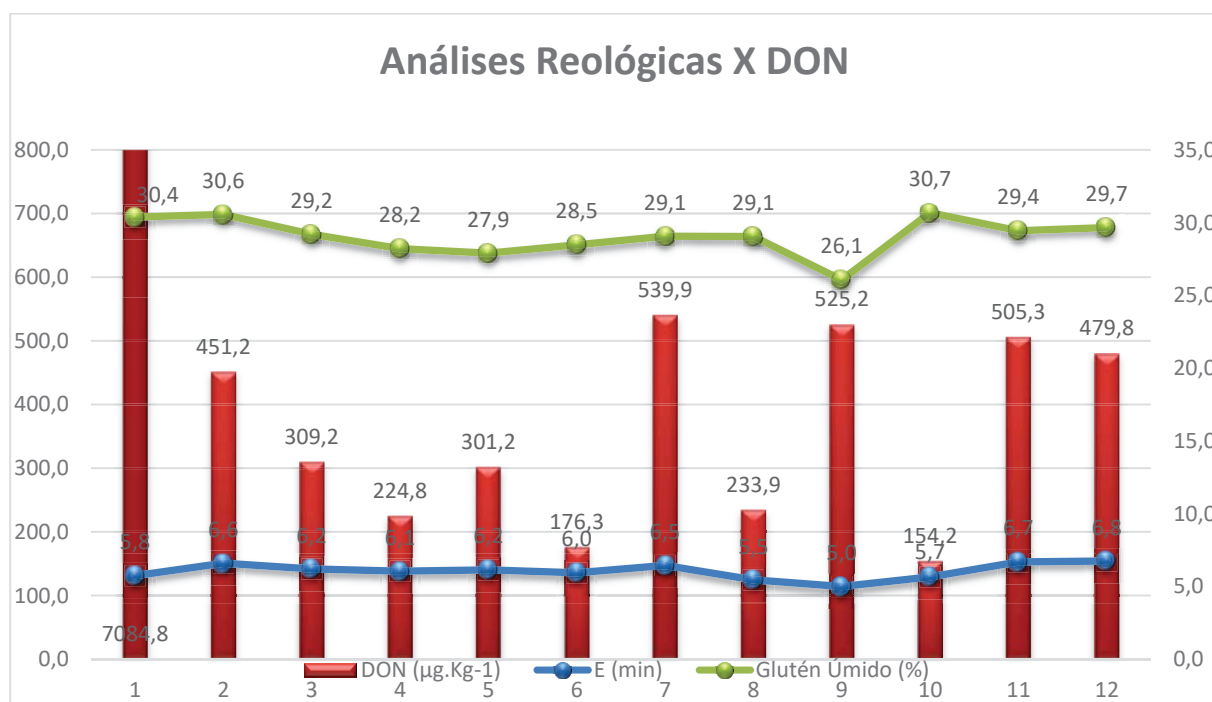
De acordo com Fernandes et al., (2008), farinha de trigo refinada com boa qualidade tecnológica para a produção de pães é aquela que exhibe tempo de estabilidade de 7,5 min ou mais. Neste estudo, o tempo de estabilidade em todas as amostras foi inferior a 7,5 min, o que já era esperado, por se tratar de FTGI. Bressiani (2016), obteve redução no tempo de estabilidade das amostras de farinhas que continham partes externas do grão de trigo em comparação com a farinha refinada.

Para os valores de índice de tolerância a mistura não houve diferença significativa. Sabe-se que quanto maior for o índice de tolerância à mistura, mais fraca será classificada a farinha (JUNQUEIRA et al., 2007), conseqüentemente menos tolerante a mistura, obtendo-se menor

tempo de estabilidade de massa e maior ITM, similarmente ao obtido nos resultados das amostras de farinha integral por ORO (2013).

Os resultados encontrados pelo ensaio de farinografia, demonstraram que a contaminação pela micotoxina DON não interfere de forma significativa nas propriedades de mistura, desta forma não apresentou redução na qualidade tecnológica do produto final.

Figura 10: Relação entre os parâmetros estabilidade de massa, glúten úmido e micotoxina desoxinivalenol.



Fonte: elaborado pelo autor (2018)

4.6.2 Propriedades de pasta

Os valores para propriedade de pasta das diferentes amostras de farinha de trigo de grão inteiro estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Propriedades de pasta das amostras de farinha de trigo de grão inteiro

Amostras	Visc Máx (cP)	Quebra (cP)	Visc Final (cP)	Tend Retrog (cP)
T1(testemunha)	1499,5 ^e ±5,5	500,0 ^b ±12,00	1772,0 ^d ±4,00	772,5 ^b ±10,5
T2	1638,5 ^b ±3,5	525,5 ^b ±14,5	1906,0 ^b ±6,00	793,0 ^a ±12,0
T3	1596,0 ^c ±3,0	521,0 ^b ±18,0	1868,0 ^b ±4,00	793,0 ^a ±19,0
T4	1550,0 ^d ±3,0	507,5 ^b ±11,5	1816,5 ^c ±8,5	774,0 ^b ±6,0
T5	1474,5 ^e ±18,5	469,0 ^c ±11,0	1715,5 ^d ±22,45	740,0 ^c ±20,0
T6	1474,5 ^e ±18,5	450,0 ^c ±3,0	1743,5 ^d ±5,5	732,0 ^c ±4,0
T7	1486,5 ^e ±49,5	523,0 ^b ±6,0	732,0 ^c ±46,5	777,5 ^b ±18,5
T8	1432,0 ^e ±25	465,0 ^c ±4,0	1676,5 ^e ±28,5	719,5 ^c ±13,4
T9	1421,0 ^e ±12	425,0 ^d ±11,0	1748,3 ^d ±28,86	744,0 ^c ±2,0
T10	1675 ^b ±33,0	541,5 ^a ±33,3	1909 ^b ±32,0	775,5 ^b ±32,5
T11	1737,0 ^a ±28,0	557,5 ^a ±3,53	1987,5 ^a ±29,5	809,3 ^a ±5,65
T12	1764,5 ^a ±4,5	540,0 ^a ±29,44	2017,5 ^a ±5,5	801,5 ^a ±26,5

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott. Resultados expressos como média de três determinações ± desvio padrão.

