



FURG

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA MULTICLASSE DE
MICOTOXINAS EM CERVEJA**

Maicon Garcia

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA MULTICLASSE DE MICOTOXINAS EM CERVEJA

por

Maicon Fernandes Garcia

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

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil
2018

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA MULTICLASSE DE MICOTOXINAS EM CERVEJA

elaborada por

Maicon Fernandes Garcia

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG – RS)

Dr^a. Gabriela Lemos Mendes (FURG – RS)

Prof. Dr^a. Eliana Badiale Furlong (FURG - RS)

Rio Grande, 17 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por tudo ter acontecido da melhor maneira possível e por conseguir concluir as etapas deste trabalho. Agradeço imensamente a minha mãe que foi uma pessoa que me deu apoio nas horas difíceis.

Agradeço aos meus amigos mais próximos por me darem suporte nos dias difíceis e ouvir as minhas reclamações quando nem tudo saía como planejado. Então meu obrigado vai para vocês que me ajudaram com conselhos, ou mesmo com o silêncio me ouvindo. A cada um de vocês (Lise, Nicolas, Monize) quero que saibam que tem a minha eterna gratidão.

Gostaria de agradecer a minha chefe Jaque por todo o bom-humor e paciência comigo e por sempre ser tão compreensiva, especialmente pelas conversas que me fizeram refletir sobre muitas escolhas. Obrigado por acreditar em mim e ser tão parceira e humana. Obrigado por abrir as portas do laboratório, aprendi muito com você!!

Agradeço juntamente a professora Eliana por ser uma pessoa tão dedicada e sempre disposta a ajudar. Obrigado por tudo, se somos um grupo de pesquisa isso é graças a você por nos unir, então todos os prêmios que são ganhos apenas reconhecem com atitudes o sentimento de união desse grupo.

A Maristela tenho muito a agradecer, obrigado pela sua paciência, humildade e disposição a sempre a ajudar seja quem for. Maristela, gostaria de te dizer aquilo que sempre falo: “Você é um anjo sem asas”.

Agradeço aos meus colegas que sempre me ajudaram ao longo desses 2 anos. Obrigado Elisa por me ensinar tudo que sei e por ser sempre tão parceira, receptiva e divertida, a Carmen que é uma pessoa tão espontânea e divertida que me proporcionou muitas lembranças e risadas que são inestimáveis.

Obrigado também a Sabrina por ser essa pessoa que alegra a todos com a sua presença, tenho muito a te agradecer. A Karen por ser sempre tão positiva e por me ajudar bastante ao longo desse trabalho.

Obrigado a Kelly pelas informações e pela ótima companhia, a Marina por ser tão dedicada e preocupada com os colegas, ao meu grupo de estágio Rafael e Keven pela companhia, a Ana pela atenção, a Anelise pela companhia e por todas as bobagens ditas e pelas risadas soltas e a Tai pelas lembranças e risadas que

compartilhamos, além dos ensinamentos.

Aos colegas Wesclen, Marcy e Verônica agradeço pela companhia e pelos momentos que passamos juntos e pelas ótimas lembranças e histórias construídas. Meu último obrigado vai para meu aprendiz Diean, que foi uma das pessoas que mais me ajudou ao longo desse trabalho.

Ironicamente, algumas vezes o melhor a fazer é não dizer nada, porque o amar não significa sempre ter as palavras certas para oferecer, mas simplesmente estar ao lado dessa pessoa. Não busque ser o melhor, apenas faça seu melhor.

Autor desconhecido

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE APÊNDICES.....	10
LISTA DE SÍMBOLOS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 MICOTOXINAS.....	17
3.2 CEVADA MALTADA	22
3.2.1 CEREAIS MALTADOS.....	25
3.3 CERVEJA.....	26
3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE MICOTOXINAS.....	29
3.5 MÉTODO DE DETECÇÃO DE MICOTOXINAS	34
3.5.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 MATERIAIS	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1 RECUPERAÇÕES DO MÉTODO QuEChERS	47
5.2 RECUPERAÇÕES DO MÉTODO PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	50
5.3 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM AMOSTRAS DE CERVEJA.	53
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CERVEJA E CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAMINAÇÃO DE MICOTOXINAS	63
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de grupos de tricotecenos.....	19
Figura 2: Estrutura molecular das diferentes aflatoxinas.....	20
Figura 3: Estrutura molecular da Zearalenona.....	21
Figura 4: Estrutura molecular da Ocratoxina A.....	22
Figura 5: Gráfico da PCA para amostras de cerveja PM.....	63
Figura 6: Gráfico da PCA para amostras de cerveja com C N-M.....	64
Figura 7: Gráfico da PCA para amostras de cerveja com cereais C N-M + CV.....	64
Figura 8: Gráfico da PCA para amostras de cerveja com CV.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ocorrência de micotoxinas em cevada.....	23
Tabela 2: LMT de micotoxinas em cevada.....	24
Tabela 3: Ocorrência de micotoxinas em cereais.....	25
Tabela 4: Ocorrência de micotoxinas em cerveja.....	29
Tabela 5: Absortividades molares e comprimentos de onda de máxima absorbância de cada micotoxina em estudo.....	42
Tabela 6: Curvas de calibração de micotoxinas no solvente e na matriz.....	47
Tabela 7: Recuperações das micotoxinas em cerveja.....	48
Tabela 8: Resultados de recuperação para as micotoxinas em estudo utilizando o método QuEChERS otimizado.....	49
Tabela 9: Validação das figuras de mérito do método QuEChERS modificado.....	49
Tabela 10: Recuperações da Aflatoxina B ₁ em cerveja.....	50
Tabela 11: Recuperação para a extração por partição líquido-líquido de aflatoxinas.....	50
Tabela 12: Resultados das recuperações, LOQ e LOD para as aflatoxinas...	51
Tabela 13: Ocorrência de micotoxinas nas amostras coletadas.....	52
Tabela 13: Ocorrência de micotoxinas nas amostras PM.....	52
Tabela 13: Ocorrência de micotoxinas nas amostras C N-M.....	52
Tabela 13: Ocorrência de micotoxinas nas amostras C N-M + CV.....	53
Tabela 13: Ocorrência de micotoxinas nas amostras CV.....	53
Tabela 14: Tabela de correlações codificadas.....	65

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 1.....	89
Apêndice 2: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 2.....	89
Apêndice 3: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 3.....	90
Apêndice 4: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 4.....	90
Apêndice 5: Dados sem tratamento das amostras.....	91
Apêndice 6: Tabela de correlação do Grupo 1.....	92
Apêndice 7: Tabela de correlação do Grupo 2.....	93
Apêndice 8: Tabela de correlação do Grupo 3.....	94
Apêndice 9: Tabela de correlação do Grupo 4.....	95

LISTA DE SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila

AFLA – Aflatoxina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Associação Oficial de Química Analítica, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

CG – Cromatografia Gasosa

CL – Cromatografia Líquida

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

C N-M– Cereais não-maltados

CV – Carboidratos de origem vegetal

CODEX – *Codex Alimentarius*

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

DON – Deoxinivalenol

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization*

IARC – Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LMT – Limite Máximo Tolerado

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

NIV – Nivalenol

OTA – Ocratoxina

pH – Potencial hidrogeniônico

PLL – Partição Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

PM – Puro malte

QuEChERS – Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

UV – Ultravioleta ZEA – Zearalenona

3-ADON – 3-acetil-deoxinivalenol

15-ADON– 15-acetil-deoxinivalenol

RESUMO

Título: Determinação simultânea multiclasse de micotoxinas em cerveja

Autor: Maicon Fernandes Garcia

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

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos toxigênicos que podem contaminar diversos alimentos, entre eles a cevada que é utilizada como principal matéria-prima para a produção de cerveja. A contaminação da cerveja pode ser ocasionada devido a transferência de micotoxinas presente nas matérias-primas utilizadas para a fabricação da bebida que possuem características como termoestabilidade e solubilidade em água, o que ocasiona a contaminação do fermentado final devido as micotoxinas presentes na matéria-prima. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e otimizar um método para análise de tricotecenos, AFLAS, OTA e ZEA em cervejas comerciais e correlacionar a contaminação dessas micotoxinas com alterações nas propriedades físico-químicas e bioquímicas das amostras. A extração dos tricotecenos, OTA e ZEA foi realizado através do método QuEChERS otimizado e a determinação foi realizada por cromatografia de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector ultravioleta (UV). A extração das AFLAS foi realizada através do método de partição líquido-líquido (PLL) otimizado e a determinação foi realizada por CLAE acoplada a um detector de fluorescência (FL). Para garantir a confiabilidade do método foram avaliadas a exatidão, precisão, linearidade e limites de detecção e quantificação de ambos os métodos, que tiveram resultados de acordo com a exigência dos ensaios de exatidão por recuperação (70-120%) e precisão (RSD<20%). Como resultado da otimização do método QuEChERS, 10 mL de amostra foi utilizada com 10 mL de ACN em agitador orbital (150 rpm), após é adicionado 1g de NaCl e 4g de MgSO₄ para separar as fases. Como etapa de *clean up* foi adicionado 0,3 g de celite e 0,9 g de MgSO₄. Para a extração das AFLAS pelo método de PLL 10 mL de amostra e 3 mL de diclorometano foram transferidos a um erlenmeyer de 250 mL em agitador orbital (150 rpm), logo após passou por uma etapa de centrifugação e recolhimento da fase orgânica, repetindo o procedimento 3 vezes no total. Das 31 amostras analisadas todas apresentaram contaminação para pelo menos uma das micotoxinas analisadas, como DON (0,3-52,8 µg.L⁻¹), ADONS (1,35-3,14 µg.L⁻¹), ZEA (0,03-3,64 µg.L⁻¹), Toxina T-2 (1,33-17,95 µg.L⁻¹), NIV (0,54-2,5 µg.L⁻¹), OTA (2,04-8,4 ng.L⁻¹), AFB₁ (2,92-9,22 ng.L⁻¹), AFB₂ (0,12-0,43 ng.L⁻¹) e AFG₂ (1,3-1,57 ng.L⁻¹). Após a quantificação das amostras, essas foram separadas de acordo com as matérias que foram fabricadas para fazer a correlação entre as principais variáveis físico-químicas e bioquímicas que foram alteradas devido a contaminação de micotoxinas nas amostras. As correlações geradas apontaram principalmente a influência do processo de moagem da cevada na alteração das propriedades físico-químicas, assim como o aumento de micotoxinas. A correlação entre a adição de carboidratos de origem vegetal como amido de milho ou xarope de cereais com as micotoxinas foi verificada, indicando que a adição desses produtos aumenta o risco de contaminação por micotoxinas, pois há relação entre o teor dessas toxinas com açúcares redutores. Algumas micotoxinas apontaram correlações com os parâmetros bioquímicos analisados, indicando que a contaminação pode ocasionar um estresse na levedura e modificar a produção dessas biomoléculas.

Palavras chave: Micotoxinas, cerveja e QuEChERS.

ABSTRACT

Title: Simultaneous multiclass determination of mycotoxins in beer

Author: Maicon Garcia

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

Mycotoxins are secondary metabolites produced by toxigenic filamentous fungi that can contaminate various foods, including barley that is used as the main raw material for brewing. The contamination of the beer can be caused due to the transfer of mycotoxins present in the raw materials used for the beverage that have characteristics such as thermostability and solubility in water, which causes the contamination of the final fermentation due to the mycotoxins present in the raw material. The objective of this work was to develop and optimize a method for the analysis of trichothecenes, AFLAS, OTA and ZEA in commercial beers and to correlate the contamination of these mycotoxins with changes in the physicochemical and biochemical properties of the samples. The extraction of trichothecenes, OTA and ZEA was performed using the optimized QuEChERS method and the determination was performed by high performance chromatography (HPLC) coupled to an ultraviolet (UV) detector. The AFLAS extraction was performed using the optimized liquid-liquid partition method (PLL) and the determination was performed by HPLC coupled to a fluorescence detector (FL). In order to guarantee the reliability of the method, the accuracy, precision, linearity and limits of detection and quantification of both methods were evaluated according to the requirement of accuracy of recovery (70-120%) and accuracy (RSD < 20%). As a result of the optimization of the QuEChERS method, 10 mL of sample was used with 10 mL of ACN in an orbital shaker (150 rpm), after adding 1 g of NaCl and 4 g of MgSO₄ to separate the phases. As a cleaning step 0.3 g of celite and 0.9 g of MgSO₄ were added. For the extraction of the AFLAS by the PLL method 10 mL of sample and 3 mL of dichloromethane were transferred to a 250 mL erlenmeyer on orbital shaker (150 rpm), after a centrifugation step and organic phase recovery, repeating the procedure 3 times in total. From the 31 analyzed samples all presented contamination for at least one of the mycotoxins analyzed, DON (0,3-52,8 µg.L⁻¹), ADONS (1,35-3,14 µg.L⁻¹), ZEA (0,03-3,64 µg.L⁻¹), Toxin T-2 (1,33-17,95 µg.L⁻¹), NIV (0,54-2,5 µg.L⁻¹), OTA (2,04-8,4 ng.L⁻¹), AFB1 (2,92-9,22 ng.L⁻¹), AFB2 (0,12-0,43 ng.L⁻¹) and AFG2 (1,3-1,57 ng.L⁻¹). After the quantification of the samples, they were separated according to the materials that were manufactured to correlate the main physico-chemical and biochemical variables that were altered due to the contamination of mycotoxins in the samples. The correlations generated mainly indicated the influence of the barley milling process on the alteration of physicochemical properties, as well as the increase of mycotoxins. The correlation between the addition of carbohydrates of plant origin as corn starch or cereal syrup with mycotoxins was verified, indicating that the addition of these products increases the risk of contamination by mycotoxins, since there is a relationship between the content of these toxins with reducing sugars. Some mycotoxins showed correlations with the biochemical parameters analyzed, indicating that the contamination can cause a stress in the yeast and modify the production of these biomolecules.

Key words: Mycotoxins, beer and QuEChERS.

1. INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* L sp. vulgare) é um dos cereais mais importantes no contexto mundial, sendo essencial para a fabricação de cerveja, porém pode estar contaminado por espécies fúngicas capazes de produzir micotoxinas, que são liberados quando o fungo é exposto a situações de estresse (PIACENTINI, 2015; SABINO et al., 1995).

Segundo o Decreto-lei nº 6.871, de 4 de Junho de 2009, a legislação brasileira define cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009).

Assim como na cevada, a utilização de cereais adjuntos durante o processo de fermentação pode ocasionar uma nova fonte de contaminação de micotoxinas no produto fermentado final, pois a bebida fica suscetível a contaminação por micotoxinas que não são características da cevada, tal como a utilização desses cereais pode aumentar a concentração de micotoxinas já existentes apenas com a adição de cevada como matéria-prima (MATUMBA et al. 2014). No entanto, ocasionado por uma possível contaminação na matéria-prima por micotoxinas, esses contaminantes podem ser transmitidos do malte feito a partir de cevada ou outros cereais adjuntos para a cerveja como uma consequência de sua estabilidade térmica e relativa solubilidade em água (INOUE et al., 2013; KOSTELANSKA et al., 2011).

Sabe-se também que há alterações em fatores no processo cervejeiro como a granulometria durante o processo de moagem das cascas, assim como a própria etapa de germinação dos grãos que podem ocasionar incrementos na concentração de micotoxinas no produto fermentado final (LAITILIA et al., 2015; MATUMBA et al., 2014; PASCARI et al., 2018).

Devido a esse problema, vários autores tem relatado a ocorrência de micotoxinas no produto final. A alta incidência de DON em amostras analisadas demonstra a incidência desse contaminante nas amostras de cervejas comerciais, mesmo que em pequenas concentrações, o que pode ser alarmante para o consumidor quando levamos em conta o consumo diário da bebida (BAUER et al., 2016; PIACENTINI et al., 2017).

Por esse motivo a bebida alcoólica pode estar contaminada com concentrações

altas de micotoxinas, mesmo sabendo-se que na etapa de fermentação alcoólica a levedura desempenha uma função importante na redução da concentração inicial, podendo diminuir a contaminação no produto final, contudo a diminuição de 9-34% da concentração de micotoxinas pode não ser suficiente para garantir o consumo seguro da bebida (ANTEP e MERDIVAN, 2012; BOLECHOVÁ, et al., 2015; NATHANAIL et al., 2016).

A presença das micotoxinas em cerveja pode ser comprovada apenas pelo estudo de métodos analíticos que permitam a determinação desses compostos. Entre os principais métodos de extração caracterizam-se o QuEChERS e a partição líquido-líquido (PLL) como métodos para a extração de micotoxinas.

Para a detecção de micotoxinas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é descrito como o método de detecção de analitos mais utilizado entre todas as técnicas analíticas de separação cromatográfica, pois é uma ferramenta muito versátil para a análise de diferentes tipos de compostos (SKOOG et al., 2002). Um grande número de detectores já foi descrito e desenvolvido, no entanto, grande parte das análises contemporâneas de CLAE utilizam detectores ultravioleta em alguma de suas formas como condutividade elétrica, fluorescência, índice de refração e espectrômetro de massas (FU et al., 2009).

Portanto como objetivo desse estudo foi a otimização de métodos para a quantificação e detecção de micotoxinas em cerveja, e estabelecer correlações das micotoxinas com as variáveis físico-químicas e bioquímicas em amostras de cerveja analisadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar métodos de extração para as diferentes classes de micotoxinas em cerveja e correlacionar o índice de contaminação com as características físico-químicas e bioquímicas da amostra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Adaptar métodos para a extração de micotoxinas em amostras de cerveja.

Avaliar a ocorrência de micotoxinas em amostras de cerveja comercializadas na região sul do Brasil.

Caracterizar quimicamente amostras de cerveja e determinar sua relação com níveis de detecção e quantificação de micotoxinas na amostra.

Relacionar a ação da enzima peroxidase e concentração de glutathione reduzida com os níveis de micotoxinas nas amostras.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas atuam em baixas concentrações e caracterizam-se pelos seus diversos efeitos tóxicos, possuem estruturas químicas de baixa massa molecular e além disso são termoestáveis, o que dificulta sua eliminação em matrizes alimentares (ZAIN, 2011). As micotoxinas são metabólitos secundários produzidas por determinadas espécies toxigênicas de fungos filamentosos, destacando os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* como os maiores produtores dessas toxinas (KUMAR et al., 2008).

Para Magan e Aldred (2007), o incremento da produtividade e disseminação de micotoxinas por fungos em plantas pode ser ocasionado por alguns fatores, tais como a carência de nutrientes da planta, juntamente a fatores bióticos e abióticos, os quais podemos destacar as alterações climáticas que causam estresse no fungo, bem como a condição ideal para a produção micotoxicológica. Características de climas temperados e tropical são favoráveis para o desenvolvimento de algumas espécies fúngicas em cereais, tais como *Aspergillus flavus* produtores de aflatoxinas, *Aspergillus ochraceus* produtores de ocratoxina A, *Fusarium graminearum* produtores de tricotecenos e zearalenona e *Penicillium verrucosum* produtor de ocratoxina A (MAGAN E ALDRED, 2007).

Além do clima, existem outros fatores de desequilíbrio que favorecem o surgimento de micotoxinas. Durante a pré-colheita dos grãos, períodos prolongados de secas, a presença de insetos, danos mecânicos e a deficiência de alguns minerais na planta, propiciam a biossíntese de micotoxinas por fungos toxigênicos (MAGAN e ALDRED, 2007). Na pós-colheita, o transporte e armazenamento são os principais responsáveis por aumentar a concentração de micotoxinas, já que é durante estes processos que os grãos contaminados entram em contato com outros não-contaminados, adicionalmente a falta de aeração, umidade elevada (acima de 14%), amplitude térmica acentuada e temperaturas acima de 20 °C, o que favorecem a proliferação fúngica e conseqüentemente a produção dessas toxinas (RICHARD, 2007).

A contaminação por micotoxinas ao longo da cadeia alimentar humana e animal

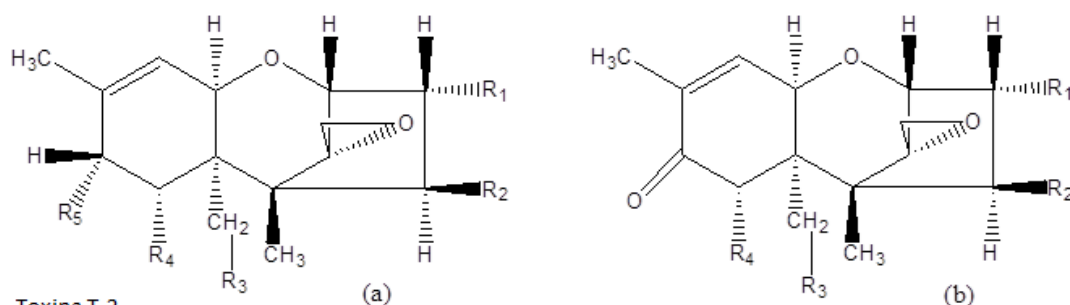
pode ocorrer de maneira direta ou indireta. A forma direta ocorre através do consumo de cereais, oleaginosas e derivados contaminados, diferente da forma indireta de contaminação que é realizada quando os animais se alimentam com rações preparadas por grãos contaminados, o que ocasiona na contaminação do animal e por sua vez a excreção da micotoxina no leite, carne e ovos, resultando em uma fonte indireta de contaminação para os humanos (BERSOT, MAZIERO, 2010). A ingestão de alimentos contaminados pode provocar uma série de efeitos tóxicos agudos e crônicos e até mesmo letal, a qual depende da dose e tempo de ingestão (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

A presença de micotoxinas pode provocar uma ampla gama de propriedades tóxicas, incluindo carcinogenicidade, neurotoxicidade, bem como toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (ZAIN, 2011; SPEIJERS e SPEIJERS, 2004). Segundo Nida'M e Ahmad (2010), cerca de 400 compostos são reconhecidos como micotoxinas, porém os grupos mais estudados são os tricotecenos, aflatoxinas, a zearalenona e a ocratoxina A, pois são detectados com maior frequência em alimentos e causam risco a saúde pública.

Os tricotecenos são uma grande família de micotoxinas produzidas por uma ampla variedade de espécies de fungos dos tipos *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* e *Stachybotrys* (HE et al, 2010). Podemos classificar os tricotecenos como micotoxinas da família de sesquiterpenóides cíclicos, os quais são divididos em quatro grupos (tipos A, B, C e D) de acordo com as suas características de grupos funcionais, sendo que o tipo A e B são os mais comuns (COLE e COX, 1981; HE et al, 2010).

Os tricotecenos do tipo A são representados por HT-2 (HT₂) e toxina T-2 (T₂) e o tipo B é mais frequentemente representado por deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) e os seus derivados acetilados 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) (CANO-SANCHO et al., 2011), conforme a Figura 1. Todos os tricotecenos tem como característica em comum uma estrutura tricíclica ligada a função epóxido, a qual é parte principal que é responsável pela toxicidade da molécula, e eles são derivados a partir do intermediário isoprenóide pirofosfato de farnesilo, através de uma série de reações de ciclização, isomerização, oxigenação e acetilação (ALEXANDER et al., 2009; KIMURA et al., 2007).

Figura 1. Estruturas químicas de grupos de tricotecenos. a: tipo A; b: tipo B.



Toxina T-2

R1 OHR2 OCOCH₃R3 OCOCH₃R4 HR5 OCOCH₂CH(CH₃)₂

	<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>R3</u>	<u>R4</u>
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH
3-acetil-deoxinivalenol	OCOCH ₃	H	OH	OH
15-acetil-deoxinivalenol	OH	H	OCOCH ₃	OH

Dentre o grupo dos tricotecenos podemos destacar o NIV e a toxina T-2 como as micotoxinas mais tóxicas e perigosas do grupo. Isso deve-se a sua capacidade de inibir a síntese de proteínas e do DNA de células, a qual atuam nos passos de iniciação da síntese, ligando-se a unidade 60S dos ribossomos e consequentemente inibe a atividade da peptidil transferase, interferindo na biossíntese dessas moléculas na célula (KIESSLING, 1986; UENO, 1980).

Entre as micotoxinas com maior ocorrência em matrizes alimentares destaca-se o DON como a toxina de *Fusarium* mais reportada no mundo, assim como a micotoxina detectada em maior concentração (MILLER et al., 2005; PRANGE et al., 2005). A exposição a níveis elevados de DON pode desencadear vômito, perda de peso, dores abdominais e diarreia (DONG e PESTKA, 1993; PESTKA, 2007), assim como imunossupressão (ROBANNA-BANART et al., 1988), por esse motivo DON é classificado pela *International Agency for Research on Cancer* no Grupo 3, isto é, não carcinogênico para humanos (IARC, 1993).

O 3-acetil-deoxinivalenol é um derivado acetilado de DON que possui um grupamento acetil na posição 3 da molécula de DON, enquanto que o 15-acetil-deoxinivalenol possui um grupamento acetil na posição 15 da molécula de DON (ALEXANDER et al., 2011).

A produção dos derivados acetilados 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) é um estudo que tem se tornado importante entre algumas espécies do gênero *Fusarium*, sendo que as diferenças entre estes quimiotipos em relação à agressividade e produção global de DON têm sido demonstradas (PURI & ZHONG, 2010). Porém devido a coocorrência com DON ser

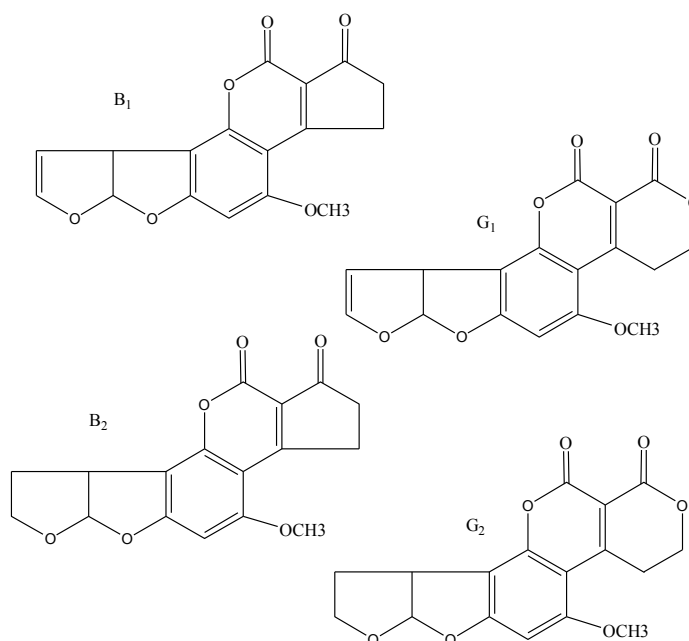
mais abundante do que com seus derivados acetilados, não há tanta preocupação com o monitoramento dos ADONS, uma vez que não são considerados níveis máximos para essas toxinas em alimentos (EC No. 856, 2005).

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas majoritariamente pelas espécies de fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* e *A. nomius*, a qual destaca-se as AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2011; EATON e GROOPMAN, 2013).

As aflatoxinas são formadas a partir de uma molécula de cumarina altamente substituídas, a qual sua presença dá uma configuração de furocumarina que as coloca entre um grande grupo de compostos que ocorrem naturalmente, juntamente a uma molécula de bifurano, a qual é encontrada em apenas um outro composto de origem natural, a esterigmatocistina, um metabolito característico de fungos toxigênicos da espécie *Aspergillus* (BULLOCK et al., 1962; SOINE, 1964).

Elas apresentam um núcleo de cumarina ligado a uma estrutura bi-furano. As AFLAs B apresentam um anel ciclopentano, o grupo G contém um anel de lactona na sua estrutura molecular, como está representado na Figura 2.

Figura 2: Estrutura molecular das diferentes aflatoxinas



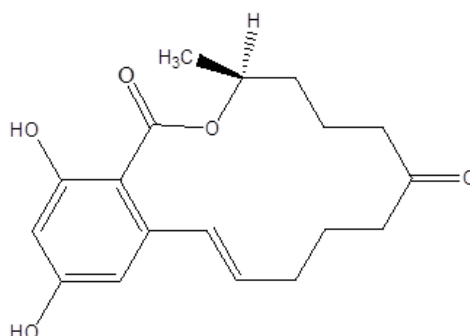
A AFB₁ é considerada como a micotoxina mais perigosa e tóxica da classe das aflatoxinas, uma vez que é a precursora das demais micotoxinas do grupo, afinal a AFB₂, AFG₁ e AFG₂ são formas oxidadas da AFB₁, por esse motivo, sua concentração

é geralmente superior em relação as demais, bem como seus efeitos de toxicidade que atuam diretamente nas células do fígado, sendo classificadas como hepatotóxica e carcinogênicas do tipo 1 para humanos (EATON e GROOPMAN, 2013; IARC, 2002).

A carcinogenicidade da AFB₁ se deve pela ativação metabólica através de enzimas mitocromossomais hepáticas que geram um epóxido, que se ligam a macromoléculas dentro de hepatócitos, o que interfere com a transcrição e com a síntese de proteínas, além de atuar como interferente processo do sistema imune das células (YOSHIZAWA, 2001).

As espécies *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense* e *Fusarium graminearum* são produtoras da micotoxina Zearalenona (ZEA), uma micotoxina que é formada a partir uma lactona do ácido fenólico resorcílico, a qual sua molécula é constituída de radical “-eno” decorrente da dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o “-ona” pela cetona no C6, conforme está na Figura 4 (SEKIYAMA et al., 2005; URRY, 1966).

Figura 3: Estrutura molecular da Zearalenona



Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer – IARC (1993), a ZEA é classificada no Grupo 3 quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos, ou seja, não há evidências adequadas para afirmar o seu potencial carcinogênico.

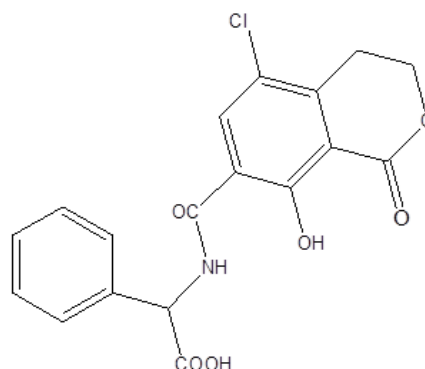
Em estudo realizado por Yoshizawa (2001) sobre a toxicidade, foram administradas doses de 20 g.kg⁻¹ em camundongos e 15 g.kg⁻¹ em aves e verificou-se que não houve a mortalidade, não sendo considerada uma micotoxina de alta toxicidade.

A ZEA possui características estrogênicas e semelhança química com a estrutura do hormônio estrogênico 17-β-estradiol, o que lhe garante a conformação de um metabólico hormonal e anabólico, que se assemelha ao estrogênio, afetando

severamente diversos animais, mas em especial suínos justamente devido a pequenas concentrações dessa micotoxina causar hiperestrogenismo (SEKIYAMA et al., 2005; ZINEDINE et al., 2007).

As ocratoxinas são produzidas principalmente por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, a qual caracterizam-se como derivados de policetídio com a porção dihidroisocumarina ligadas por meio de uma ligação amida com a parte da porção carboxila da fenilalanina e possui em sua estrutura uma molécula de cloro, principal responsável por sua toxicidade, conforme está na Figura 5 (KHOURY e ATOUI, 2010; PATHARAJAN et al., 2011).

Figura 4: Estrutura molecular da Ocratoxina A



Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer – IARC (1993), a OTA é classificada no Grupo 2B devido a possibilidade de ser carcinogênica para os seres humanos.