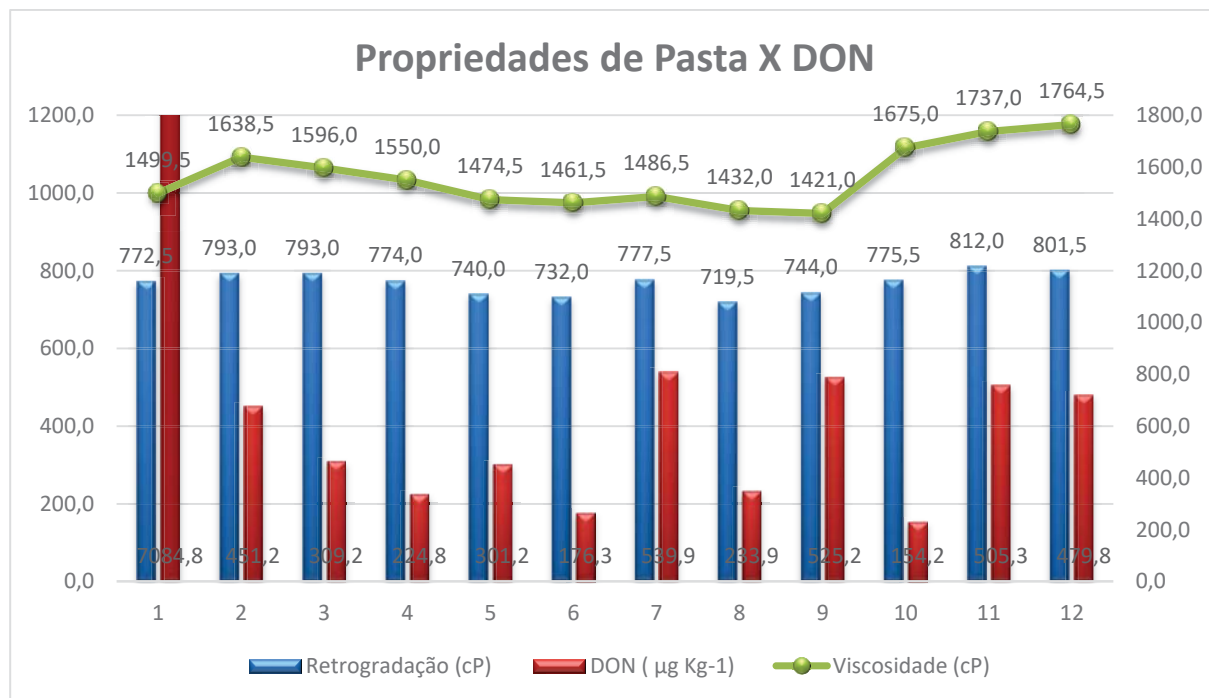
A viscosidade máxima reflete a extensão da gelatinização do grânulo de amido na presença de água e aquecimento, fornece uma indicação da carga viscosa susceptível a ser produzida durante a mistura (MIN et al., 2010). A partir da análise dos resultados obtidos e do gráfico representado na Figura 11, percebeu-se variabilidade de valores, porém não é possível afirmar que esta variação esteja relacionada diretamente aos diferentes níveis de DON encontrados nas amostras. Percebe-se que as amostras T11 e T12 apresentaram os maiores valores de viscosidade máxima e também maior concentração de DON, quando comparadas as amostras T2 e T10, porém a T1- testemunha que apresentou a maior concentração de micotoxina DON não obteve maior valor de viscosidade máxima.

A quebra é a medida do grau de resistência dos grânulos de amido devido à agitação mecânica contínua a altas temperaturas. Os valores de quebra encontrados nas amostras seguem a mesma tendência da viscosidade máxima. As amostras T10, T11 e T12 que obtiveram os maiores valores de viscosidade máxima, também apresentaram os maiores valores de quebra, diferindo das demais.

A viscosidade final é atingida durante o processo de resfriamento da amostra e é geralmente relacionada com a retrogradação (RAGAE; ABDEL-AAL, 2006). A partir da análise dos resultados estes dois parâmetros seguem a mesma tendência em todas as amostras

e de forma mais evidente nas amostras T11 e T12 que apresentaram os maiores valores de viscosidade final, foram as que obtiveram os maiores valores de retrogradação. Em relação as diferentes concentrações da micotoxina DON, não se pode constatar que a mesma influenciou nestes resultados, devido ao fato que amostras com maiores concentrações de micotoxina não obtiveram, aumento de retrogradação.

Figura 11: Relação entre os parâmetros de viscosidade máxima, retrogradação e micotoxina desoxinivalenol.



Fonte: elaborado pelo autor (2018).

5 CONCLUSÃO

Todos os parâmetros de validação do método analítico para identificação e quantificação por LC-MS/MS ficaram dentro dos limites estipulados pelo INMETRO, sendo possível utilizá-lo para o monitoramento da micotoxina desoxinivalenol, e dos fungicidas carbendazin, tebuconazol, metconazol, piraclostrobina em farinha de trigo de grão inteiro.

As amostras da cultivar Toruk® apresentaram diferentes níveis de contaminação pela micotoxina DON e não foram detectados, em nenhum dos tratamentos, resíduos de fungicidas acima do limite máximo estabelecido pela ANVISA.

Através das análises físico-químicas realizadas nos grãos e na farinha, bem como as reológicas, conclui-se que, nos níveis de DON obtidos para as amostras, não houve alterações na qualidade tecnológica da farinha de trigo de grão inteiro contaminada por DON. Estes resultados refletem a importância do cumprimento dos limites estabelecidos pela legislação, assim garantindo maior segurança alimentar para o consumidor.

A partir dos testes realizados neste trabalho, as quantificações de DON e resíduos de fungicidas assim como as de cunho de qualidade tecnológica da farinha, fica evidente a importância de trabalhos que envolvam desde o plantio sob condições adequadas e de monitoramento, como o desenvolvimento de trabalhos em laboratórios que possuam equipamentos e condições adequadas, obtendo-se assim resultados confiáveis.

REFERÊNCIAS

AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods of Analysis**, 11^a.ed., 2010. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A.

ABELLA-MIRÓ, E.; HERRERO, P.; CANELA, N.; AROLA, L.; BORRUL, F.; ROSA, R.; FONTANA, N. Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 229, p. 366-372, 2017.

ALBANO F. de M., RODRIGUEZ-RAYA. M.T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre. 2009.

ANASTASSIADES, M. e LEHOTAY, S. 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 AOAC International, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANTES, S., BIRZELE, B., PRANGE, A., KRAMER, J., MEIER, A., DEHNE, H.-W., & Köhler, P. (2001). **Rheological and bread making properties of wheat samples infected with Fusarium spp.** *Mycotoxin Research A*, 17, 76–80.

ANVISA. **Nota Técnica no.226/2013**. Disponível em:
<<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2014-01/nota-tecnica-alimentos--arquivo.pdf>>.
Acesso em: 14 de setembro de 2016

AOAC – **Official methods of analysis of AOAC international**, 19th, edition, apêndice D, 2016.

AUDENAERT, K. et al. **Impact of Fungicide Timing on the Composition of the Fusarium Head Blight Disease Complex and the Presence of Deoxynivalenol (DON) in Wheat**. In: THAJUDDIN, N. (Ed.). *Fungicides – Beneficial and Harmful Aspects*. First ed. Ghent, Belgium: InTech China, 2009. p. 79–98.

BALARDIN, S. R.; MADALOSSO, G. M.; STEFANELLO, T. M.; MARQUES, N. L.; DEBORTOLI, P. M. **Mancozebe muito além de um fungicida**. Porto Alegre-RS, 1^o Ed. 2017.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 7, de 15 de agosto de 2001. **Norma de identidade e qualidade do trigo**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 ago. 2001. Seção 1, n. 160-E, p. 33-35.

BRASIL. **Guia para qualidade em química analítica**. Brasília. 76p. 2005

BRASIL. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília - DF: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. **Regulamento técnico do trigo**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1 dez. 2010. Seção 1, n. 29, p. 2.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Manual de Garantia da Qualidade Anlítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. MAPA/ACS, 2011.

BRASIL. Resolução - RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013. Dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos para os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Brasília - DF: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2013.

BRASIL. Resolução – RDC nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. Dispõe sobre a limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas. Brasília. DF: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2017.

BRESSIANI, J. **Qualidade da farinha de trigo de grão inteiro em resposta a influência de diferentes tamanhos de partículas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2016.

BONNET, M. S. et al. **Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: the brain as a target**. *Toxins*, v. 4, p. 1120–1138, 2012.

CALVO, A. M. **Mycotoxins**. In: DABROWSKI, W. M.; SIKORSKI, Z. E. (Eds.). *Toxins in food*. Boca Raton, Florida - USA: CRC Press, 2005. p. 220–240.

CHELI, F., PINOTTI, L., ROSSI, L., & DELL'ORTO, V. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: a review. *LWT. Food Science and Technology*, 54 (2), p.307-314, 2013.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food **Química Nova**, v. 31, p. 623-632, 2008.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 19–28, 2002.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, G. C. **Giberela do trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 29, n. 6, p. 587-600, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v29n6/a01v29n6.pdf>>. Acesso em: 15 de setembro de 2016 .