A OTA possui efeitos que inibe a síntese protéica pela competição com a fenilalanina na reação catalisada pela fenilalanil-t-RNA sintetase. Devido a sua semelhança com a fenilalanina e ação na competição é considerada nefrotóxica, teratogênica e genotóxica (CREPPY et al., 1979; MILJOVIC et al., 2003).

Segundo o estudo de Boorman (1989), doses de 210 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}$ (durante 5 dias por semana) mostraram que a OTA pode produzir danos tubulares, bem como lesões neoplásicas frequentes durante um longo período de exposição crônica.

3.2 CEVADA MALTADA

A cevada (*Hordeum vulgare* L sp. vulgare) é um dos cereais mais importantes no contexto mundial para a fabricação de cerveja. Porém esta matéria-prima pode estar contaminado por espécies fúngicas capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos como as micotoxinas, que são liberados quando o fungo é

exposto a situações de estresse (PIACENTINI, 2015; SABINO et al., 1995). Os impactos causados pela contaminação de micotoxinas nas matérias-primas agrícolas, para a saúde humana e animal sobre o comércio interno e internacional são cada vez mais reconhecidos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (JESTOI, 2008).

A Organização para Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2013) estima que por ano cerca de 25% da produção mundial de grãos possa estar comprometida pela contaminação por micotoxinas.

Para a suspeita de contaminação por micotoxinas na cevada, primeiramente deve ser confirmado a presença de fungos toxigênicos, seguido pela produção dos metabólicos secundários ocasionados por estresse. Porém mesmo com a eliminação do fungo, não há garantia da isenção da contaminação por micotoxinas, uma vez que mesmo após a inviabilização da cepa produtora há a possibilidade de substituição por outro micro-organismo ou mesmo ocorrer a liberação da micotoxina no grão (GARDA, 2002).

Portanto, como está na Tabela 1, pode-se perceber a incidência de diversas micotoxinas na matéria-prima, o que resulta em uma potencial contaminação uma vez que existem concentrações elevadas de micotoxinas como DON que foi reportado nos estudos de Schöneberg et al., (2016) e Nielsen et al., (2014). Outro fato preocupante é a ocorrência da toxina T-2 nessa matéria prima, pois estudos de ocorrência encontraram concentrações altas dessa toxina (BECCARI et al., 2016; SCHÖNEBERG et al., 2016), uma vez que esse contaminante é extremamente tóxico para os seres vivos, e em concentrações altas pode acabar se tornando letal (UENO, 1984).

Tabela 1: Ocorrência de micotoxinas em cevada.

Amostras Contaminadas (%)	Micotoxina	Limite Máximo Encontrado ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Autor
3/43 (7%)	DON	108,7	39,2	Beccari et al., 2016 (Itália)
15/43(35%)	NIV	434,5	95,9	
17/43 (36%)	Toxina T-2	137,6	27,5	
5/43 (12%)	ZEA	1,8	1,8	
282/440 (64%)	DON	4860	170,4	Schöneberg et al., 2016 (Suíça)
83/440 (19%)	NIV	435	19,2	
26/440 (6%)	Toxina T-2	319	13,3	
81/440 (18%)	ZEA	240	6,0	
19/22 (86%)	DON	602,3	284,1	Bolechova et al., 2014 (República Checa)
8/22 (36%)	NIV	123,3	93,4	
8/22 (36%)	Toxina T-2	30,5	24,0	
2/22 (9%)	ZEA	204,4	192,8	

6/33 (18%)	AFB ₁	44,52	19-44,52	Gonzalez-Pereyra et al., 2011 (Argentina)
123/148 (83%)	DON	180	28	Malachova et al., 2010 (República Checa)
51/148 (34%)	NIV	45	14	
1/148 (1%)	ADONS	46	-	
73/148 (9%)	Toxina T-2	30	16	
-	DON	3599	107,7	Nielsen et al., 2014 (Reino Unido)
-	NIV	1089	73,7	
-	ZEA	1558	62,0	
-	Toxina T-2	24	7,7	
7/31 (23%)	DON	2,9	0,8	Juan et al., 2017 (Tunisia)
2/31 (6%)	15ADON	7,5	0,5	
3/31 (10%)	NIV	75,3	7,5	
2/31 (10%)	OTA	2,1	0,6	

Devido a grande preocupação com o surgimento de micotoxinas nos mais variados alimentos tanto no Brasil quanto no mundo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou um Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Este Regulamento possui o objetivo de estabelecer e fiscalizar limites máximos nos alimentos monitorando a ocorrência de aflatoxinas (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂ e AFM₁), ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, portanto o objetivo é reduzir a probabilidade das micotoxinas de causar danos severos a saúde pública devido ao consumo de grãos com alta contaminação.

Tabela 2: LMT de micotoxinas em cevada.

Micotoxinas	LMT (µg.kg ⁻¹)
Aflatoxinas (B ₁ ,B ₂ ,G ₁ ,G ₂)	5
Ocratoxina A	10
DON	750
ZEA	100
OTA	10

Fonte: RDC nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011.

Em termos de controle dessa contaminação, atualmente no Brasil, há apenas regulamentação para micotoxinas nas matérias-primas (Tabela 2) onde a partir de 2017 (BRASIL, 2011b) começou a entrar em vigor essa lei que estabelece maior rigor nos limites máximos tolerados, em alguns alimentos prontos e matérias-primas.

O Regulamento aplica-se às empresas que importem, produzem, distribuem e comercializem as categorias de bebidas, alimentos e matérias primas. A ANVISA orienta que os níveis de micotoxinas devem ser o mais baixo possível, portanto torna-se necessária a aplicação de melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar a contaminação no alimento e que o alimento quando contaminado seja evitado de ser comercializado ou consumido (BRASIL, 2011b).

3.2.1 CEREAIS MALTADOS

Segundo o Decreto-lei nº 6.871, de 4 de Junho, a legislação permite que durante o processo de fermentação, a substituição da cevada em até 80% por cereais maltados, não maltados ou carboidratos de origem vegetal sendo o arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo como os principais cereais utilizados (BRASIL, 2009).

Devido a adição de outros cereais ao longo do processo cervejeiro como milho e derivados, o produto fermentado final pode apresentar vantagens econômicas, tais como a redução de até 8% dos custos de produção e aceleração do tempo de fermentação. No entanto estudos de ocorrência mostram altos níveis de contaminação de micotoxinas nesses cereais, portanto a utilização dessas matérias-primas como adjuntos no processo de fermentação pode ser um risco de contaminação devido a transferência das micotoxinas presentes da matéria-prima para o fermentado final (BACA, 2001; PIACENTINI et al., 2017). Muitos estudos têm relatado a ocorrência de micotoxinas em diversos alimentos, mas em especial em cereais, como podemos verificar na Tabela 3.

Tabela 3: Ocorrência de micotoxinas em cereais

Tipo de Cereal	Amostras Contaminadas (%)	Micotoxina	Limite Máximo Encontrado ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Autor
Arroz	50/88 (57%)	AFB ₁	14	2,5	Manizan et al., 2017 (Costa do Marfim)
	19/88 (22%)	AFG ₁	17	1,9	
	50/88 (57%)	AF totais	33	3,6	
	13/88 (15%)	OTA	15	4,6	
	4/88 (5%)	ZEA	7,5	3,5	
Milho	28/29 (97%)	AFB ₁	80	8,2	
	19/29 (66%)	AFG ₁	84	7,3	
	28/29 (97%)	AF totais	173	14	
	2/29 (7%)	OTA	1,8	1,8	
	1/29 (3%)	ZEA	-	-	

Aveia	53/58 (90%)	DON	2150	660	Kuzdralisnski et al., 2013 (Polônia)
	25/58 (42%)	Toxina T-2	311	104	
	35/58 (59%)	NIV	1031	54	
	24/58 (41%)	AF totais	3	1,2	
	42/58 (71%)	OTA	5,8	3,8	
Aveia	150/325 (46%)	DON	1328	52,7	Schöneberg et al., 2018 (Suíça)
	220/325 (34%)	NIV	1653	121,0	
	234/325 (9%)	Toxina T-2	1091	59,6	
Milho	112/148 (76%)	NIV	3646	256,2	Oliveira et al., 2016 (Brasil)
	71/148 (48%)	DON	1008	151,6	
	109/148 (74%)	ZEA	5,088	140,4	
	38/148 (26%)	AF totais	49,9	8,3	
Milho	5/95 (24%)	DON	492	165	Hove et al., 2016 (Zimbábue)
	23/95 (4%)	15ADON	105	13	
	3/95 (3%)	NIV	530	175	
	14/95 (15%)	ZEA	369	101	
	1/95 (1%)	AFG ₁	4	0,6	
	1/95 (1%)	AFB ₂	3	-	
	1/95 (1%)	AFB ₁	11	-	
Trigo	8/31 (26%)	DON	1787	193	Stanciu et al., 2016 (Romênia)
	4/31 (13%)	ZEA	1135	87	

Portanto, a utilização de cereais adjuntos no processo de fermentação alcohólica pode ser considerada como uma fonte adicional de micotoxinas ao final do produto fermentado, uma vez que torna o produto suscetível a contaminação de micotoxinas que não são características da cevada, portanto a utilização dessas matérias-primas pode aumentar a concentração dessas toxinas já existentes na cevada.

3.3 CERVEJA

Segundo o Decreto-lei nº 6.871, de 4 de Junho de 2009, a legislação brasileira define cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcohólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. O malte de cevada pode ser substituído, em no máximo 80 %, por cereais maltados, cereais não maltados ou carboidratos de origem vegetal (BRASIL, 2009).

No ano de 2017 o Brasil produziu cerca de 14 bilhões de litros de cerveja. A produção nacional desse produto movimentou cerca de 1,6% do PIB nacional, o que justifica a presença da bebida em 99% das residências brasileiras, afinal são consumidos uma média de 60,7 litros de cerveja per capita por pessoa (CERVBRASIL, 2017).

De acordo com o Centro de Informações sobre Saúde e Alcool (2016), a região Sul apresentou maior frequência em relação ao consumo de cerveja, na qual 36% dos

entrevistados revela ter bebido cerveja pelo menos 1 vez na semana e 11% releva beber diariamente.

A cerveja sem dúvidas é uma bebida muito apreciada e consumida, porém devido a uma possível contaminação da matéria-prima por micotoxinas, esses contaminantes podem ser transmitidos do malte para a cerveja como uma consequência de sua estabilidade térmica e relativa solubilidade em água (INOUE et al., 2013; KOSTELANSKA et al., 2011).

Resumidamente o processo de fabricação de cerveja pode ser dividido entre as etapas de maltagem, moagem, mosturação, filtração, fermentação e maturação.

Na etapa de malteação, os grãos de cevada são umedecidos para ativar as enzimas e solubilizar o amido. Segundo Laitila (2015), os níveis de micotoxinas podem ser incrementados durante o processo de malteação, visto que, o grão é exposto a condições de umidade e temperatura propícia para o crescimento de fungos e consequente produção de micotoxinas.

Nessa etapa ocorre a transformação dos grãos em malte assim como pode ocorrer a mistura de maltes de diferentes procedências para determinar o tipo de cerveja que será produzida (AQUARONE, 1983). Devido a adição de maltes a base de cereais como milho, pode acontecer uma contaminação no fermentado final com micotoxinas, como é descrito no estudo de Matumba et al. (2014), que relata a ocorrência de aflatoxinas em maltes a base de milho.

O processo de moagem dos grãos tem como objetivo a fragmentação das cascas para facilitar a ação enzimática durante o processo de mosturação, pois sabe-se que quanto melhor é a moagem, maior é liberação do endosperma (LEWIS e YOUNG, 1995; WANG, 1979). Os tamanhos de partículas pequenos podem ter impacto negativo ao diminuir os rendimentos de filtração aumentando a turbidez do mosto (KUNZE, 2006). Além disso, a etapa de moagem excessiva não apresenta benefícios na redução de micotoxinas, pois pode ocorrer uma maior homogeneidade das micotoxinas e consequentemente maior solubilização em água (PASCARI et al., 2018).

A mosturação é a etapa em que após o processo de moagem, o malte entra em contato com a água em condições de pH e temperatura controladas para favorecimento da atuação enzimática para total conversão do amido em açúcares (WANG, 1979).

A filtração consiste em separar as substâncias solúveis das insolúveis, ou seja,

separa o bagaço que é constituído pelas cascas de cevada que pode ser utilizado como agente filtrante para separar o mosto líquido (FONSECA e TEIXEIRA, 2007; VENTURINI, 2010). De acordo com Malachova et al. (2010), os resíduos da filtração (casca de cevada) podem reter uma certa quantidade de micotoxinas, porém a granulometria pode influenciar na retenção.

Como próxima etapa tem-se a inoculação da levedura que será responsável pela fermentação do mosto. Essa etapa consiste em transformações dos açúcares em dióxido de carbono (CO₂), etanol e outros produtos do metabolismo da levedura. A etapa de fermentação pode ser dividida em duas etapas, onde na primeira etapa há elevados níveis de açúcares fermentescíveis com presença oxigênio, ao qual ocorre a respiração celular possuindo o objetivo de multiplicar as células, porém na segunda etapa quando há baixos níveis de oxigênio, inicia-se a fase anaeróbia, onde há a produção de etanol e CO₂ (PRIEST e STEWART, 2006).

Por último a etapa de maturação tem como finalidade a degradação dos açúcares residuais a fim de evitar contaminações e garantir as características finais ao produto como eliminação de gás carbônico e de outros subprodutos formados (AQUARONE et al., 2001).

Sabendo-se que na etapa de fermentação alcoólica a levedura desempenha uma função importante na redução da concentração inicial, podendo diminuir a contaminação no produto final, contudo a diminuição de 9-34% da concentração de micotoxinas, a bebida alcoólica pode ainda estar contaminada com concentrações altas de micotoxinas, pois a atuação da levedura pode não ser suficiente para garantir a isenção de micotoxinas na bebida (ANTEP e MERDIVAN, 2012; BOLECHOVÁ, et al., 2015; NATHANAIL et al., 2016).

Os órgãos de fiscalização como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária monitoram apenas a concentração de algumas micotoxinas na matéria-prima e não no produto final, por isso não há controle sobre a contaminação de micotoxinas na bebida (BRASIL, 2011b).

Devido a esse problema, vários autores tem relatado a ocorrência de micotoxinas no produto final, assim como está descrito na Tabela 4. Destaca-se a alta incidência de DON em grande parte das amostras analisadas assim como é descrito por Bauer et al., (2016), o que demonstra a incidência desse contaminante nas amostras de cervejas comerciais, mesmo que em pequenas concentrações, o que pode ser alarmante para o consumidor quando levamos em conta o consumo diário

da bebida. Entre as micotoxinas estudadas, a presença da Toxina T-2 é a mais preocupante, uma vez que mesmo após o processo cervejeiro, essa micotoxina permanece no produto final, mesmo em pequenas concentrações, sendo extremamente prejudicial para os consumidores devido a sua carcinogenicidade (KIESSLING, 1986; UENO, 1980).