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 132-145, 2011.

DOMINGUES, M. A. D.; ALMEIDA, R. R.; TOMIWAKA, M. M.; GALLO, C. R.; GLORIA, E. M.; DIAS, C. T. S. **Ocorrência de deoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil**. Cien. Tecnol. Alimen. Campinas, v.27, n. 1, p. 181-185, 2007. Disponível em: <http://ce.esalq.usp.br/tadeu/calori_tadeu.pdf>. Acesso em 12 de setembro de 2016.

DONATO, F. F. **Resíduos de agrotóxicos em água potável usando SPE e determinação rápida por LC-MS/MS e GC-MS/MS**. (2012) Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

ERLEI, M.R; REIS, C.A; CARMONA, A.M. **Manual de Fungicidas: Guia para o controle químico racional de plantas**. Passo Fundo-RS, 7ª Ed. 2016.

FRIEDRICH, M.T. **Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduo para determinação de agrotóxicos em trigo por LC-MS/MS e GC-MS/MS**. Tese (Doutorado em química analítica), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2014.

GEORGIANNA, D. R.; PAYNE, G. A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 2, p. 113-125, 2009.

GONZÁLEZ-OSNAYA, L., CORTÉS, C. MOLTÓ, J.C. MANES, J. **Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain**. v. 124, p. 156-161, 2011.

GONZÁLEZ, R.R.; FRENICCH, G.A.; VIDAL-MARTINEZ, J.L.; PRESTES, D.O.; GRIO, S.L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography**, v. 1228, p.1477-1485, 2011.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E. GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 3929–3937, 2010.

GRUBBS, F. E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**. v. 11, p. 1-21. 1969

GUTERRES, C. W. **Giberela do trigo, inimigo nem sempre perceptível**. CCGL Info, v. Ano IV, n. 23, Cruz Alta - RS, p. 22, 2013.

HÄLLER GÄRTNER B., G. KLEIJER AND F. MASCHER. Répartition du DON dans les fractions de mouture du blé. p. 462–465,2005.

HEIDTMANN-BENVENUTTI et. al. **Determinação de desoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parabolizado e suas frações utilizando QuEChERS e HPLC/UV-FL**. Química Nova. V. 35, nº 6, p. 1244-1249,2012.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**. v. 67, p. 331-343, 1995.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201608_5.shtm. Acesso em: 12 de setembro de 2016.

INDRANI, D.; RAO, G. V. Rheological characteristics of wheat flour dough as influenced by ingredients of *Parotta*. **Journal of Food Engineering**, v. 17, n. 1, p. 105-110, 2007.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008 rev 05**. Rio de Janeiro. 28 p. 2016.

JUNQUEIRA, R. M.; ROCHA, F.; MOREIRA, M. A.; CASTRO, I. A. Effect of proofing time and wheat flour strength on bleaching, sensory characteristics, and volume of french breads with added soybean lipoxygenase. **Cereal Chemistry**, v. 84, n. 5, p. 443–449, 2007.

KOLBERG, D. I. S. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo empregando GC-MS (NCI-SIM) para determinação de pesticidas em grãos de trigo e seus produtos processados.** Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS - S.I. 2008.

LAMARDO, L. **Avaliação de métodos analíticos para determinação de desoxinivalenol e sua ocorrência em amostras de trigo e farinha de trigo.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2004.

LARGE, E.C. Growth stages in cereals: illustration of the Feekes scale. **Plant Pathology**, v.3, p.128-129, 1954.

LIU, C. M.; LIANG, R. H.; DAI, T. T.; YE, J. P.; ZENG, Z. C.; LUO, S. J.; CHEN, J. Effect of dynamic high pressure microfluidization modified insoluble dietary fiber on gelatinization and rheology of rice starch. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 55-61, 2015.

LUZ, S.R. **Quantificação de micotoxinas e resíduos de fungicidas em grãos de trigo por LC-QToF-MS.** Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2016.

MAZIERO, T. M.; BERSOT, L. S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil.** Review. V. 12, nº1, p. 89-99, 2010.

MAZZUCO, H. et al. **Influência do estágio de maturação na colheita e temperatura de secagem de grãos de trigo sobre os valores de energia metabolizável aparente corrigida (EMAc) em frangos de corte.** R. Braz. Zootec., Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2221-2226, 2002.

MIN, B.; BAE, I.Y.; LEE, H. G.; YOO, S.; LEE, S. Utilization of pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5414-5418, 2010.

MIRANDA, M. Z.; MORI, C. DE e LORINI, I. **Qualidade e segurança alimentar no complexo tritícola.** In: CUNHA, G. R. (Ed.). Trigo no Brasil: temas e debates do século 21. Passo Fundo: O Nacional, p. 26–27, 2005.

NOGUEIRA, S. I.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

ORO, T. **Adaptação de métodos para avaliação da qualidade tecnológica de farinha de trigo integral**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen – Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Science**, Göttingen, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

PEREIRA, L. J. A. **Estratégias para o controlo de Ocratoxina A em alimentos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho - Braga, Portugal - 2008.

PRANGE, A.; BIRZELE, B.; KRAMER, J.; MEIER, A.; MODROW, H.; KOHLER, P. Fusarium-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality relation to infection time. **Food Control**, p. 739-745, 2005.

RAGAEI, S.; ABDEL-AAL, EL-S. Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. **Food Chemistry**, v. 95, p. 9-18, 2006.

RAZALI, N. M.; WAH, Y.B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. **Journal of Multivariate Analysis**, v. 2 p. 23-33, 2011.

REICHERT, B.; KOK, A.; PIZZUTTI, R.I.; SCHOLTEN, J.; CARDOSO, D.C.; SPANJER, M. Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in race coffee without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analyses. **Analytica Chimica Acta**, v.1004, p. 40-50, 2018

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C.; **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova. V,27, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, M. N. **Influência do tempo de condicionamento do trigo na qualidade tecnológica da farinha**. 2009. 79 p. UFCE Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2009.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R.P. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. Química Nova, V.31, p. 164-171, 2008.

RICHARD, J. L. **Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview.** International journal of food microbiology, v. 119, p. 3–10, 2007.

RODRIGUES, Juan Carlos; MALINARICH, Hector Manuel. **Desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas em milho armazenado em bolsas plásticas inoculado com esporas de Arpergillus spp. Grãos da semana ao consumo Brasil.** Maringá, ano 9, n. 41, março/abril 2010.

SANCO, Commission of the european communities (2003). Document n° SANCO/12571/2013. **Guidance documento on analytical quality control and validation proceduces for pesticide residues analysis ih food and feed.** 2013. 42p.

SCHEUER, P. M. et al. **Trigo: características e utilização na panificação.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 13, n. 2, p. 211–222, 2011.

SCHIMIDT, M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Impact of post-harvest degradation of wheat gluten proteins by Fusarium culmorum on the resulting bread quality. **Eur Food Res Technol.** p. 1609-1618, 2017.

SINGH, S; SINGH, N; MACRITCHIE, F. Relationship of polymeric proteins with pasting, gel dynamic-and dough empirical-rheology in different Indian wheat varieties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 2011.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C. do; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul.** 2 ed. Porto Alegre: EMATER/RS, UFRGS, 2008. 222 p.

SHOLTEN, O. E. et al. **Food safety of cereals: A chain-wide approach to reduce Fusarium Mycotoxins.** European Union: s.n., 2002. p. 108

SOBROVA, P. et al. **Deoxynivalenol and its toxicity. Interdisciplinary toxicology**, v. 3, n. 3, p. 94–99, 2010.

SPOLTI, P. et al. **Single and sequential applications of metconazole alone or in mixture with pyraclostrobin to improve Fusarium head blight control and wheat yield in Brazil.** Tropical Plant Pathology, v. 38, n. 2, p. 85–96, 2013.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S. e PILETSKY, S. A. **Analytical methods for determination of mycotoxins: a review.** Analytica chimica acta, v. 632, p. 168–80, 2009.

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

TIBOLA, C. S. et al. **Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 11. Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo, p. 40, 2013.

WHITAKER, T. B. et al. **Sampling procedures to detect mycotoxins in agricultural commodities**. First ed. London: Springer, p. 57, 2010.

WOLF-HALL, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. International **Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, v. 119, n. 1-2, p. 89-94, 2007.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999.

ZANELLA, R.; ADAIME, M.B.; PRESTES, O.; **QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos**. Scientia Chromatographica, v.3, p. 51-64, 2011.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Validação de método para determinação de desoxinivalenol e a sua influência na qualidade tecnológica da farinha

Daniela S. Honnef Gai^a, Tatiana Oro^a, Maria T. Friedrich^a, Luiz C. Gutkoski^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, BR 285, CEP 99052-900, Passo Fundo, RS, Brasil.

Resumo

Os principais fungos que atacam o grão de trigo são do gênero *Fusarium*, o qual provoca doenças como giberela levando diretamente a perdas de produtividade e qualidade do produto final. Além dos danos causados pela giberela o trigo pode apresentar contaminação pela micotoxina desoxinivalenol (DON), que se desenvolve através do metabolismo secundário do fungo *Fusarium*, sendo considerada tóxica para humanos e animais. A fim de minimizar a presença deste contaminante no grão a agricultura tem utilizado fungicidas buscando o controle satisfatório do fungo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência da micotoxina desoxinivalenol no trigo submetido a aplicação de fungicidas e a qualidade tecnológica deste produto para panificação. Todas as amostras apresentaram contaminação pela micotoxina DON e não foram encontrados resíduos de fungicidas acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. Através de todas análises físico-químicas realizadas nos grãos e na farinha, bem como as reológicas, conclui-se que, nos níveis de DON encontrados nas amostras, não alteram a qualidade tecnológica da farinha integral de trigo.

Palavras-chave: triticum. DON. qualidade tecnológica

Abstract

The main fungi that attack the grain of wheat are of the genus *Fusarium*, which causes diseases like giberela leading directly to losses of productivity and quality of the final product. In addition to the damages caused by gibberella, the wheat may be contaminated by the mycotoxin deoxynivalenol (DON), which develops through the secondary metabolism of *Fusarium* fungus, being considered toxic to humans and animals. In order to minimize the presence of this

contaminant in the grain, the agriculture has used fungicides seeking the satisfactory control of the fungus. This work aimed to evaluate the incidence of mycotoxin deoxynivalenol in wheat submitted to fungicide application and the technological quality of this product for baking. All samples showed contamination by DON mycotoxin and no fungicide residues were found above the maximum limit established by Brazilian legislation. Through all the physical-chemical analyzes carried out on the grains and flour, as well as the rheological ones, it is concluded that, in the DON levels found in the samples, they do not alter the technological quality of the whole wheat flour.

Keywords: triticum. DON.technical quality

1 Introdução

O grão de trigo é uma importante matéria-prima para a elaboração de alimentos consumidos diariamente, como hábito alimentar, na forma de pães, biscoitos, bolos e massas, alimentos que fazem parte da base da pirâmide alimentar (SCHEURER et al., 2011). Durante seu ciclo na lavoura o trigo pode ser contaminado por diversas doenças, que são desencadeadas em função das condições climáticas e susceptibilidade das cultivares. A giberela é uma doença que ocorre com frequência neste grão, causada pelos fungos do gênero *Fusarium*, causando danos e perda de produtividades, danos estes que incluem a redução no teor de proteínas nos grãos, redução do poder germinativo e vigor das sementes, além da contaminação com toxinas sintetizadas pelo fungo (WOLF-HALL, 2007).

Dentre as micotoxinas produzidas a desoxonivaleol (DON) é a de maior relevância na cultura do trigo por ser amplamente distribuída e poder ser encontrada em altos níveis de concentração (GUTERRES, 2013). Uma das propriedades físico-químicas mais importantes desta micotoxina é a sua capacidade de resistir a altas temperaturas, o que aumenta os riscos da sua ocorrência em alimentos. Devido a sua estabilidade a altas temperaturas apresenta alto risco de permanência em alimentos processados (DÖLL e DÄNICKE, 2011), como bebidas, farinhas, produtos de panificação em geral, cereais matinais e alimentos infantis (CREPPY, 2002). Para reduzir esses problemas são utilizados fungicidas, no entanto, estes podem permanecer nos grãos e nos derivados, podendo colocar em risco a saúde dos consumidores (TIBOLA et al., 2013).

Diante deste contexto este trabalho visa avaliar a incidência da micotoxina DON no trigo submetido a aplicação de fungicidas e a qualidade tecnológica deste produto para

panificação. Para análise de micotoxinas e fungicidas se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que possuam baixos limites de detecção, alta sensibilidade e laboratórios especializados. O método que está sendo amplamente utilizado para a análise de micotoxinas e fungicidas, por promover rápida extração e purificação, é o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, Safe*) que juntamente com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) tem potencializado a qualidade dos resultados devido a determinação simultânea de resíduos e contaminantes, considerando seu bom desempenho em termos de exatidão, precisão, sensibilidade e reprodutibilidade (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009), e a possibilidade de informação estrutural e massa molar, com aumento de seletividade (CHIARADIA, 2008; DONATO et al., 2012).

A farinha de trigo, por ser um produto do beneficiamento da matéria-prima alimentar em estado bruto, é considerada um produto alimentício passível de sofrer alterações na sua qualidade nutricional e tecnológica. As diferenças de peso hectolitro, força geral do glúten, tempo de mistura, estabilidade da massa, porcentagem de mistura de grãos danificados, além do teor/quantidade de micotoxinas e presença de resíduos de agrotóxicos (GUTKOSKI, NETO, 2002), podem determinar a qualidade do produto final. A realização de testes físico-químicos, bem como análises reológicas na farinha de trigo pode determinar se a contaminação por resíduos e contaminantes altera a qualidade da mesma, resultando em um produto final de baixa qualidade.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

A determinação de DON e dos princípios ativos de fungicidas (carbendazin, tebuconazol, metconazol, mancozebe e piraclostrobina) foi realizada em amostras de experimento de campo realizado com 12 tratamentos e 3 blocos, que são as replicatas (Tabela 2). O trigo utilizado no experimento de campo foi o da cultivar TBIO Toruk[®] (trigo pão/melhorador) com força geral de glúten (W) de 320, em média e moderadamente suscetível a giberela. Foram depositados grãos de trigo contendo peritécios do fungo *Gibberella zeae* inoculados artificialmente na quantidade de 7 g.m² por parcela quando surgiram as primeiras espigas visíveis. As parcelas foram irrigadas durante todo o florescimento da cultura, com sistema de formação de neblina sob as espigas. Os tratamentos para o controle de giberela foram feitos quando as plantas de trigo estavam no início do florescimento e florescimento até o topo da espiga.

As amostras foram submetidas a etapa de limpeza em equipamento de laboratório e moídas em moinho de laboratório (3100, Perten Instruments, Suécia) para obtenção da farinha de trigo de grão inteiro e armazenadas em freezer até o momento da utilização.