Tabela 4: Ocorrência de micotoxinas em cerveja

Amostras Contaminadas (%)	Micotoxina	Limite Máximo ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Autor
60/99 (61%)	DON	255	95,6	Chilaka et al., 2017 (Nigéria)
3/99 (3%)	15ADON	36	29,7	
4/99 (4%)	3ADON	37	29,5	
6/99 (6%)	ZEA	31	25	
33/44 (75%)	DON	20	2,2	Bauer et al., 2016 (Alemanha)
44/44 (100%)	ZEA	2	1	
70/106 (86%)	DON	18,6	21	Bertuzzi et al., 2011 (Países da Europa)
72/106 (36%)	OTA	0,19	0,019	
17/17 (100%)	DON	501	177	Piacentini et al., 2015 (Brasil)
92/154 (60%)	DON	47,7	17,2	Rodriguez-Carrasco et al., 2015 (Espanha)
14/154 (9%)	Toxina T-2	38,2	2,8	
3/49 (6%)	Toxina T-2	12,1	-	Rubert et al., 2013 (Irlanda e Espanha)
6/49 (12%)	OTA	6,9	-	

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE MICOTOXINAS

A presença das micotoxinas em cerveja pode ser comprovada apenas pelo estudo de métodos analíticos que permitam a determinação desses compostos. A importância de realizar métodos que abranjam uma detecção do maior número de analitos possíveis deve-se a economia de reagentes e diminuição da geração de resíduos, permitindo ao analista executar uma análise rápida e precisa em sua amostra, economizando tempo, diferentemente das análises convencionais específicas (RUBERT et al., 2013).

Porém, um desafio para a análise de micotoxinas é a grande quantidade de componentes interferentes presentes na matriz. A cerveja é uma matriz complexa, pois sua composição contém água, carboidratos, proteínas, substâncias minerais e álcoois. O álcool (etanol) é um subproduto de fermentação e pode fortemente influenciar a extração de micotoxinas (RUBERT et al., 2013). Portanto, é fundamental a avaliação de um método que possa eliminar o maior número de interferentes

possíveis na matriz.

A etapa de extração e o *cleanup* estão entre os processos mais críticos para determinação das micotoxinas, uma vez que são as etapas mais suscetíveis a erros do analista e por determinarem as recuperações para todos os compostos sob investigação (LATTANZIO et al., 2007). Devido as suas estruturas variadas e diferentes propriedades físico-químicas das micotoxinas, podem ocorrer dificuldades de extração quando se utiliza uma técnica de extração padrão. Muitos tipos de métodos de extração já foram relatados na literatura, no entanto as últimas tendências têm sido a utilização de métodos como o QuEChERS modificado (CHILAKA et al., 2017; RODRIGUEZ-CARRASCO et al., 2015; TAMURA et al., 2011), pois este é confiável e pode ser aplicado com sucesso a diferentes tipos de matrizes (RUBERT et al., 2012).

Devido a presença de interferentes após a etapa de extração, torna-se necessária uma etapa de limpeza do extrato, também conhecida como *cleanup* da amostra. Essa etapa possui a finalidade de evitar a presença de possíveis interferentes e futuros danos ao equipamento, melhorando as condições de pureza do extrato, evitando assim uma possível eluição de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito (MARTINS et al., 2012)

Em relação ao método QuEChERS originalmente proposto por Anastassiades et al., (2003), variações foram realizadas com o intuito de adaptar o método para a extração de micotoxinas nos mais variados tipos de matrizes, o que resultou em modificações com acidificação do solvente (MIRÓ-ABELLA et al., 2017), proporção de sais adicionados a amostra (CHILAKA et al., 2017), assim como adaptações na proporção entre amostra e o solvente e na etapa de limpeza da amostra (RODRIGUEZ-CARRASCO et al., 2015).

Outra alternativa para a extração de micotoxinas é a utilização do método de extração por partição líquido-líquido (PLL), a qual consiste na adição de um solvente orgânico que seja insolúvel na fase aquosa do analito e permita a extração destes com o mínimo de interferentes possíveis. As vantagens do método QuEChERS estão na economia de reagentes utilizados ao longo do processo, a qual técnicas conhecidas como padrão, tais como o método Tanaka et al., (2000) utilizam grandes volumes de solvente, assim como a técnica de partição-líquido-líquido que utiliza solventes orgânicos tóxicos como clorofórmio (MEDINA et al., 2005), diclometano (GARDA-BUFFON, 2004; VARGA et al., 2005), entre outros.

Para a utilização deste método de PLL, torna-se necessário ter o conhecimento da polaridade dos analitos, bem como a densidade do solvente, para saber se a fase a ser recolhida será a fase superior ou inferior. Para garantir a melhor eficiência do método, o solvente utilizado deve ter uma grande afinidade pelo analito, uma vez que caso isso não aconteça, parte do analito pode continuar solúvel na fase aquosa, comprometendo a eficiência do método (OJEDA, 2011)

Outro método que pode ser aplicado para a extração de micotoxinas ou limpeza do extrato é a utilização de colunas de imunoafinidade, a qual é específica para cada grupo de micotoxina, o que torna o método seletivo, porém cada classe de analito possui uma coluna específica, o que dificulta a extração de analitos simultaneamente durante o mesmo método (BERTUZZI et al., 2011). Para o emprego da técnica, primeiramente uma alíquota da amostra é extraída com um solvente, depois diluída e condicionada com uma solução tampão com a finalidade de eluir a amostra na coluna (PITTET et al., 1996). Portanto, após a passagem da amostra na coluna de imunoafinidade, utiliza-se um solvente extrator específico para cada micotoxina com o objetivo de liberar a micotoxina da interação com o material adsorvente da coluna e solubilizar o analito no solvente (BERTUZZI et al., 2011). A coluna de imunoafinidade também pode ser utilizada como etapa de limpeza do extrato para diminuir o número de interferentes da amostra, afinal possui seletividade com o analito, com isso os interferentes são eluídos e o analito permanece na coluna até ser liberado após a lavagem da coluna com algum solvente específico (PITTET et al., 1996).

3.4.1 MÉTODO QuEChERS

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

O método QuEChERS é muito flexível quanto a aplicação, afinal várias modificações já foram realizadas para a extração e quantificação de micotoxinas em diversas matrizes. Segundo Miró-Abella et al., (2017) foram realizadas adaptações no método para a extração de micotoxinas, tais como a acidificação do solvente utilizado

(ACN, 1% ácido acético), além de utilizar este método em matrizes sólidas e posterior análise em LC MS/MS. Frenich et al., (2011) adaptou esse método para a extração de micotoxinas em ovo, a qual mudou o solvente, utilizando uma proporção de metanol/água (80/20 v/v) para a extração das micotoxinas. De acordo com Rodriguez-Carrasco et al., (2015) algumas adaptações foram realizadas para adequar a metodologia à extração de micotoxina, por isso mudou-se a proporção de amostra:solvente (2:1), diminuindo o volume solvente e mantendo a proporção da amostra líquida com o intuito de otimizar a recuperação do método.

Basicamente, a amostra é extraída com um solvente miscível em água, porém utilização de sais tem o propósito de induzir a separação das fases líquidas (MAJORS, 2008). A utilização de $MgSO_4$ na etapa de partição de fases deve-se à sua elevada capacidade de remoção de água quando comparado aos demais sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, resultando no aquecimento da amostra durante as fases de extração/separação, favorecendo a extração, principalmente de substâncias apolares (ANASTASSIADES et al., 2003). O uso de NaCl combinado ao $MgSO_4$ tem o propósito de favorecer a transferência de substâncias polares para a fase orgânica, saturando a fase aquosa de íons (ANASTASSIADES et al., 2003). Modificações foram propostas durante essa etapa do processo para otimizar o método, tal como está descrito por Reichert et al., (2018) que utilizou soluções tampão durante a etapa de extração, juntamente com a modificação na quantidade $MgSO_4$ adicionados, além de não utilizar NaCl.

Por último, pode se utilizar diferentes sorventes de acordo com a matriz para a eliminação de interferentes através de um processo de adsorção na matriz, permitindo que os analitos permaneçam na fase orgânica e o extrato possua uma menor quantidade para etapas posteriores (PRESTES et al., 2009).

Após as etapas de agitação e centrifugação da amostra ocorre o particionamento das fases, a qual na fase orgânica ocorre o recolhimento de uma alíquota que é submetida ao processo de limpeza para eliminação de interferentes. Após a etapa de limpeza a mistura é centrifugada e o sobrenadante resultante pode ser analisado diretamente ou pode ser submetido a uma etapa de concentração, se necessário.

3.4.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

O método de extração por partição líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) é considerado como uma técnica clássica de extração e pré-concentração

de analitos, ainda muito utilizada (MARTINS et al., 2012). No entanto ao escolher esse método, pode-se ter desvantagens, uma vez que se caracteriza pela demora, requer grandes volumes de solventes orgânicos, além de envolver várias etapas que estão associadas com as perdas de analito e ocorrência de contaminação, por esse motivo houve o desenvolvimento de outros métodos de extração para substituir a PLL (OJEDA, 2011).

A técnica de partição líquido-líquido é caracterizada pela transferência do analito entre duas fases (uma fase aquosa e outra com o solvente orgânico) que formam um sistema heterogêneo, uma vez que o solvente orgânico deve ser imiscível em água. O fundamento da ELL como técnica de extração baseia-se na transferência de massa do analito que está presente inicialmente na fase aquosa e migra para a fase orgânica, isso devido ao contato intensivo entre as duas fases imiscíveis e a maior afinidade do analito pela fase orgânica (FACCHIN e PASQUINI, 1998).

Um dos métodos de extração mais utilizados para a extração de micotoxinas foi criado por Tanaka et al., (1985), a qual consistia em uma extração em fase sólida que utilizava uma proporção de 20g de amostra sólida juntamente com água e ACN como solvente extrator (50 mL de água e 150 mL de ACN), onde a extração acontecia em agitador orbital e uma porção de 125 mL do solvente orgânico era recolhida e adicionado 100 mL de hexano e posteriormente 120 mL de metanol para depois ser particionada novamente e purificada posteriormente em uma coluna de florisil. A desvantagem desse método é a alta quantidade de solventes orgânicos utilizados, assim como as sucessivas etapas de extração que a sucedem, o que pode gerar perdas no rendimento e caracteriza como um método de extração demorado.

Segundo Vieira et al., (2007), mesmo com o desenvolvimento de outras técnicas de extração como a micro extração em fase sólida e líquida, a extração líquido-líquido continua sendo uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a determinação de diversos componentes devido a sua simplicidade de manuseio, que não exige instrumentação sofisticada, e também devido sua execução ser de simples operação.

Por esse motivo, novas metodologias são descritas como no estudo realizado por Bauer et al., (2016) que utilizam uma menor quantidade de amostra:solvente (2 mL de amostra de cerveja para 4 mL de acetato de etila) o que diminui a quantidade de solvente utilizado e adiciona uma etapa de centrifugação posterior ao particionamento das fases para facilitar a separação da fase aquosa e ajuda no recolhimento da fase orgânica. De acordo com González-Peñas et al., (2006) para o

método de partição líquido-líquido, foi utilizada uma metodologia que reduziu a quantidade de amostra:solvente utilizada para o particionamento das fases (7 mL de amostra acidificada com HCl 1M e 7 mL de clorofórmio), assim após essa etapa de separação entre a fase aquosa e a fase orgânica, realizou-se uma etapa de centrifugação e foi recolhido 5 mL do solvente orgânico que foi posteriormente adicionado a uma coluna de imunoafinidade para melhor limpeza do extrato.

3.5 MÉTODO DE DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método de detecção de analitos mais utilizado entre todas as técnicas analíticas de separação cromatográfica, afinal as suas vantagens de oferecer um método com alta sensibilidade, boa adequação para a separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, juntamente a sua aplicabilidade em diversas matrizes faz dessa técnica de detecção uma ferramenta muito versátil para a análise de diferentes tipos de compostos (SKOOG et al., 2002). Um grande número de detectores já foi descrito e desenvolvido, no entanto, grande parte das análises contemporâneas de CLAE utilizam detectores ultravioleta em alguma de suas formas como condutividade elétrica, fluorescência, índice de refração e espectrômetro de massas (FU et al., 2009).

O detector UV associado a CLAE é bastante comum. Durante a análise, a amostra passa através de uma célula de vidro incolor, transparente, chamada cela de amostra. Quando a luz UV incide nessa célula, parte da luz é absorvida pela amostra. Assim, as intensidades da luz UV observadas para a fase móvel (sem amostra, cela de referência) e para o eluente contendo amostra serão diferentes. Medindo-se essa diferença, a quantidade de amostra pode ser determinada. Como a absorbância UV também difere, dependendo do comprimento de onda usado, é importante que este seja escolhido adequadamente, com base no tipo de analito, afinal um detector padrão de UV permite ao usuário escolher comprimentos de onda entre 195 e 370 nm (SKOOG, 2002).

Os compostos que absorvem no UV são aquelas substâncias que absorvem luz na faixa de 180 a 350 nm. As substâncias que absorvem nessa faixa incluem as que possuem uma ou mais duplas ligações e substâncias que possuem elétrons não ligantes, como: olefinas, aromáticos, compostos que contêm bromo, iodo ou enxofre, grupo carbonila, grupo nitro, íons inorgânicos e duas duplas conjugadas (COLLINS et al., 2006; SCOTT, 2003).

Entre os detectores ultravioleta mais poderosos, encontram-se os equipamentos com arranjo de diodos (DAD). Nos detectores DAD a coleta de dados é feita em um espectro inteiro, na região do ultravioleta e do visível (90 a 880 nm), em aproximadamente 1 segundo, portanto gera dados espectrais que podem ser coletados e armazenados para cada pico cromatográfico que aparecem na saída da coluna (SKOOG et al., 2002).

A análise de tricotecenos é frequentemente utilizada por detectores UV devido ao baixo custo de aquisição (quando comparado ao DAD) e as características dessa classe de micotoxinas, uma vez que em geral, não possuem grupos cromóforos em suas estruturas e, desta forma não podem ser analisada diretamente por colorimetria, espectrofotometria e nem por fluorimetria, portanto necessita-se de um processo de derivatização para a adição de um grupamento cromóforo ou fluorescente para melhorar sua detecção, o que dificulta a análise por outros tipos de detectores (MILANEZ, 2003).

Outro detector bastante utilizado para algumas micotoxinas é o detector de fluorescência, a qual baseia-se no princípio de emissão de curta duração através da radiação recebida pela molécula. A fluorescência molecular é medida excitando-se a amostra no comprimento de onda de absorção, também conhecido como comprimento de onda de excitação, e medindo-se a emissão a um comprimento de onda mais alto denominado comprimento de onda de fluorescência (SKOOG, 2006). Portanto, apenas moléculas que possuem estruturas rígidas podem ser analisadas por esse tipo de detector, afinal a rigidez diminui a velocidade da relaxação não-radiativa ao ponto em que a relaxação por fluorescência tenha tempo de ocorrer. Algumas micotoxinas como o grupo das aflatoxinas, ZEA e OTA podem ser quantificadas por esse tipo de detector, uma vez que apresentam alta sensibilidade devido as suas estruturas rígidas e as duplas ligações que possuem geram efeito de ressonância, o que facilita a boa detecção desses analitos com e baixos limites de detecção e quantificação (CHEN, et al., 2017).

Outro método de detecção bastante utilizado é o acoplamento de um detector de massas ao cromatógrafo líquido, uma vez que permite a detecção de diversas micotoxinas simultaneamente com boa sensibilidade, fornecendo informações tanto qualitativamente como quantitativamente, tendo como características a distinção de analitos que possam eluir no mesmo tempo de retenção, porém possui a desvantagem de ser uma técnica destrutiva, uma vez que ocorre a fragmentação do analito no íons

quadrupolos do equipamento (HARRIS, 2011).

Para a utilização do detector de massas, o analito não precisa ter qualquer característica específica, uma vez que a técnica se baseia na fragmentação sucessiva da molécula do analito através de múltiplas colisões geradas a partir de um potencial elétrico aplicado por íons quadrupolos, formando íons característicos do analito, o que permite a distinção entre os mais diversos compostos (mesmo compostos isômeros). Devido a técnica ser destrutiva e apresentar um alto custo em relação aos demais detectores devido ao custo do gás de arraste, essa técnica de análise não é a mais utilizada, além disso os limites de detecção e quantificação são considerados altos em relação a outros tipos de detectores, porém estudos têm sido realizados para aumentar a sensibilidade da técnica para a detecção de micotoxinas, afinal há limites de quantificação detectados muito próximos do limite máximo permitido de micotoxina nas matrizes alimentares (HARRIS, 2011; RUBERT et al., 2012; RUBERT et al., 2013).