2.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

Acetato de sódio anidro p.a. (Química Moderna, Brasil); Acetato de amônio (Vetec, Brasil); acetonitrila grau HPLC (Merck, Brasil); ácido acético glacial 99,9% (Anidrol, Brasil); água ultrapura, purificada em sistema Milli - Q[®] (resistividade de 18,2 mΩ cm⁻¹) (Millipore, EUA), detergente Detertec[®] neutro (Vetec, Brasil), gás argônio usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS com 99,9999% de pureza (Air Products, Brasil), metanol grau HPLC (J.T Baker, EUA); sorvente Bondesil C18 com tamanho de partícula 40 μm, (Agilent, EUA); sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA). Os padrões dos compostos estudados foram adquiridos da companhia Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha) e utilizado para a micotoxina DON o da marca Sigma-Aldrich. Para os fungicidas Piraclostrobina foi utilizado o da marca Sigma-Aldrich, Carbendazim, marca Aksci, Metconazole e Tebuconazol, da marca Trc Canada.

2.2.1 Preparo das soluções

Preparou-se inicialmente as soluções analíticas na concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila, de cada princípio ativo, individualmente. Foi medida a massa de todos os reagentes sólidos, considerando seu grau de pureza. A partir das soluções de concentração 1000 mg L⁻¹, preparou-se 50 mL de uma solução de trabalho na concentração 5 mg L⁻¹ contendo todos os analitos. Esta solução foi utilizada para o estudo da linearidade do método e para os ensaios de fortificação. A partir da mistura 5,0 mg L⁻¹, foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 200, 250, 350, 400, 500 e 600 μg L⁻¹ para a micotoxina DON e 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500 e 600 μg L⁻¹ para os fungicidas em estudo em acetonitrila:água (70:30) v/v e no extrato da matriz avaliada.

2.2.2 Instrumentação

O desenvolvimento do método e a análise da micotoxina DON e dos fungicidas estudados em amostras de farinha de trigo de grão inteiro foi realizado no sistema LC-MS/MS utilizando cromatografia em fase reversa utilizando coluna analítica XR-ODS III (150 x 2,0 mm x 2,0 μm), marca Shimadzu, fase móvel utilizada teve como referência o pacote de método do fornecedor LC/MS/MS *Method Package* e constituída de: Fase móvel A: acetato de amônio

5 mmol L⁻¹ e B: metanol com 5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. Vazão da fase móvel: 0,3 mL min⁻¹; Volume de injeção: 10 µL; Fonte de ionização: ESI; Analisador de massas do tipo triplo quadrupolo, operando no modo MS/MS; Tempo da análise cromatográfica: 15 min; Temperatura da coluna: 40 °C; Voltagem capilar: 4,5 kV; Temperatura de dessolvatação: 400 °C; Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹; Vazão do spray: 80 L h⁻¹; Vazão do gás de colisão (Argônio): 0,10 mL min⁻¹; Temperatura da fonte: 150 °C. A espectrometria de massas em série foi utilizada para a operação do equipamento, no modo de varredura SRM e ionização por eletronebulização no modo positivo.

2.3 Validação de parâmetros analíticos

O método foi validado para micotoxina desoxinivalenol e para os fungicidas carbendazin, tebuconazol, metconazol, mancozebe e piraclostrobina em grão de trigo. Para a validação do método analítico foram utilizados os seguintes parâmetros: linearidade e curva analítica, efeito matriz, limite de quantificação e limite de detecção, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo INMETRO (2016).

2.3.1 Curva analítica

A curva analítica foi preparada contendo a micotoxina DON e os fungicidas em estudo. As soluções para obtenção da curva analítica foram injetadas em triplicata nas concentrações de 200, 250, 350, 400, 500 e 600 µg L⁻¹ para a micotoxina DON e 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500 e 600 µg L⁻¹ para os fungicidas. Posteriormente foi realizado o cálculo da média das áreas e a avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos foi determinada utilizando o teste de Anderson-Darling. Para estimar os parâmetros da regressão foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários e gráficos de resíduos (erros) da regressão que foram construídos e analisados para investigar se os dados demonstraram homocedasticidade ou desvio de linearidade. O extrato foi obtido conforme item 2.4.

2.3.2 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Para avaliar a exatidão foram realizadas fortificações com a mistura de fungicidas estudados nas concentrações de 50, 200 e 600 µg L⁻¹ e para a DON nas concentrações 200, 400 e 600 µg L⁻¹ na etapa de preparo de amostra. Os ensaios de fortificação foram realizados utilizando a amostra de trigo “branco”. O procedimento de extrações fortificadas foi realizado em triplicata para cada um dos níveis de fortificação.

2.3.3 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Os resultados obtidos foram inicialmente avaliados utilizando o teste de Grubbs a fim de verificar a presença de valores extremos (GRUBBS, 1969; BURKE, 2001). Foi utilizado o teste para um valor extremo (G_1) ou dois valores extremos (G_2). A indicação de valor extremo por um dos testes foi suficiente para remoção do dado. O teste de Grubbs foi aplicado até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

Para avaliar a precisão do método em termos de repetibilidade foram realizadas 8 extrações da amostra de trigo “branco” que foram fortificadas com o padrão misto de fungicidas e DON na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ e injetadas em triplicata. Os resultados foram avaliados pela equação de HorRat, (WOOD, 1999) nas replicatas das amostras adicionadas em cada nível de concentração. Este parâmetro foi considerado adequado quando os valores foram menores que 2 (INMETRO, 2016).

A precisão intermediária do método foi avaliada realizando o procedimento analítico em 8 repetições na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ injetadas em triplicata, comparando os resultados entre dois diferentes analistas. Os dados foram estatisticamente avaliados utilizando teste t pareado para estes três níveis de fortificação e em quatro replicatas dos resultados das recuperações. Foram considerados resultados significativamente iguais os valores que não apresentaram diferença estatística no nível de 5%.

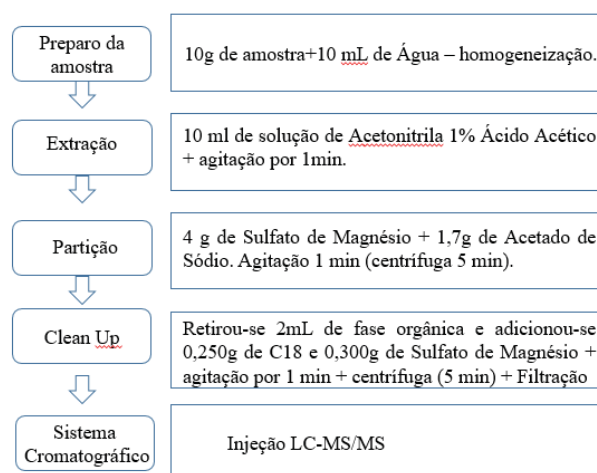
2.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação, LQ_m , do método foi considerado como sendo a menor concentração que, fortificada na matriz, apresentar resultados de recuperação entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20%. A partir destes valores, o limite de detecção do método, LD_m , foi determinado como sendo a concentração 3,33 vezes menor que o LQ_m (SANCO, 2013).

2.4 Método de Extração

O método de extração foi baseado no método proposto por Anastassiades et. al., (2003). A figura 1 apresenta as etapas de extração realizadas para validação do método e quantificação da micotoxina DON e fungicidas, utilizando método QuEChERS com adaptações.

Figura 1: Método de extração por QuEChERS com adaptações.



2.5 Caracterização Físico-Química da FTGI

A determinação do teor de umidade foi realizada de acordo o método nº 44-15.02 da AACC (2010), em estufa com circulação de ar a 130 °C por uma hora. O teor de proteína bruta foi determinado pelo analisador NIRS (DS 2500, FOSS, Dinamarca). O teor de cinzas foi realizado de acordo com o método nº 08-12.01 da AACC (2010) e corresponde ao resíduo obtido por incineração em temperatura de 550 °C por 5 h. O teor de glúten foi realizado de acordo com o método nº 38-12.02 da AACC (2010), em Sistema Glutomatic (2100, Perten Instruments, Suécia), obtendo os valores de índice de glúten e glúten úmido. Para as farinhas integrais de grão inteiro foi empregada a peneira fina de poliéster usualmente utilizada neste método (de 88 µm de abertura) durante 120 segundos, até que a massa fosse formada. Após este período, foi utilizada peneira de abertura maior (840 µm) para que fosse possível a eliminação das camadas fibrosas das farinhas integrais durante o restante do período de lavagem.

2.6 Caracterização reológica da FTGI

As análises de propriedades de mistura foram realizadas em equipamento Promilógrafo (T6-E, Koloman Egger, Áustria), de acordo com o método nº 54-21.02 da AACC (2010), utilizando 200 g de FTGI corrigida para a umidade de 14%. Os parâmetros avaliados foram

absorção de água, tempo de desenvolvimento da massa, índice de tolerância à mistura e estabilidade da massa. As propriedades de pasta foram avaliadas em equipamento viscosímetro (RVA-3D, Newport Scientific, Austrália), equipado com software *Termocline for Windows*, versão 3.1, de acordo com o método nº 76-21.01 da AACC (2010) e realizado em duplicata. Foram utilizados aproximadamente 3,5 g de farinha corrigidos para 14% de umidade e 25±0,1 mL de água destilada. O perfil de temperatura *Standard 1* foi empregado, em que as amostras são mantidas a 50 °C por 1 minuto, aquecidas até 95 °C em 3,5 minutos e mantidas nesta temperatura durante 2,5 minutos, resfriadas a 50 °C em 3,8 minutos e mantidas nesta temperatura até completar o tempo total de 13 minutos de análise. Os parâmetros considerados foram: viscosidade máxima, viscosidade mínima à temperatura constante, quebra e tendência à retrogradação.

2.7 Análise estatística

Os resultados de quantificação de DON, de fungicidas e de qualidade tecnológica das amostras de FTGI foram analisados estatisticamente pela determinação da análise de variância (Anova) e nos modelos significativos as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 95% de intervalo de confiança, com o emprego do programa computacional SASM-Agri.

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Curva analítica

O INMETRO recomenda a curva analítica com no mínimo cinco níveis de concentração, assim como a União Europeia (BRASIL, 2016, DIRECTIVE 657, 2002). Neste trabalho foram preparadas curvas com cinco níveis de concentração para a micotoxina DON e com onze níveis de concentração para os fungicidas estudados. Os dados do teste de linearidade da curva no extrato branco da matriz se mostraram adequados apresentando valores superiores as 0,99 para o coeficiente de determinação (R^2) atendendo a recomendação da (INMETRO, 2016).

3.2 Exatidão (Recuperação)

Os parâmetros de exatidão e recuperação dos analitos foram avaliados através da injeção de três níveis de concentração em oito repetições. Os resultados mostraram que o procedimento

tem boa recuperação para os analitos estudados. Todos os níveis de fortificação apresentaram recuperação entre 85 e 120%. O INMETRO (2016) e SANCO (2013) estabelece a faixa aceitável entre 70% e 120% e a AOAC (2002) recomenda entre 70% a 125% para analitos em concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3.3 Precisão

A avaliação da precisão instrumental foi obtida a partir da repetitividade e da precisão intermediária. O método apresentou repetitividade, pois os resultados do teste ficaram menores que o valor de referência. O parâmetro é considerado aceitável quando o resultado do teste de $\text{for} < 2$ (AOAC, 2016).

3.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação do método, obtido como sendo o menor nível de fortificação, foi de 50 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o limite de detecção do método, de concentração 3,33 vezes menor que este valor. Os limites de detecção e quantificação determinados para o procedimento são adequados para atender a legislação vigente para os princípios ativos recomendados para a cultura do trigo.

3.5 Quantificação de micotoxina DON e fungicidas

As amostras avaliadas apresentaram diferentes níveis contaminação por DON (Tabela 1). Sabe-se que no processamento da farinha a nível industrial partes do grão de trigo como o farelo, onde se encontram os maiores níveis de contaminação, e o gérmen, são removidas reduzindo a concentração de micotoxinas (NOGUEIRA e OLIVEIRA, 2006). Assim os níveis de contaminação por DON encontrados nas amostras deste estudo podem ser justificados devido à utilização do grão inteiro durante o processo de moagem, que seriam menores se fossem analisados em farinha refinada.

Os teores de DON encontrados estão dentro dos limites toleráveis estabelecidos pela RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017 (BRASIL,2017), evidenciando a eficácia dos tratamentos com fungicidas. Este resultado pode ser comprovado pela avaliação da amostra T1-testemunha que apresentou valores acima do permitido pela legislação, devido ao não uso do controle químico durante a fase de floração e desenvolvimento da cultura.

Quando comparados os tratamentos, observou-se que a utilização do fungicida carbendazim apresentou melhor efeito na redução nos níveis de DON (tratamentos T3, T4, T5 e T6). A utilização em sequência de carbendazim + tebuconazol – T4 ou carbendazim + tebuconazol e piraclostrobina, nesta ordem, apresentaram redução do valor de DON quando comparadas as amostras T5 e T6, possivelmente pelo menor controle obtido pela utilização de piraclostrobina + metconazol em sequência ou na primeira aplicação. Na comparação das amostras T5 e T8, podemos observar que a combinação de mancozebe + tebuconazol na segunda aplicação apresentou melhor controle de DON quando comparado a carbendazim + tebuconazol. Isto pode ser explicado a diversas características da molécula do mancozebe em apresentar propriedades químicas em reduzir os efeitos fitotóxicos que podem ser gerados na utilização de triazóis em diversas culturas (BALARDIN et. al., 2017). Ressalta-se que a aplicação de mancozebe + tebuconazol na primeira aplicação foi inferior efetivamente a utilização de carbendazim + tebuconazol na mesma.

A combinação de carbendazim + mancozebe – T10 em sequência mostrou-se mais eficiente no controle de DON do que todos os outros tratamentos realizados. Em análise ao restante dos resultados de controle de DON, e comparando os diferentes posicionamentos dos fungicidas nas aplicações, a utilização de carbendazim + tebuconazol em sequência com carbendazim + mancozebe possivelmente apresentaria satisfatórios resultados de eficácia de controle de DON na cultura do trigo.

Os resultados dos resíduos de fungicidas estudados neste trabalho em FTGI nos 12 diferentes tratamentos apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método, com exceção do fungicida mancozebe que não foi possível sua quantificação devido as suas características poliméricas e dificuldade de solubilização deste composto.

Tabela 1: Valores encontrados da micotoxina DON (em $\mu\text{g Kg}^{-1}$) na FTGI.

Amostras	DON
T1(testemunha)	7084,75 ^a ±37,29
T2	451,245 ^b ±95,12
T3	309,222 ^c ±185,47
T4	224,754 ^c ±109,34
T5	301,198 ^c ±192,89
T6	176,281 ^c ±96,84
T7	539,863 ^b ±257,62
T8	233,925 ^c ±171,72
T9	525,155 ^b ±363,71
T10	154,181 ^c ±94,34
T11	505,307 ^b ±142,03
T12	479,805 ^b ±135,62

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott. Resultados expressos como média de três determinações \pm desvio padrão.