Portanto, entre os detectores existentes, o de UV e FL são os mais utilizados para a detecção de micotoxinas por apresentarem vantagens devido a serem considerados mais econômicos e possuem boa sensibilidade, por esse motivo eles continuam sendo os mais utilizados para a detecção e quantificação de micotoxinas em diversas matrizes.

3.5.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004). Este é um processo contínuo que se inicia a partir do desenvolvimento do método analítico e necessita de uma estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento para a verificação da eficiência da metodologia desenvolvida. Um novo método analítico deve passar por uma validação para garantir que a informação gerada por este método forneça dados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (SANTE, 2017).

Segundo a (SANTE, 2017), através dos estudos experimentais, a validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados. Muitos autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras (LANÇAS, 2004).

Entre os diversos estudos existentes na literatura são relatados diversos parâmetros analíticos avaliados, mas existe uma conformidade entre eles, sendo que os parâmetros essenciais para garantir a validação e confiabilidade do método que sempre estão presentes são: curva analítica e linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão e exatidão.

A curva analítica tem como objetivo estabelecer uma relação entre a resposta do equipamento e as concentrações do analito em estudo através de soluções padrão. Esta relação matemática pode ser expressa através de um gráfico chamado equação da reta, o qual pode ser denominado como curva analítica (LANÇAS et al., 2004). Portanto é necessário um número mínimo de soluções-padrão que geram respostas no equipamento e formem pontos nos gráficos, para a aceitação de uma curva de calibração, são necessários no mínimo entre cinco a seis níveis de concentração diferente do analito. Essas concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa de 50 a 150% do valor que se espera encontrar na amostra em estudo (SANTE, 2017).

A presença de compostos na matriz pode dificultar a detecção de analitos de modo a eluir no mesmo tempo de retenção do analito, podendo suprimir ou enriquecer o pico cromatográfico (TAYLOR, 2005; RODRIGUES, 2010). Assim, existem procedimentos que promovem a compensação da ocorrência do efeito de matriz como a utilização de analitos protetores, função de correção, adição de padrão e curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz (PINHO et al., 2010). Portanto a função da curva de matriz é corrigir a interferência dos compostos presentes na matriz de modo a não alterar o pico sinal do analito e evitar falsos resultados.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) são utilizados para demonstrar se um método é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações de um analito. O LOD corresponde à menor concentração de um analito que pode ser detectada e que o método seja capaz de diferenciar confiavelmente do ruído. O LOQ é definido como a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis (SANTE, 2017; LANÇAS, 2004). Para a determinação do LOD e do LOQ o método mais correto a ser utilizado é através da relação sinal/ruído, a qual é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras que pode ocorrer através

da diluição do ponto de menor concentração. Para estimar o limite de detecção e quantificação, geralmente considera-se aceitável a razão de sinal/ruído com valor 3 e 10, respectivamente (CASSIANO et al., 2009).

A exatidão mede quanto o valor obtido se assemelha ao valor tido como referência e aceito como verdadeiro (LANÇAS, 2004). Normalmente, a exatidão é expressa em termos de percentagem e os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são o uso de materiais de referência, a comparação de métodos, os ensaios de recuperação e a adição padrão (SANTE, 2017). Para avaliar a exatidão sempre se devem considerar certos limites, a um dado nível de significância, afinal a exatidão aparece sempre associada a valores de precisão. Estes valores podem ser estreitos em níveis de concentração mais elevados e mais amplos em níveis traços. O ensaio de recuperação é o procedimento mais usual para verificar a exatidão de um método, sendo calculado por comparação da resposta obtida com o analito adicionado na matriz em estudo e extraído com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente (BRITO et al., 2003; CASSIANO et al., 2009). Os estudos em relação aos ensaios de recuperação para as micotoxinas demonstram que estes devem permanecer dentro da faixa permitida pela legislação, ou seja, em torno de 70 a 120% (SANTE, 2017).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob certas condições definidas (SANTE, 2017). Geralmente a precisão é expressa como desvio padrão relativo, sendo aceitáveis valores de até 20 % para a análise de componentes traço. A precisão pode ser avaliada em três níveis: reprodutibilidade, repetibilidade e precisão intermediária, sendo as duas primeiras as maneiras mais usuais de avaliação dessa figura de mérito (BRITO et al., 2003).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob variação de condições como mudança de operador, local, equipamentos, etc (INMETRO, 2003). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada quando se quer a padronização e inclusão de procedimentos analíticos. O termo repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições em um curto intervalo de tempo: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e condições de análise.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu em avaliar um procedimento de extração simultânea dos tricotecenos, ZEA e OTA e outro método para a extrações das aflatoxinas em amostras de cerveja. Foi realizada a otimização do método de QuEChERS proposto por Rodriguez-Carrasco et al., (2015) para a extração dos tricotecenos, OTA e ZEA, juntamente a um segundo método de partição líquido-líquido otimizado, que foi descrito por Garda-Buffon et al., (2004) e Bauer et al., (2016) para a extração das aflatoxinas.

As técnicas CLAE-UV e CLAE-FL foram empregadas para a separação e identificação dos compostos. O tempo de retenção dos padrões das micotoxinas, bem como o tempo total de eluição foram utilizados para se estabelecer as condições de separação cromatográfica. Para a validação do método foram adotados os seguintes parâmetros: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e efeito matriz.

Os experimentos do estudo foram realizados no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos pertencente à Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 MATERIAIS

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador orbital TECNAL TE-420 (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica de precisão FA2104N BIOPRECISA (São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico 25 mHz UNIQUE (São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico UNIQUE Ultra Cleaner 700 (Brasil);
- Banho maria BIOPAR COEL TLK 48 (Brasil);
- Bomba de vácuo PRISMATEC (São Paulo, Brasil);
- Centrífuga refrigerada CIENTEC CT-5000R (São Paulo, Brasil);
- Coluna analítica Gemini C₁₈ (250 x 4,5 mm, 5 µm) PHENOMENEX (EUA);
- Coluna analítica Gemini C₁₈ 5 µm (250 x 4,6 mm diâmetro interno);
- Concentrador TECNAL TE-019 (São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo Líquido SHIMADZU (Quioto, Japão) equipado com sistema

administrador CBM-20A módulo LC-20AT, desgaseificador DGU-20A₅ e detector UV- VIS SPD-20A, conectado em *software LC solution data aquisition*, injetor Rheodyne loop 20 MI;

- Cromatógrafo Líquido SHIMADZU (Quito, Japão) equipado por um sistema de bombas 26 (modelo LC- 20AT), desgaseificador da fase móvel (modelo DGU-20A₅), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e detector de fluorescência (modelo FL – 10AXL);
- Destilador de água QUIMIS 341-25 (Brasil);
- Espectrofotômetro modelo Cary 100 – UV-VISIBLE VARIAN (Walnut Creek, EUA);
- Estufa;
- Microcentrífuga MINISPIN (Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 – 1000 µL e 1000 – 5000 µL;
- Potenciômetro modelo HANNA HI 221;
- Sistema de purificação de água Mili-Q Direct-Q UV3 MILLIPORE (EUA);
- Turbidímetro portátil HACH;
- Vórtex Mixer VIXAR (Coreia).

4.1.2 SOLUÇÕES

- Acetonitrila grau HPLC PANREAC (Espanha);
- Acetonitrila P.A. VETEC (Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3 MILLIPORE (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Celite NUCLEAR (Brasil);
- Cloreto de sódio SYNTH (Brasil);
- Clorofórmio P.A. SYNTH (Brasil);
- Frascos de vidro âmbar, capacidade de 10 a 50 mL;
- Gás nitrogênio
- Membrana de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de diâmetro de poro MILLIPORE (São Paulo, Brasil);
- Metanol P.A. SYNTH (Brasil);

- Padrões analíticos: Deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol, Nivalenol, Ocratoxina A, Zearalenona e Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) SYGMA-ALDRICH (EUA);
- Solução de DNS;
- Solução padrão pH 4 e 7;
- Solução NaOH (1M);
- Solução HCl (1M);
- Solução de Folin (1:3);
- Solução de Mistura Alcalina (1 mL de tartarato duplo de Na e K; 1 mL de sulfato de cobre e 348 mL de carbonato de Na);
- Solução de ácido 5-5'ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DNTB);
- Solução Indicador Fenolftaleína (1%);
- Tampão fosfato 0,5 mM pH 8;
- Vidraria comum de rotina (béquer, erlenmeyer, pipetas volumétricas, balões volumétricos, tubos de ensaio, funil de separação, etc).

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções analíticas estoque dos tricotecenos foram preparadas a partir de recipientes comerciais que continham 1 mg de cada micotoxina onde os tricotecenos do grupo A e B foram dissolvidos em benzeno:acetonitrila (exceto NIV, apenas em ACN) (95:5 v/v) até uma concentração de 100 µg mL⁻¹ (AOAC, 1995). A solução estoque de ZEA foi preparada a partir de uma mistura de benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) a uma concentração de 500 µg mL⁻¹ (AOAC, 1995). A solução de OTA foi preparada a partir do padrão sólido que foi dissolvido com benzeno:acetonitrila (98:2 v/v) até uma concentração de 50 µg mL⁻¹ (AOAC, 1995). As soluções padrão de aflatoxinas foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em mistura de tolueno:acetonitrila (98:2 v/v) até uma concentração de 50 µg mL⁻¹ (AOAC, 2000).

Após, exceto as soluções de aflatoxinas que foram diluídas para obter soluções de 10 µg.mL⁻¹, as demais soluções estoque foram diluídas de modo a se obter soluções padrão cujas concentrações corresponderiam a 50 µg.mL⁻¹ segundo relação massa/volume e confirmada por espectrofotometria, de acordo com metodologia descrita pela AOAC (1995), por Bennett e Shotwell (1990) e Krska et al., (2007).

Foram utilizados os valores da absorvidade molar (ϵ) e comprimentos de onda de máxima absorbância, de acordo com a Tabela 5, para estimar a concentração das soluções trabalho, conforme a Equação 1.

Tabela 5: Absorvidades molares e comprimentos de onda de máxima absorbância de cada micotoxina em estudo (AOAC, 1995; KRŠKA et al., 2007).

Micotoxinas	Absorvidades molares* (ϵ)	Comprimentos de onda de máxima absorbância (nm)
Deoxivalenol	6808	220
3-acetil-deoxivalenol	6911	220
15-acetil-deoxivalenol	6895	220
Nivalenol	6836	220
Aflatoxina B ₁	19800	360
Aflatoxina B ₂	20900	362
Aflatoxina G ₁	17100	362
Aflatoxina G ₂	18200	362
Ocratoxina A	5550	333
Zearalenona	6060	317

Tricotecenos resuspensão em acetonitrila, AFLAS em metanol, OTA em benzeno:ácido acético (99:1) e ZEA benzeno:acetonitrila (98:2, v/v)

A quantificação das soluções padrão de cada uma das micotoxinas foi realizada após a varredura no espectro ultravioleta e verificação da pureza de cada composto.

$$\mu\text{g.mL}^{-1} = Abs \times M M \times 1000 \times F C \times \epsilon^{-1} \times C^{-1} \quad (1)$$

Abs = valor da absorbância da solução padrão; M.M. = massa molecular da micotoxina FC = fator de correção do instrumento; ϵ = absorvidade molar da micotoxina no comprimento de onda de máxima absorbância no solvente; C = largura da cubeta (1 cm).

A solução trabalho contendo a mistura das micotoxinas foi preparada na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (aflatoxinas) e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (tricotecenos) foram diluídas e foram utilizadas para o preparo das curvas analíticas.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 PREPARO E COLETA DA AMOSTRA

As amostras de cerveja comercialmente vendidas do tipo Pilsen e Lager (n=31) foram coletadas de marcas e lotes diferentes em estabelecimentos localizados na cidade de Rio Grande -RS.

Após a abertura das amostras, foi realizado o processo de desgaseificação a fim de eliminar o CO₂ através de agitação de orbital, 200 rpm por 30 min e posterior em banho ultrassônico por 30 min. As amostras após abertas foram armazenadas em

temperaturas de congelamento até o momento de análise.

4.3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A determinação do pH e da turbidez nas amostras foram realizadas através do método descrito pela AOAC (1995). A medida da cor foi realizada de acordo com o método colorimétrico proposto pela Convenção Europeia de Cervejaria (European Brewery Convention, 2005). A determinação do extrato seco foi realizada segundo metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2005), onde 25 mL de amostra desgaseificada foram colocadas em cápsulas de porcelana previamente taradas e levadas em banho maria por 3h a 60 °C seguido de estufa à 100 °C por 1 h para obtenção da massa resultante.

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) segundo Miller (1959), onde primeiramente a amostra foi diluída em água (1:25) e depois a 1 mL de amostra diluída foi adicionado 1 mL de NaOH e 1 mL de DNS e a mistura foi levada para banho Maria por 5 min. Interrompeu-se a reação com banho de gelo e completou-se o volume até 10 mL com água para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 546 nm. Para a determinação de açúcares totais, primeiramente uma alíquota da amostra diluída (1:36) foi adicionada em um tubo de ensaio com rosca fechado contendo 1 mL de HCl (1M) e deixada em à 100 °C por 2 h. Após esse tempo, os açúcares totais foram convertidos a açúcares redutores, e foi adicionado 2 mL de NaOH (1M) para alcalinizar o meio e quantificou-se os açúcares totais com DNS descrito acima. A medida dos açúcares não-redutores foi realizada por diferença entre os açúcares totais e os açúcares redutores.

A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método adaptado de Lowry et al. (1951), utilizando o reagente Folin-Ciocalteau 0,5 mol.L⁻¹ em meio alcalino, diluindo a amostra primeiramente (1:10) e adicionando 4,5 mL de mistura alcalina (1 mL de tartarato duplo de Na e K; 1 mL de sulfato de cobre e 348 mL de carbonato de Na). Após 10 min, foi adicionado 1 mL do reagente de Folin diluído (1:3) e reação de 30 min, a solução foi analisada no espectrofotômetro em 660 nm.

A determinação da acidez total pelo teor de ácido pirúvico foi realizada segundo Costa (2010), a qual 10 mL de amostra foi diluída em 100 mL de água através de titulação foi calculada a concentração de ácido pirúvico pelo volume de base previamente padronizada que foi adicionado. O teor de acidez total correspondente

ao ácido pirúvico foi calculado através da equação, como está abaixo:

$$A_t = \frac{1000 \cdot f \cdot v \cdot M}{V} \quad (2)$$

A_t = Acidez total; f = fator de correção do NaOH; v = volume de NaOH gasto na titulação (mL); M = molaridade da solução de NaOH utilizada; V = volume da amostra (mL).

O teor de conteúdos fenólicos foi quantificado através do método elaborado por Schmidt et al., (2014), onde a amostra foi diluída com H₂O destilada (1:26), após adicionar 4,5 mL da mistura alcalina e deixar reagir por 15 min em banho Maria à 40 °C. Após isso, foi adicionado 0,5 mL do reagente Folin-Ciocauteau agitando e posteriormente deixar em repouso por 10 min. Logo após, a solução foi realizada a leitura da solução na absorvância de 750 nm.

As concentrações de proteínas, compostos fenólicos, açúcares redutores, não-redutores e totais foram determinadas através de curva analítica construída a partir de uma solução padrão de albumina ($y = 1,6936x - 0,0257$), ácido gálico ($y = 0,0145x$) e glicose ($y = 1,2165 - 0,1093$), respectivamente, seguindo os procedimentos descritos para cada análise de determinação desses compostos.

4.3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

A determinação da concentração de glutatona reduzida foi realizada através do método colorimétrico proposto por Owens e Belcher (1965), onde 2 mL de amostra foram adicionados em tubo de ensaio, acrescentar 1,5 mL de tampão fosfato (0,5 Mm pH 8) e 0,03 mL (30 µL) de Solução de ácido 5-5'ditio-bis-(2-nitrobenzóico). Após o tempo de reação (3 min), realizar a leitura em espectrofotômetro à 412 nm. A concentração de glutatona reduzida foi determinada através de curva de calibração ($y = 11,097x - 0,0082$), realizada utilizando solução padrão de glutatona.

Para a determinação da atividade da peroxidase, foi utilizado o método proposto por Garda-Bufferon et al., (2011). Primeiramente foi adicionado 2 mL de amostra a um tubo e ensaio juntamente a 1,5 mL de tampão fosfato (5 mM pH 6), 0,5 mL de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. Após a mistura dos reagentes, o tubo foi condicionado a 30° C durante 10 min. Após a solução esfriar a temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm.

4.3.4 DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

A determinação dos tricotecenos, OTA e ZEA foi realizada segundo método de QuEChERS proposto por Rodriguez-Carrasco et al., (2015) e foi modificado no qual se testaram as melhores condições de tempo de extração, proporção amostra:solvente e a acidificação do solvente com ácido acético. A extração das aflatoxinas foi realizada por partição líquido-líquido otimizado por Garda-Buffon et al., (2004), com modificações na proporção entre amostra:solvente. Ao longo da extração houve emulsão entre amostra e o solvente, portanto foi necessária uma etapa adicional de separação, que foi baseado através de centrifugação como proposto por Bauer et al., (2016).

Para a extração das micotoxinas OTA, ZEA e o grupos dos tricotecenos A e B foi realizado o método QuEChERS. Primeiramente foi adicionado 10 mL de amostra a um erlenmeyer de 250 mL juntamente a 10 mL de ACN. A mistura foi levada a agitação orbital durante 10 min à 200 rpm. Após, a mistura foi colocada em um tubo falcon de 50 mL para a adição de sais (4g de $MgSO_4$ + 1g de NaCl) , com agitação em vortex (30 s) e ultrassom (3 min) e posterior centrifugação à 3220g por 5 min. Após separação das fases, fase orgânica foi recolhida e adicionada a um tubo falcon de 15 mL para adição dos sais de limpeza (0,3g de celite + 0,9g de $MgSO_4$), com posterior homogeneização em vortex (30 s), ultrassom (3 min) e centrifugação à 1577xg por 3 min. Por fim, foi recolhido 5 mL em um vidro âmbar para evaporação do solvente e posterior ressuspensão em 1 mL de ACN para análise no equipamento.

Para a quantificação dos tricotecenos do grupo A e B em CLAE-UV foi utilizada a coluna Gemini C18 5,0 μm (250 x 4,6 mm), operando no modo de eluição isocrático utilizando acetonitrila:água (70:30 v/v) como fase móvel, com um fluxo de injeção de 0,5 mL.min⁻¹ e tempo de corrida total de 15 min em detector UV com comprimento de onda de excitação de 220 nm até 7 min de análise para quantificação de DON, ADONS e NIV, após esse tempo o comprimento de onda de excitação foi modificado para 193 nm para a detecção da Toxina T-2, mantendo o fluxo e a proporção da fase móvel (SEUS, 2014).

Para a detecção de ZEA em CLAE-UV, foi utilizada a coluna Gemini C18 5,0 μm (250 x 4,6 mm) e utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila:água acidificada (1% ácido acético) na proporção 90:10 (v/v) com vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e tempo de corrida total de 7 min em detector UV com comprimento de onda de excitação de 270 nm e emissão de 455 nm (OLIVEIRA, 2016).

A quantificação de OTA foi realizada em CLAE-FL utilizando a coluna Kromasil

C18 de dimensões 4,6 x 150 mm x 5 µm e utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila:água acidificada (1% ácido acético) na proporção 50:50 (v/v) com vazão de 1 mL.min⁻¹ e tempo de corrida total de 10 min em detector FL com comprimento de onda de excitação de 333 nm e emissão de 460 nm (KUPSKI, 2015).

Para a extração das aflatoxinas, foi utilizado o método de partição líquido-líquido que consiste em adicionar 10 mL de amostra desgaseificada em um erlenmeyer de 125 mL, onde 3 mL do solvente orgânico extrator (diclorometano) foram adicionados e a mistura agitada em agitador orbital por 10 min à 150 rpm. Após a amostra foi transferido a tubo de vidro e centrifugada durante 3 min a 1577xg. Foi recolhida a fase orgânica em frasco de vidro âmbar para posterior evaporação do solvente. A amostra foi devolvida ao erlenmeyer e adicionado novamente o solvente orgânico repetindo todo o processo mais duas vezes (3 vezes no total).

A quantificação das aflatoxinas foi realizada em CLAE-FL utilizando a coluna Kromasil C18 de dimensões 4,6 x 250 mm x 5 µm e utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila:metanol:água acidificada (1% ácido acético) na proporção 62:24:14 (v/v) com vazão de 1 mL.min⁻¹ e tempo de corrida total de 20 min em detector FL com comprimento de excitação de 350 nm e emissão à 450 nm (TELLES, 2015).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por análise de componentes principais (PCA) com a ajuda do *software* PAST 2.04.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RECUPERAÇÕES DO MÉTODO QuEChERS

Primeiramente a concentração de todas as micotoxinas foi determinada através de curvas de calibração realizadas com soluções padrão, porém quando necessário, foram realizadas curvas de calibração na matriz com o objeto de minimizar a presença de interferentes na determinação dos analitos (Tabela 6).

Tabela 6: Curvas de calibração de micotoxinas no solvente e na matriz

Micotoxina	Concentração	Curva no solvente	Curva na matriz
AFB ₁	0,1-10 ng.L ⁻¹	35404x – 7862	-
AFB ₂	0,006-1 ng.L ⁻¹	693206x – 6588,1	-
AFG ₂	0,012-5 ng.L ⁻¹	443822x – 55537	-
OTA	0,3-27,3 ng.L ⁻¹	18584x – 510,2	-
ZEA	0,01-2 µg.L ⁻¹	1000000x + 7149,4	-
Toxina T-2	0,5-3,8 µg.L ⁻¹	45923x	-
DON	0,13-4 µg.L ⁻¹	70828x – 3186,1	Matriz: 77108x – 3103,6
ADONs	0,68-7,9 µg.L ⁻¹	16544x + 533,1	Matriz: 1000000x – 16372
NIV	0,24-4 µg.L ⁻¹	51832x – 8297,3	Matriz: 1000000x + 45533

Foi realizado um planejamento experimental variando algumas condições de extração do método, tais como a proporção solvente:amostra, tempo de extração e acidificação com ácido acético para incluir um maior número de analitos durante a extração.

O planejamento experimental torna-se necessário para otimizar a eficiência do método para uma análise de multimicotoxinas com diferentes polaridades entre si. Para isso, o tempo de extração foi testado a fim de saber qual é o ideal para as micotoxinas, minimizando a extração de compostos interferentes da amostra e melhorando a recuperação dos analitos. A acidificação do solvente é importante para otimizar o processo de extração das micotoxinas na cerveja, afinal devido a diferente polaridade dos analitos, os íons gerados podem facilitar a migração das micotoxinas para o solvente (LEHOTAY et al., 2015). O estudo entre a proporção solvente/amostra torna-se importante para avaliar a quantidade de solvente utilizada a fim de extrair de modo seguro os analitos, reduzindo a presença de compostos interferentes que compõe a matriz, com o objetivo simultâneo de otimizar a extração dos analitos dentro de uma faixa aceitável de recuperação e que o perfil cromatográfico esteja livre de

possíveis interferentes.

Tabela 7: Variáveis testadas no planejamento experimental

Variáveis	-1	0	+1
ACN acidif.	0%	1%	2%
Amostra:ACN	1:0,5	1:1	1:2
Tempo Extração	1 min	10 min	20 min

Dentre as condições testadas, as que tiveram melhor resultado foram os pontos centrais (9, 10 e 11) juntamente com o ponto 5 e 6, conforme se observa na Tabela 7. Em relação aos ensaios de recuperação do método, pode ser observado na Tabela 8 e Tabela 9 a validação da otimização do método.

Tabela 8: Recuperações das micotoxinas em cerveja.

Teste	NIV (%)	DON (%)	ADONS (%)	ZEA (%)	OTA (%)	AFB ₁ (%)
1	144	73,8	99,8	93,1	88	-
2	25,6	111,2	242,3	122,3	92	-
3	107,1	41,5	169,5	62,2	89	-
4	197,7	250,0	274,5	42,6	95	-
5	72,4	97,1	102,2	98,9	86	-
6	77,8	93,2	107,8	43,5	104	-
7	32,2	32,2	175,1	80	96	-
8	-	80,2	108,5	53,2	92	-
9	82,0	115,3	107,7	92,4	80	-
10	89,5	116,0	104,8	92,5	90	-
11	81,4	132,4	97,7	96,5	85	-

Tabela 9: Resultados de recuperação para as micotoxinas em estudo utilizando o método QuEChERS otimizado.

Níveis de Contaminação $\mu\text{g L}^{-1}$	Rec(%)/RSD(%)					Níveis de Contaminação ng L^{-1}	Rec(%)(RSD%)
	NIV	DON	ADONS	T2	ZEA		
50	62.1/9,3	84.3/8,5	89.7/8,7	75.3/6,8	84.4/8,8	5	82.5/7,8
100	84.3/8,8	101.7/5,5	101.3/8,9	77.6/5,2	93.8/5,2	10	88.3/8,8
200	83.6/7,5	95.3/5,1	92.3/6,2	79.4/4,2	95.1/4,5	20	89.1/6,3

Tabela 10: Validação das figuras de mérito do método QuEChERS modificado.

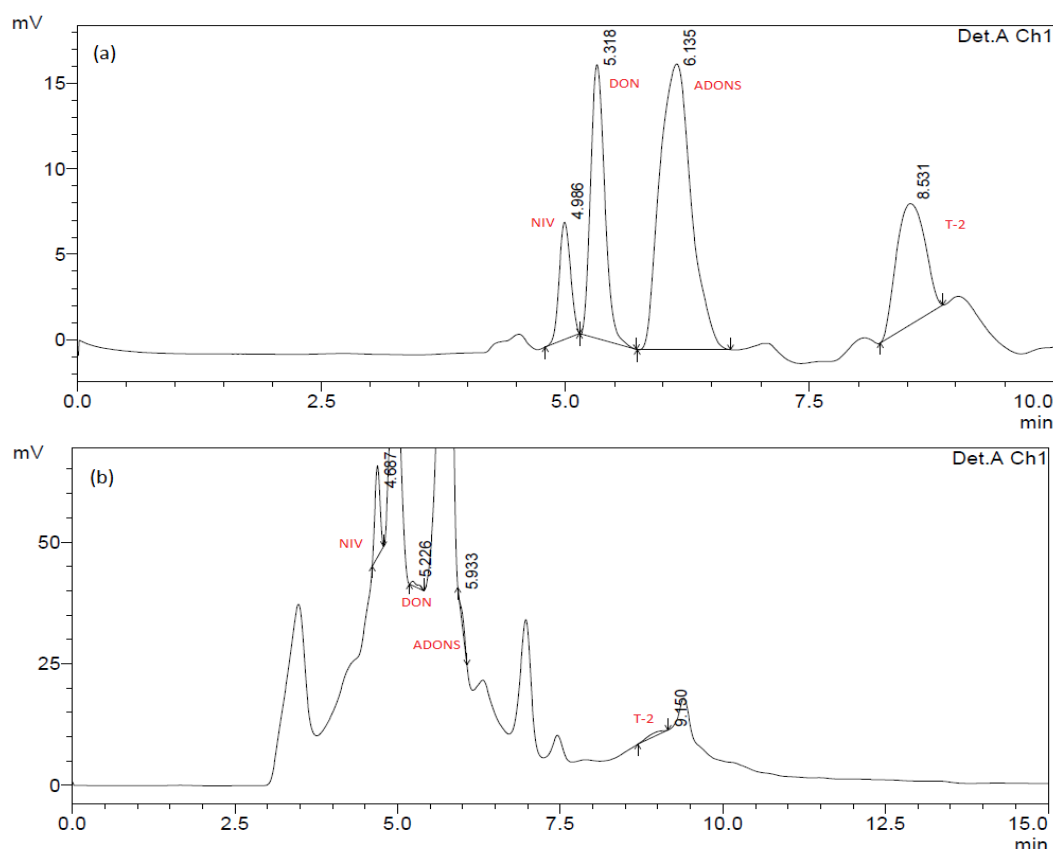
Micotoxina	LOD _(m) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ _(m) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EF ^a (%)	Rec (%)	Intradia ^b		Inter dia ^c	
					Nível baixo	Nível alto	Nível baixo	Nível alto
NIV	0.08	0.3	504	76.7	4.4	5.9	8.2	6.2
DON	0.03	0.1	8.9	93.8	3.5	6.1	8.9	7.7
ADONS	0.08	0.8	93	94.4	6.5	3.5	7.8	7.0
T2	0.15	0.5	2.5	77.4	5.8	4.9	7.6	6.7
ZEA	0.005	0.01	3.5	91.1	7.9	6.0	5.5	4.1
	LOD_(m)	LOQ_(m)						

	(ng.mL ⁻¹)	(ng.mL ⁻¹)						
OTA	0,23	0.7	3.2	86.6	8.7	7.2	8.1	5.2

^a Efeito Matriz (EF %): (inclinação da curva preparada no extrato da matriz - inclinação da curva preparada no solvente / inclinação da curva preparada no solvente) x 100.

A precisão avaliada através da ^b Repetibilidade (número de replicatas:10) e ^c Precisão intermediária (dias diferentes:5) em nível baixo (50 µg L⁻¹) e em nível alto (200 µg L⁻¹) para os tricotecenos e nível baixo (5 µg L⁻¹) e nível alto (20 µg L⁻¹) para OTA de acordo com o erro relativo padrão (%).

Figura 5: Cromatogramas do método QuEChERS modificado na curva (a) e na amostra (b).



Conforme relatado acima, prova-se a eficiência do método através do cumprimento das figuras de mérito exigidas para a validação de um método otimizado, sendo essas a exatidão por ensaios de recuperação, precisão por repetibilidade através da variação da análise por determinado intervalo de tempo no mesmo equipamento, o LOQ e LOD, tal como as curvas de linearidade que possuem um coeficiente de correlação linear acima de 0,99, o que está de acordo com as normas estabelecidas na SANTE (2007).

Em relação a recuperação da Aflatoxina B₁ (a aflatoxina do grupo com maior ocorrência em cervejas), foi necessária uma etapa adicional de otimização para melhorar a recuperação devido a sua diferença de polaridade em relação as demais. As aflatoxinas possuem polaridade mais elevada em comparação as outras

micotoxinas. Para isso, foram testadas novas condições de extração com o intuito de aumentar a eficiência da recuperação do analito conforme apresentado na Tabela 10.

Essas variáveis foram testadas em duplicata de acordo com as melhores condições obtidas do planejamento experimental descrito anteriormente (condições dos pontos centrais sem acidificação), variando com uma mistura de solventes nos experimentos 2 e 3 e a ausência de sais no experimento 1.

De acordo com os testes realizados, obteve-se o seguinte resultando após a avaliação experimental, conforme encontra-se na Tabela 10.

Tabela 11: Recuperações da Aflatoxina B₁ em cerveja.