3.6 Caracterização físico-química da FTGI

A Tabela 2 apresenta a caracterização química das amostras de FTGI. Os teores de umidade nas amostras analisadas estão dentro do limite estipulado na legislação brasileira (BRASIL,2005), a qual estabelece que o mesmo não deve ser superior a 15%. Os valores encontrados de proteínas e cinzas estão de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Farinha de trigo nº 8, de 02 de junho de 2005 (BRASIL, 2005) que estipula para farinha de trigo Tipo 1 teor mínimo de 7,5 % de proteínas e máximo 0,8% de cinzas. Embora a legislação não estabeleça padrões para FTGI, está se encontra dentro dos limites estipulados para farinha de trigo como integral, ou seja, mínimo de 8,0% proteínas e máximo de 2,5% cinzas. Analisando os diferentes resultados obtidos através da análise de proteínas nos diferentes tratamentos observou-se que não houve relação entre a concentração de DON e o teor de proteínas entre os tratamentos que tiveram a ação dos fungicidas. O T1-testemunha diferiu dos demais apresentando um teor maior de proteína, acredita-se que devido a formação de proteína fúngica, visto que este foi o tratamento que apresentou as maiores concentrações de DON, ou seja, quando os tratamentos com fungicidas foram efetivos, o fungo não interferiu na formação de proteínas pelo grão.

Tabela 2: Caracterização físico-química da FTGI.

Amostras	Umidade (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
T1	13,85 ^a ±0,49	12,30 ^a ±0,01	1,46 ^b ±0,03
T2	14,08 ^a ±0,16	11,94 ^b ±0,09	1,14 ^e ±0,01
T3	13,37 ^a ±0,31	11,57 ^e ±0,03	1,24 ^d ±0,04
T4	14,54 ^a ±1,20	11,74 ^c ±0,06	1,32 ^c ±0,02
T5	14,30 ^a ±0,13	11,90 ^b ±0,01	1,42 ^b ±0,01
T6	14,20 ^a ±0,12	11,91 ^b ±0,02	1,40 ^b ±0,07
T7	14,22 ^a ±0,19	11,76 ^c ±0,02	1,42 ^b ±0,09
T8	14,16 ^a ±0,16	11,92 ^b ±0,06	1,43 ^b ±0,07
T9	14,00 ^a ±0,16	11,90 ^b ±0,01	1,56 ^a ±0,02
T10	13,91 ^a ±0,18	11,66 ^d ±0,05	1,07 ^e ±0,04
T11	14,03 ^a ±0,15	11,37 ^f ±0,02	1,13 ^e ±0,01
T12	14,24 ^a ±0,08	11,30 ^f ±0,05	1,08 ^e ±0,09

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Skot-Knott. Resultados expressos como média de três determinações ± desvio padrão.

3.7 Análises reológicas da FTGI

As 12 diferentes amostras de FTGI não apresentaram diferença significativa para absorção de água. Em relação a contaminação por DON os resultados demonstram que a mesma não interferiu na absorção de água, já que a amostra T1- testemunha que apresentou a maior concentração de micotoxina não apresentou diferença das demais.

Além disso o presente estudo utilizou FTGI, contendo uma grande quantidade de fibras, a presença das mesmas pode causar aumento na absorção de água (AHMED, et. al., 2013)

Para o tempo de desenvolvimento de massa as amostras não apresentaram diferença significativa, variando de 4 a 5 minutos desde a adição de água necessária até o completo desenvolvimento do glúten atingindo a máxima consistência, pode-se explicar estes resultados, como consequência dos valores de absorção de água, por se tratar de FTGI a presença de fibras

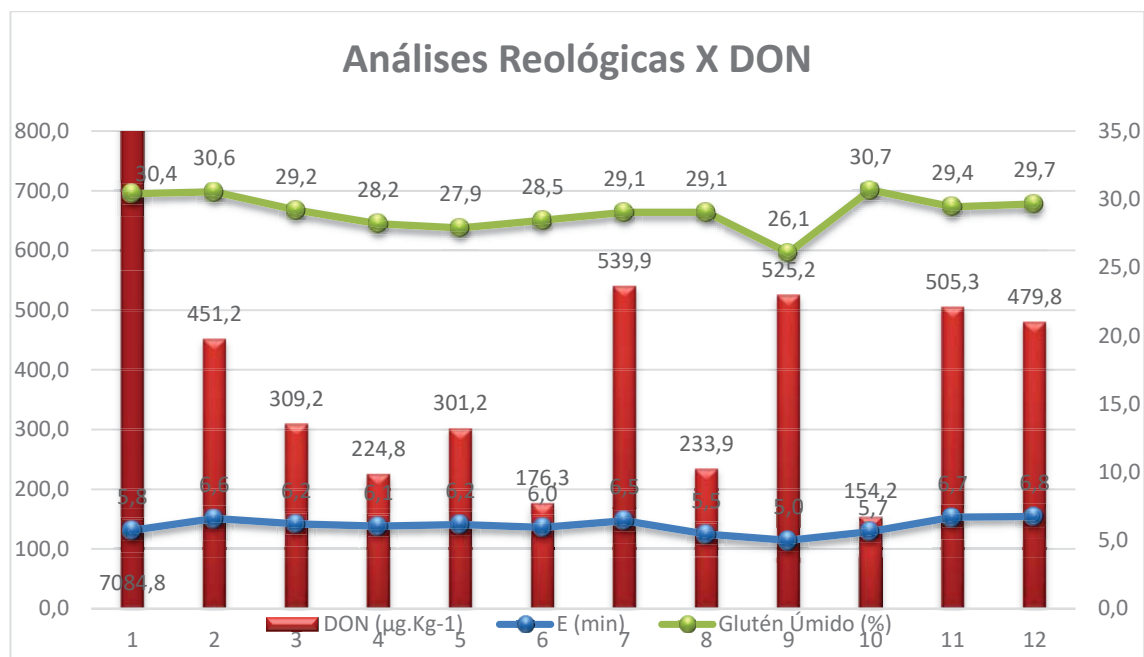
que pode causar aumento na absorção de água também pode levar ao maior tempo de desenvolvimento de massa.

No parâmetro de estabilidade a amostra T9 apresentou diferença quando comparada as demais amostras, o mesmo ocorreu com o teor de glúten úmido encontrado como ilustra a Figura 2. Em relação a micotoxina DON, verifica-se que não existe relação direta com a estabilidade e glúten úmido, já que a testemunha apresentou os maiores valores de contaminação e alto valor de glúten, não diferiu estatisticamente nos resultados de estabilidade das demais amostras. Antes et. al., (2001) também não observaram diferença significativa nos resultados de estabilidade de massa e glúten em amostras contaminadas por DON em comparação com as amostras controle. Este menor valor de estabilidade de massa da amostra T9 pode estar relacionado diretamente com o seu menor valor de glúten úmido, ou seja, a amostra apresentou menor resistência ao amassamento, devido a menor agregação das proteínas de glúten.

Neste estudo, o tempo de estabilidade em todas as amostras foi inferior a 7,5 min, o que já era esperado, por se tratar de FTGI. Bressiani (2016), obteve redução no tempo de estabilidade das amostras de farinhas que continham partes externas do grão de trigo em comparação com a farinha refinada.

Para os valores de índice de tolerância a mistura não houve diferença significativa. Sabe-se que quanto maior for o índice de tolerância à mistura, mais fraca será classificada a farinha (Junqueira et. al., 2007), conseqüentemente menos tolerante a mistura, obtendo-se menor tempo de estabilidade de massa e maior ITM, similarmente ao obtido nos resultados das amostras de farinha integral por ORO (2013).

Figura 2: Relação entre os parâmetros estabilidade de massa, glúten úmido e micotoxina desoxinivalenol.