Amostra	Solvente	MgSO ₄	Recuperação (%)
1	ACN	Sem	26%
2	ACN + MeOH (70:30 v/v)	Sem	45%
3	ACN acidificada (0,1% ácido fórmico) + acetato de etila (82:18 v/v)	Com	282%

Após analisar os dados, percebe-se que na extração com ACN:Acetato de etila houve a presença de interferentes no extrato, o que justifica uma recuperação acima do recomendado (120%). Já as condições com ACN + MeOH apresentaram uma recuperação baixa, o que evidenciou que mesmo com a retirada do MgSO₄ durante as etapas de extração, não foi possível otimizar um método para a extração de todas as micotoxinas na amostra. Devido a possibilidade de interferir na recuperação das outras micotoxinas que se apresentaram dentro da faixa aceitável de recuperação (70-120%) optou-se pela extração das aflatoxinas por outro método.

5.2 MÉTODO PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Uma alternativa para a extração das aflatoxinas na amostra foi testar um novo método de partição líquido-líquido na amostra com o objetivo de quantificar micotoxinas comumente ocorrentes nas matérias primas (GONZALEZ-PEREYRA et al., 2011) e conseqüentemente na cerveja (ODHAV e NAICKER, 2002). Para isso foram otimizadas algumas condições a fim de se obter um método de partição preciso e exato para a extração do analito na amostra.

Segundo estudo realizado por Garda-Buffon et al., (2004), utilizou-se o clorofórmio e o diclorometano como solvente extrator para avaliar sua afinidade e poder solubilidade com micotoxinas. A escolha desses solventes foi devido sua propriedade hidrofóbica, separando-se da amostra e formando duas fases e torna-se possível recolher sem dificuldades a partição do solvente extrator que fica no fundo

devido a sua densidade ser maior que a do meio aquoso, cerveja.

Na primeira execução do método com clorofórmio foi utilizado um funil de separação para separar as fases após a agitação orbital, porém as triplicatas obtidas (80%, 57% e 99%) tiveram resultados com variação maior que 20% devido a formação de emulsão. Por esse motivo, foi necessário implementar uma etapa de centrifugação para otimizar a separação da fase orgânica e aquosa, como é descrito no método de Bauer et al., (2016) (Tabela 11).

Tabela 12: Recuperação para a extração por partição líquido-líquido de aflatoxinas.

Solvente	Recuperação das Aflatoxinas (%)			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Clorofórmio	71,1/71	124,1/105,2	N.D.	50,8/65,1
Diclorometano	73,6/71,1	86,5/88,3	103,7/62,1	79,8/83,7

AFB₁= Aflatoxina B₁; AFB₂= Aflatoxina B₂; AFG₁= Aflatoxina G₁; AFG₂= Aflatoxina G₂.

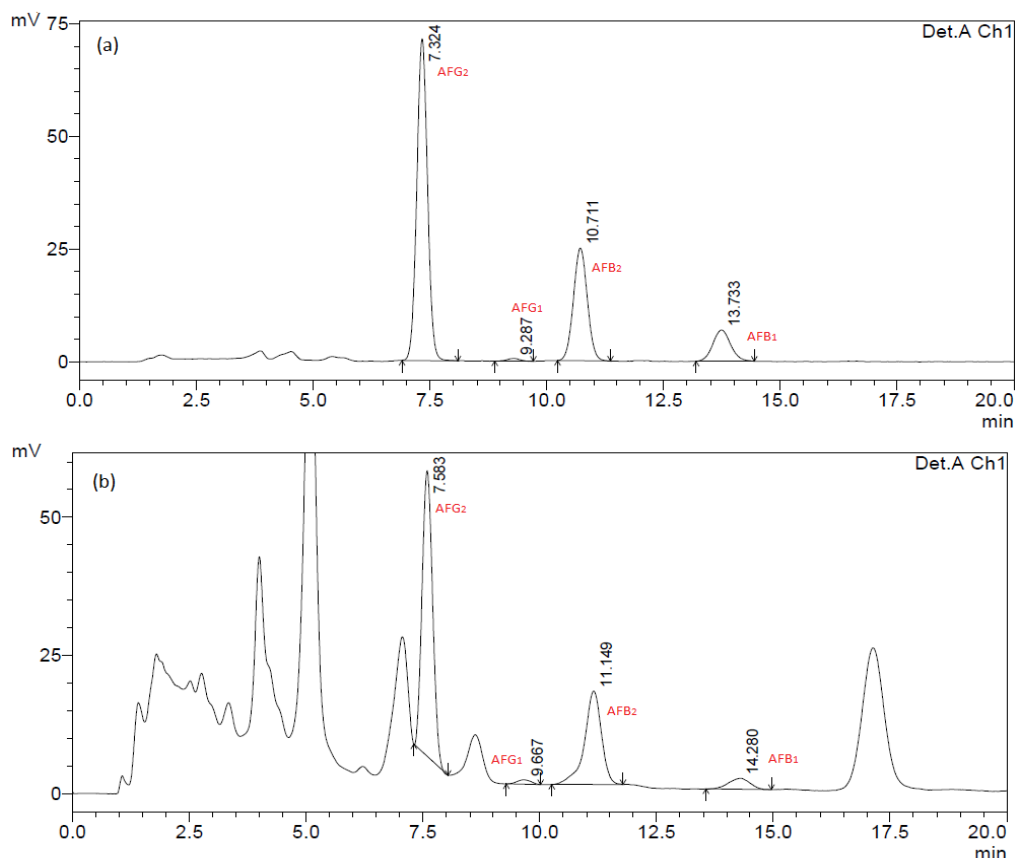
Portanto, o método escolhido foi o que utilizava o diclorometano como solvente extrator devido as recuperações estarem dentro da faixa do aceitável (70-120%). O próximo passo após a escolha do método foi a validação do mesmo. Como podemos ver na Tabela 12, os ensaios de recuperação do método em três diferentes níveis de contaminação comprovam a exatidão do método por recuperação dentro da faixa do aceitável para compostos com concentrações traço (70-120%) e o ensaio de precisão através do erro puro para os ensaios realizados em triplicata.

Tabela 13: Resultados das recuperações, LOQ e LOD para as aflatoxinas.

Micotoxina	NC (ng.mL ⁻¹)	Rec(%)/RSD(%)	LOD _(m) (ng.mL ⁻¹)	LOQ _(m) (ng.mL ⁻¹)	EF (%)
AFB ₁	0,5	90,8 (4,7)	0,07	0,24	EM<20%
	1	108,6 (2,1)			
	10	87,3 (1,3)			
AFB ₂	0,05	108,6 (2,1)	0,003	0,006	EM<20%
	0,5	108,4(11,7)			
	1	91,2 (1,5)			
AFG ₂	0,2	87,3(1,3)	0,006	0,012	EM<20%
	2	94,2(2,9)			
	5	93,1(3,2)			

NC= Nível de Contaminação; EF= Efeito Matriz.

Figura 6: Cromatogramas do método PLL modificado na curva (a) e na amostra (b).



Em relação as curvas de calibração utilizadas, todas estão de acordo com o SANTE (2007), que estipula um coeficiente linear superior a 0,9 como aceitável. Na Tabela 12, podemos ver os outros parâmetros relacionados a validação do método, o que comprova a segurança e a eficiência do mesmo.

Portanto, podemos verificar a confiabilidade do método, pois atende todas as figuras de mérito para a validação da otimização do método. A exatidão foi comprovada através de um ensaio de recuperação que se encontra dentro dos valores estabelecidos para compostos traço (70-120%) (SANTE, 2017). A precisão foi medida através do desvio das triplicatas, que deve ter um coeficiente menor do que 20%. Os baixos limites de detecção e quantificação garantem que o método é sensível para a detecção de concentrações traço do analito, o que torna o método apto para uso.

Em relação a micotoxina AFG₁, quando foi testada sua recuperação pelo método de PLL com diclorometano em nível intermediário de contaminação, a variação apresentou valores superiores a 20%, o que significa que para a extração desses analitos o método analítico não é reprodutivo. Portanto optou-se pela exclusão da micotoxina por não atender os parâmetros de validação de um método otimizado.

5.3 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM AMOSTRAS DE CERVEJA

Diversas marcas de cerveja foram analisadas, variando sua composição entre cervejas do tipo puro malte (apenas adição de cevada), com adição de cereais não-maltados, com adição de carboidratos de origem vegetal ou mesmo uma mistura de todas as matérias-primas citadas.

Para realizar o tratamento adequado dos dados foi necessário subdividir as amostras em quatro grandes grupos a partir das matérias-primas utilizadas, conforme constava no rótulo das amostras. O primeiro grupo foi dividido por cervejas que se caracterizam como puro malte, ou seja, sua composição utilizou cevada como única matéria-prima para a produção da bebida. O segundo grupo formado caracterizou-se pela utilização de cevada maltada juntamente a cereais não-maltados como adjuntos no processo de fermentação (milho, arroz, aveia, trigo, entre outros), porém cada amostra possuiu a utilização de algum cereal maltado ou mistura destes, o que difere entre as marcas e não foi especificado no rótulo de composição da bebida que cereais foram utilizados. O terceiro grupo foi formado a partir de cervejas que utilizavam uma mistura de cevada, cereais não-maltados juntamente com carboidratos de origem vegetal (amido de milho e xarope de cereais) e antioxidantes em sua formulação como matéria-prima para o preparo da cerveja. O quarto grupo é constituído de amostras que utilizavam cevada e carboidratos de origem vegetal e antioxidantes.

Na tabela 13, estão apresentados os dados sobre a ocorrência das micotoxinas nas amostras coletadas de uma forma geral. Já nas tabelas 14, 15, 16 e 17 encontram-se os dados de ocorrência de micotoxinas de cada grupo.

Tabela 14: Ocorrência de micotoxinas nas amostras coletadas.

Micotoxinas	Positivas	(%)	Concentração $\mu\text{g.L}^{-1}$	
			Faixa ^a	Média ^b
DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	19/31	61,3%	0,3-52,8	19,3
ADONS ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2/31	6,4%	1,4-3,1	2,2
ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	15/31	48,4%	0,03-3,6	0,8
Toxina T-2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	15/31	48,4%	1,3-18	7,4
NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	11/31	35,5%	0,5-2,5	1
AFB ₁ (ng.L^{-1})	28/30	93,3%	2,9-9,2	5,2
AFB ₂ (ng.L^{-1})	14/30	46,7%	0,12-0,43	0,2
AFG ₂ (ng.L^{-1})	21/30	70%	1,3-1,6	1,3
OTA (ng.L^{-1})	3/31	9,7%	2-8,4	4,2

^{a,b} Todas as amostras positivas

Tabela 15: Ocorrência de micotoxinas nas amostras PM.

Micotoxinas	Positivas	(%)	Concentração $\mu\text{g.L}^{-1}$	
			Faixa ^a	Média ^b
DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4/6	66,6%	19,2-52,8	35,2
ADONS ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2/6	33,3%	1,4-3,1	2,2
ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4/6	66,6%	0,03-1,9	0,8
NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	3/6	50%	0,7-1,2	0,8
AFB ₁ (ng.L^{-1})	6/6	100%	3,3-5,2	4,1
AFB ₂ (ng.L^{-1})	4/6	66,6%	0,1-0,3	0,2
AFG ₂ (ng.L^{-1})	4/6	66,6%	1,3-1,6	1,4

^{a,b} Todas as amostras positivas

Tabela 16: Ocorrência de micotoxinas nas amostras C N-M.

Micotoxinas	Positivas	(%)	Concentração $\mu\text{g.L}^{-1}$	
			Faixa ^a	Média ^b
DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	10/13	77%	9,3-23,9	14,5
ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	8/13	61,5%	0,07-2,23	0,5
Toxina T-2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	7/13	53,8%	1,3-17,95	9,54
NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	5/13	38,5%	0,7-2,5	1,3
AFB ₁ (ng.L^{-1})	11/13	84,6%	2,9-9,22	4,9
AFB ₂ (ng.L^{-1})	5/13	38,5%	0,1-0,2	0,16
AFG ₂ (ng.L^{-1})	11/13	84,6%	1,3-1,4	1,4
OTA (ng.L^{-1})	1/13	7,7%	8,4	-

^{a,b} Todas as amostras positivas

Tabela 17: Ocorrência de micotoxinas nas amostras CV.

Micotoxinas	Positivas	(%)	Concentração $\mu\text{g.L}^{-1}$	
			Faixa ^a	Média ^b
DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	5/7	71,4%	9,5-22,6	16
ADONS ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1/7	14,3%	4,5	-
ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2/7	28,6%	0,7-3,6	2,2
Toxina T-2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	5/7	71,4%	2,2-12,7	7,5
NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	3/7	42,8%	0,5-0,9	0,7
AFB ₁ (ng.L^{-1})	6/6	100%	3,3-9,1	6,6
AFB ₂ (ng.L^{-1})	4/6	66,6%	0,1-0,2	0,16
AFG ₂ (ng.L^{-1})	3/6	50%	1,3-1,35	1,33

^{a,b} Todas as amostras positivas

Tabela 18: Ocorrência de micotoxinas nas amostras C N-M + CV.

Micotoxinas	Positivas	(%)	Concentração $\mu\text{g.L}^{-1}$	
			Faixa ^a	Média ^b
ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1/5	20%	0,13	-
Toxina T-2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	3/5	60%	1,4-2,8	2,1
OTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2/5	40%	2-2,1	2,1
AFB ₁ (ng.L^{-1})	5/5	100%	4,5-6	5,3
AFB ₂ (ng.L^{-1})	1/5	20%	0,43	-
AFG ₂ (ng.L^{-1})	4/5	80%	1,3-1,35	1,33

^{a,b} Todas as amostras positivas

Em relação aos resultados obtidos, podemos analisar a baixa ocorrência de OTA nas amostras de forma geral (9,7%), diferente do trabalho de ocorrência realizado por Bertuzzi et al., (2011), que encontrou uma alta porcentagem de amostras de cerveja contaminadas (36%), porém com baixos índices de contaminação (0,19 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de concentração máxima encontrada).

A ocorrência de OTA nas amostras de cerveja pode ser explicada devido a utilização de cereais não-maltados contaminados que são adicionados no processo cervejeiro como adjuntos, tais como arroz, reportado por Manizan et al., (2017) com contaminação de até 15% nas amostras de arroz analisadas, com limite máximo detectado de 15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e média de 4,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Adjuntos a base de milho, que segundo Manizan et al., (2017) também foi reportado com uma contaminação de 7% dos grãos analisados, com média de 1,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e a utilização de aveia, que segundo Kuzdralski et al., (2013), a micotoxina foi detectada em 71% das amostras analisadas, com concentração média e máxima de 3,8 e 5,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente.

A ocorrência de ZEA nas amostras apresentou-se em praticamente metade (49,8%) das cervejas analisadas, com níveis de contaminação máximos de 3,64 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e nível médio de contaminação na concentração de 0,79 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As maiores frequências detectadas dessa micotoxina está no grupo 1 que utiliza apenas malte para fabricação da cerveja. Isso pode ser justificado devido a estudos como o de Bolechova et al. (2014) que comprovarem a ocorrência de ZEA em cevada com concentrações preocupantes, pois a média de contaminação encontrada foi de 192,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e concentração máxima acima de 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, o que é legislado por lei para matérias-primas.

Em relação as concentrações da micotoxina na matriz analisada, estudos realizados por Bauer et al., (2016) encontraram concentrações similares as deste

estudo, com média de contaminação de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, porém a ocorrência de ZEA nas amostras no estudo foi de 100%.

A contaminação de ZEA foi detectada em maior concentração nas amostras do grupo 3 que mistura a adição de diversas fontes fermentáveis para a produção de cerveja. Há estudos que comprovam a ocorrência dessa micotoxina em cereais não-maltados, como realizado por Oliveira et al., (2016), que determinou a ocorrência de diversas micotoxinas em grãos de milho na região sul do Brasil, encontrando uma contaminação máxima de $5.088 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de ZEA, com média de $140,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e um índice de 74% de contaminação das amostras analisadas.