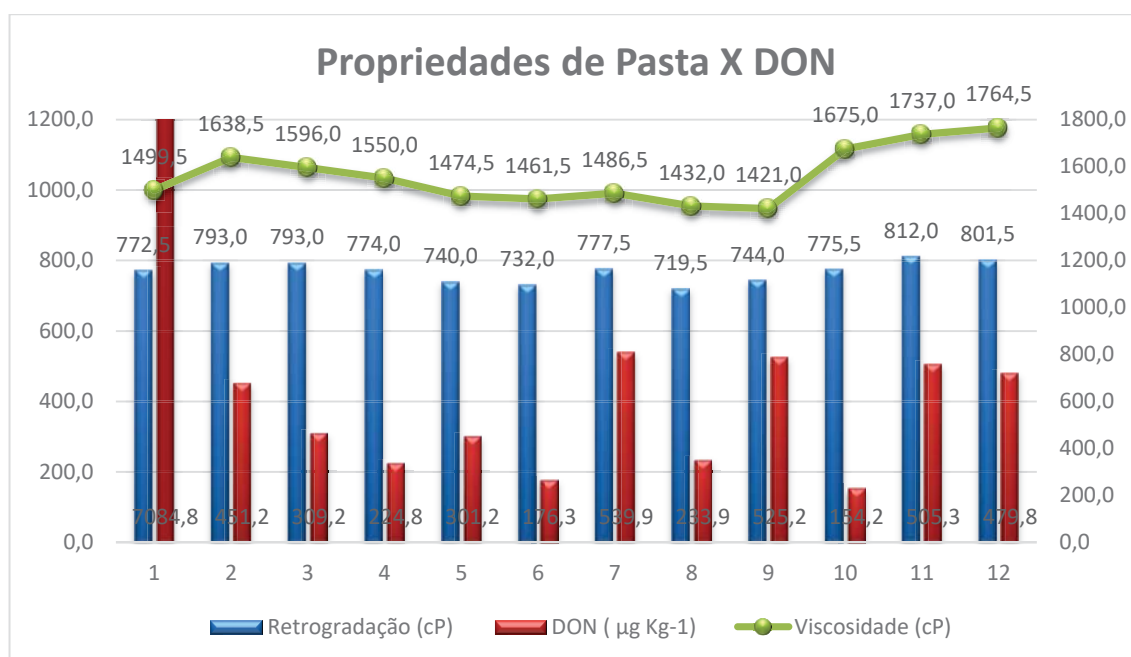


Os resultados encontrados para viscosidade máxima reflete a extensão da gelatinização do grânulo de amido na presença de água e aquecimento, fornece uma indicação da carga viscosa susceptível a ser produzida durante a mistura (MIN et al., 2010). A partir da análise dos resultados obtidos e do gráfico representado na Figura 3, percebeu-se variabilidade de valores, porém não é possível afirmar que esta variação esteja relacionada diretamente aos diferentes níveis de DON encontrados nas amostras. Percebe-se que as amostras T11 e T12 apresentaram os maiores valores de viscosidade máxima e também maior concentração de DON, quando comparadas as amostras T2 e T10, porém a T1- testemunha que apresentou a maior concentração de micotoxina DON não obteve maior valor de viscosidade máxima.

Os valores de quebra encontrados nas amostras seguem a mesma tendência da viscosidade máxima. As amostras T10, T11 e T12 que obtiveram os maiores valores de viscosidade máxima, também apresentaram os maiores valores de quebra, diferindo das demais.

A partir da análise dos resultados os parâmetros de viscosidade final e retrogradação seguem a mesma tendência em todas as amostras e de forma mais evidente nas amostras T11 e T12 que apresentaram os maiores valores de viscosidade final, foram as que obtiveram os maiores valores de retrogradação. Em relação as diferentes concentrações da micotoxina DON, não se pode constatar que a mesma influenciou nestes resultados, devido ao fato que amostras com maiores concentrações de micotoxina não obtiveram, aumento de retrogradação.

Figura 3: Relação entre os parâmetros de viscosidade máxima, retrogradação e micotoxina desoxinivalenol.



4.0 Conclusões

Todos os parâmetros de validação do método analítico para identificação e quantificação por LC-MS/MS ficaram dentro dos limites estipulados pelo INMETRO, sendo possível utilizá-lo para o monitoramento da micotoxina desoxinivalenol, e dos fungicidas carbendazin, tebuconazol, metconazol, piraclostrobina em farinha de trigo de grão inteiro.

As amostras da cultivar Toruk® apresentaram diferentes níveis de contaminação pela micotoxina DON e não foram detectados, em nenhum dos tratamentos, resíduos de fungicidas acima do limite máximo estabelecido pela ANVISA.

Através das análises físico-químicas realizadas nos grãos e na farinha, bem como as reológicas, conclui-se que, nos níveis de DON obtidos para as amostras, não houve alterações na qualidade tecnológica da farinha de trigo de grão inteiro contaminada por DON. Estes resultados refletem a importância do cumprimento dos limites estabelecidos pela legislação, assim garantindo maior segurança alimentar para o consumidor.

A partir dos testes realizados neste trabalho, as quantificações de DON e resíduos de fungicidas assim como as de cunho de qualidade tecnológica da farinha, fica evidente a importância de trabalhos que envolvam desde o plantio sob condições adequadas e de monitoramento juntamente com o desenvolvimento de trabalhos em laboratórios que possuam equipamentos e condições adequadas, obtendo-se assim resultados confiáveis.

5.0 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao apoio financeiro e às bolsas de estudo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Educação Superior (CAPES) para a bolsa de estudo.

Referências

- SCHEUER, P. M. et al. **Trigo: características e utilização na panificação**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 13, n. 2, p. 211–222, 2011.
- WOLF-HALL, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdã, v. 119, n. 1-2, p. 89-94, 2007.
- GUTERRES, C. W. **Giberela do trigo, inimigo nem sempre perceptível**. CCGL Info, v. Ano IV, n. 23, Cruz Alta - RS, p. 22, 2013.
- CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, v. 127, n. 1-3, p. 19–28, 2002.
- DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 2, p. 132-145, 2011.
- TIBOLA, C. S. et al. **Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 11. Passo Fundo - RS: Embrapa Trigo, p. 40, 2013.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food *Química Nova*, v. 31, p. 623-632, 2008.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008 rev 05**. Rio de Janeiro. 28 p. 2016.
- ANASTASSIADES, M. e LEHOTAY, S. 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 AOAC International*, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.
- AACC - AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods of Analysis**,. 11^a.ed., 2010. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A.
- SANCO, Commission of the european communities (2003). Document n° SANCO/12571/2013. **Guidance documento on analytical quality control and validation proceduces for pesticide residues analysis ih food and feed**. 2013. 42p.

AOAC – **Official methods of analysis of AOAC international**, 19th, edition, apêndice D, 2016.

NOGUEIRA, S. I.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

BALARDIN, S. R.; MADALOSSO, G. M.; STEFANELLO, T. M.; MARQUES, N. L.; DEBORTOLI, P. M. **Mancozebe muito além de um fungicida**. Porto Alegre-RS, 1º Ed. 2017.

ROOZENDAAL, H.; ABU-HARDAN, M.; FRAZIER, R. A. Thermogravimetric analysis of water release from wheat flour and wheat bran suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 4, p. 606-611, 2012.

PIEKARSKI, Flávia Vilas Boas Wiecheteck. **Folha de abóbora: Caracterização Físico-Química, mineral e efeito da adição na reologia da massa e na qualidade sensorial de pães contendo fibra alimentar**. Curitiba- PR, 2009.

VÁZQUEZ, D. Aptitud Industrial de Trigo. **Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología Del INIA**. Série Técnica, v. 177, p. 8–32, 2007.

MELLADO, M. Z. **El trigo em Chile**. INIA nº 121. 684 p. Instituto de investigaciones agropecuárias. Chillá, Chile, 2006.

BRESSIANI, J. **Qualidade da farinha de trigo de grão inteiro em resposta a influência de diferentes tamanhos de partículas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2016.

ORO, T. **Adaptação de métodos para avaliação da qualidade tecnológica de farinha de trigo integral**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MIN, B.; BAE, I.Y.; LEE, H. G.; YOO, S.; LEE, S. Utilization of pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5414-5418, 2010.