Segundo o estudo realizado por Chilaka et al., (2017), houve uma maior concentração de ZEA nas amostras de cerveja, chegando a ser até 30 vezes superior à média ($25 \mu\text{g.L}^{-1}$) e a concentração máxima encontrada ($31 \mu\text{g.L}^{-1}$). A justificativa encontrada para a alta concentração da micotoxina, foi a utilização de sorgo como cereal adjunto no processo de fermentação, que é suscetível a contaminação de fungos toxigênicos da espécie *Fusarium*, fungo produtor das micotoxinas ZEA e dos tricotecenos, em especial os do grupo A e B.

Em relação a micotoxina NIV, infelizmente não existe regulação vigente delimitando o LMT dessa micotoxina na matéria-prima, muito menos no produto fermentado final. Ao longo desse estudo, 35,5% das amostras apresentaram resultados positivos para a contaminação dessa micotoxina, a qual os níveis de contaminação encontrados tiveram média de $1,03 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração máxima encontrada nas amostras foi de $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. A ocorrência de NIV foi constatada em todos os grupos, exceto no grupo 4 que utiliza carboidratos vegetais juntamente a cevada. A ocorrência de NIV em cerveja não foi detectada em nenhum estudo de ocorrência, portanto não há dados para comparação na literatura (BERTUZZI et al., 2011; RODRIGUEZ-CARRASCO et al., 2015; RUBERT et al., 2013).

A justificativa para o aparecimento de NIV nas amostras pode ser a utilização de matéria-prima contaminada, como é reportado no estudo de Schöneberg et al., (2016) reportou uma incidência dessa micotoxina em 19% das amostras de cevada analisadas com média de contaminação de $19,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e concentração máxima de $435 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Bolechova et al., (2014) reportou a incidência de NIV em 35% das amostras de cevada analisadas, dentre essas amostras a média de contaminação foi de $93,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e a concentração máxima foi de $123,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Além de ser encontrada na cevada como uma micotoxina proveniente das espécies fúngicas toxigênicas

Fusarium que são colonizadoras no campo, há outras matrizes alimentares que também podem estar contaminadas por essa micotoxina.

Outras fontes de NIV são os cereais não-maltados que segundo estudos realizados por Schöneberg et al., (2018) a presença dessa micotoxina em aveia foi confirmada em 39% das amostras, e a concentração máxima encontrada foi de 1,65 mg.kg⁻¹, já a média das amostras contaminadas foram de 121 µg.kg⁻¹. De acordo com o estudo realizado por Kuzdralinski et al., (2013), foram encontradas concentrações de NIV em 59% das amostras de aveia analisadas e a média de contaminação foi de 54 µg.kg⁻¹ com a maior concentração relatada sendo de 1,03 mg.kg⁻¹. A confirmação da presença dessa toxina em amostras de milho foi reportada por Hove et al., (2016) que apontou uma contaminação em 3% das amostras analisadas, com média de 175 µg.kg⁻¹ e concentração máxima encontrada de 530 µg.kg⁻¹.

Outro estudo foi realizado na região sul do Brasil por Oliveira et al., (2016) a respeito da contaminação de micotoxinas em milho, o qual indicou a contaminação de NIV em 76% das amostras, além disso a concentração máxima encontrada de NIV nos grãos foi de 3,65 mg.kg⁻¹ com média de contaminação de 256,2 µg.kg⁻¹. O mais preocupante do estudo de Oliveira et al., (2016) é a alta porcentagem e concentração de contaminação dessa micotoxina em matérias-primas que poderiam ser utilizados para consumo e em outras áreas, como por exemplo, cereais adjuntos do processo de fabricação de cerveja brasileira, o que poderia ser uma fonte de contaminação por micotoxinas nas cervejas brasileiras.

A concentração encontrada da micotoxina NIV é menor no produto final do que quando comparado aos estudos de ocorrência na matéria-prima. Isso se deve a uma redução da micotoxina por processos de descontaminação da levedura ao longo do processo de fermentação, que diminui a concentração dessa micotoxina, assim como foi reportado no estudo de Boeira et al., (2015) que relatou uma significativa diminuição da micotoxina em até 56% no produto fermentado final.

Assim como a micotoxina NIV, a Toxina T-2 é altamente toxigênica, porém é considerada a mais perigosa das micotoxinas e seu aparecimento em matrizes alimentares são sempre preocupantes uma vez que são um fator de risco a saúde pública devido a possuírem diversos efeitos tóxico aos seres vivos (UENO,1980). A presença de Toxina T-2 foi confirmada em 48,4% das amostras analisadas, com média de contaminação de 15,4 µg.L⁻¹ e a concentração máxima encontrada de 23,6 µg.L⁻¹. A presença dessa toxina está ausente apenas no grupo 1, e aparece em

menores concentrações no grupo 4, porém no grupo 2 e 3 que utilizam cereais não-maltados, a concentração dessa toxina é alta.

Segundo estudos, essa micotoxina tem sido reportada em cervejas, como está descrito no estudo realizado por Rodriguez-Carrasco et al., (2015), a qual relata o aparecimento dessa micotoxina em 9% das amostras analisadas, com média de contaminação estimada em $2,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração máxima encontrada dessa micotoxina em amostras foi de $38,2 \mu\text{g.L}^{-1}$. Rubert et al., (2013) em seu estudo sobre a ocorrência de micotoxinas em cerveja, relata a contaminação de 6% das amostras analisadas com contaminação da Toxina T-2 e a concentração máxima encontrada nessas amostras foi de $12,1 \mu\text{g.L}^{-1}$.

De acordo com esse estudo, a maior probabilidade da Toxina T-2 ser encontrada nas amostras é devido a utilização de cereais não-maltados contaminados, uma vez que segundo Schöneberg et al., (2016) em amostras de aveia, houve a contaminação de 9% das amostras analisadas, com média de contaminação de $59,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$, porém o fator preocupante é a concentração máxima encontrada em uma das amostras que chegou a ser próxima de $1,1 \text{mg.kg}^{-1}$, o que torna extremamente preocupante o consumo ou utilização de um cereal com esse nível de contaminação para a saúde pública. Kuzdralski et al. (2013), em estudo sobre a ocorrência de micotoxinas na aveia constatou a contaminação da Toxina T-2 em 42% das amostras analisadas, com média de contaminação de $104 \mu\text{g.kg}^{-1}$, já a contaminação máxima encontrada em amostras foi de $311 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

A utilização de matérias-primas contaminadas pode ser uma problemática para a produção de cervejas, afinal há a probabilidade do produto fermentado final permanecer com parte da contaminação das matérias-primas, uma vez que segundo estudo realizado por Inoue et al (2013), provou-se que DON juntamente com a Toxina T-2 estavam entre as micotoxinas mais estáveis testadas e que permaneciam com 35-61% de suas concentrações iniciais provenientes das matérias-primas intactas no produto final, mesmo após as etapas de descontaminação do processo cervejeiro, transferindo-se ao produto final, a cerveja.

Portanto, mesmo ao final do processo de fermentação não há como evitar a presença de micotoxinas no produto final, o que acontece é a redução do teor de micotoxinas, assim apenas uma regulamentação mais rígida poderia impedir maiores concentrações de micotoxinas no produto final, pois a Toxina T-2 e DON são as toxinas mais resistentes ao processo cervejeiro, o que pode ocasionar uma

contaminação com maior possibilidade de ocorrência no produto final porque essas micotoxinas migram da matéria-prima por transferência para o produto final (INOUE et al., 2013).

A presença de DON foi confirmada em 61,3% das amostras analisadas e a média de contaminação das amostras contaminadas foram de 19,26 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com concentração máxima encontrada de 52,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A maior concentração dessa micotoxina foi reportada nas amostras do grupo 1, pois utilizam maior quantidade de cevada maltada para a fabricação da cerveja.

A alta incidência de DON em cervejas poderia ser explicada pela qualidade da matéria-prima utilizada para a fabricação de cerveja, pois a micotoxina DON é principalmente encontrada em cevada, como está de acordo com o estudo de ocorrência de Schöneberg et al., (2016) a ocorrência dessa micotoxina foi verificada em 64% das amostras de cevada analisadas, o que indica uma alta ocorrência dessa micotoxina nesse tipo de matriz, e a média de contaminação das amostras foram de 170 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, já a concentração máxima encontrada foi de 4,86 mg.kg^{-1} . Malachova et al., (2010) reportou a ocorrência dessa micotoxina em 83% dos grãos de cevada analisadas, a qual verificou que a média de contaminação dos grãos foi de 28% e a concentração máxima encontrada foi de 180 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Juan et al., (2017) analisou grãos de cevada e constatou uma baixa contaminação em 23% das amostras contaminadas com DON, ao qual a média de contaminação foi de 0,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e a concentração máxima encontrada foi de 2,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Nielsen et al., (2014) encontrou altas concentrações da micotoxina com média de contaminação de 107,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e a concentração máxima encontrada de 3,6 mg.kg^{-1} .

Em relação aos cereais maltados, a presença de DON pode ser confirmada em matrizes como aveia, milho e trigo. Segundo o estudo de ocorrência realizado por Kuzdralisnski et al., (2013), foram encontradas concentrações de DON em 90% das amostras de aveia analisadas e a média de contaminação foi de 660 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ com a maior concentração relatada sendo de 2,15 mg.kg^{-1} . A ocorrência de DON pode ser confirmada em amostras de milho, pois de acordo com o estudo realizado por Hove et al., (2016) foi apontado uma contaminação em 24% das amostras analisadas, com média de 165 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e concentração máxima encontrada de 492 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. A ocorrência de DON também foi confirmada em amostras de grãos de milho da região sul do Brasil por Oliveira et al., (2016) que averiguou a contaminação a contaminação em 48% das amostras analisadas, com concentração máxima de 1 mg.kg^{-1} e média de

contaminação de $151 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Segundo o estudo realizado por Stanciu et al., (2016) sobre a ocorrência de micotoxinas em amostras de trigo, 26% das amostras apresentaram contaminação por DON, sendo que a média de contaminação foi de $193 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e a concentração máxima encontrada nas amostras foi de $1,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Outros estudos em amostras de cerveja como o realizado por Chilaka et al., (2017) apontam uma incidência de contaminação de 61% das amostras por essa micotoxina, a concentração máxima encontrada de micotoxina em amostras foi de $255 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a média de contaminação foi de $95,6 \mu\text{g.L}^{-1}$. Bauer et al., (2016) em estudo sobre a ocorrência de micotoxinas em cerveja, verificou que 75% das amostras estavam contaminadas com DON, e a média de contaminação das amostras analisadas foram de $2,2 \mu\text{g.L}^{-1}$, sem que a maior concentração dessa micotoxina nas amostras foi de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. Piacentini et al., (2015), verificou a contaminação de DON em amostras de cervejas brasileiras, e o seu estudo revelou-se preocupante pois 100% das amostras estavam contaminadas e além disso a média de contaminação da micotoxina nas amostras foram de $177 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração máxima encontrada foi de $501 \mu\text{g.L}^{-1}$, a qual essa concentração está muito próxima do LMT para micotoxinas em cevada, matéria-prima utilizada no processo. Estes dados significam que mesmo após o processo de fermentação, a redução não foi o suficiente para diminuir a concentração dessa micotoxina e conseqüentemente houve a transferência de micotoxinas da matéria-prima para a cerveja e ainda, que a contaminação pode ser muito acima que o LMT (INOUE et al., 2013).

A presença de ADONS em matrizes alimentares geralmente é menor em comparação ao seu precursor DON, afinal essa micotoxina é produto de derivados de uma acetilação da molécula de DON, formando o 3-ADON e o 15-ADON (ALEXANDER et al., 2011). Geralmente essas micotoxinas são analisadas juntas, pois tanto o 3-ADON quanto o 15-ADON são isômeros moleculares, o que dificulta a separação desses analitos, por esse motivo são quantificados juntos em grande parte dos detectores utilizados.

Ao longo desse estudo constatou-se que entre as amostras analisadas, 6,4% apresentaram contaminação por ADONS e a média de contaminação foi de $1,03 \mu\text{g.L}^{-1}$, e concentração máxima encontrada de $3,14 \mu\text{g.L}^{-1}$. A presença dessas micotoxinas podem ser confirmadas em estudos de ocorrência como o realizado por Chilaka et al., (2017) que analisaram uma ocorrência de contaminação de 3% das amostras contaminadas por 15-ADON e 4% contaminadas por 3-ADON, a concentração

máxima encontrada de micotoxina nas amostras foram de 36 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 37 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente, com média de contaminação foi de 29,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 29,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

A principal fonte de contaminação dessas micotoxinas para a cerveja é através da cevada, pois estudos realizados por Juan et al., (2017) confirmaram a presença de ADONS em 6% das amostras analisadas, com média de contaminação de 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e a concentração máxima encontrada nas amostras foi de 7,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. De acordo com o estudo de ocorrência realizado por Malachova et al., (2010), apenas 1% das amostras apresentava contaminação por ADONS, a qual a concentração máxima encontrada foi de 46 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Além da cevada, o milho que pode ser utilizado como cereal maltado durante o processo de fermentação foi analisado no estudo de ocorrência realizado por Hove et al., (2016) e foi constatado a contaminação em 4% das amostras analisadas por ADONS, com concentração máxima encontrada nas amostras de 105 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e com média de contaminação de 13 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

A presença de ADONS nessas matérias-primas poderiam explicar a ocorrência de ADONS nas amostras, pois essa micotoxina foi detectada mais em cervejas do tipo puro malte que há maior adição de cevada, porém também foi detectada em cervejas que utilizavam uma mistura de ingredientes (grupo 3), que poderia ser ocasionada pela adição de cevada ou de cereais maltados com contaminação.

A presença de aflatoxinas foi analisada nas amostras, e constatou-se que 93,3% das amostras estavam contaminadas com AFB₁, 46,7% das amostras apresentaram contaminação com AFB₂ e 70% das amostras estavam contaminadas com AFG₂. A média de ocorrência foi de 5,17 ng.L^{-1} para AFB₁, 0,19 ng.L^{-1} para AFB₂ e 1,35 para AFG₂, já a concentração máxima encontrada foi de 9,2 ng.L^{-1} , 0,43 ng.L^{-1} e 1,6 ng.L^{-1} , respectivamente para cada micotoxina. A contaminação encontrada nas amostras foi extremamente baixa, o que indica uma alta sensibilidade do método analítico e pode explicar a alta ocorrência nas amostras.

Segundo estudo realizado por Gonzalez-Pereyra et al., (2011) foi encontrada uma contaminação em 18% das amostras contaminadas com média de contaminação de 19-4,07 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁ nas amostras. Para o autor, os fungos da espécie *Aspergillus* podem ter infectado cevada antes ou depois da colheita, mesmo durante o processo de maltagem, colonizando o substrato e seus subprodutos e produzindo AFB₁ durante o transporte e armazenamento de grãos de cerveja, o que ocasiona em uma possível contaminação da amostra.

De acordo com Pietri et al., (2010) em estudo sobre a ocorrência de AFB₁ em amostras de cevada e transferência para a cerveja, encontrou uma concentração de 0,2-14,85 µg.kg⁻¹ em amostras de cevada. Em mesmo estudo, Pietri et al., (2010), avaliou a migração dessa micotoxina da matéria-prima para o produto final e constatou que apenas 14,3% da concentração total migra da etapa de trituração para a fase líquida da amostra, o que é explicado pela baixa solubilidade dessa toxina em água, além disso há a diluição dessa micotoxina ao longo do processo cervejeiro, portanto é mantida apenas 5% da contaminação inicial devido as etapas de diluição para a produção de cervejas do tipo pilsen.

Acredita-se que a maior possibilidade de contaminação por aflatoxinas na cerveja seja devido a adição de malte a base de cereais não-maltados ou mesmo a adição de cereais contaminados (MATUMBA et al., 2014). No estudo realizado por Manizan et al., (2017) foi observada a contaminação em 57% das amostras de arroz por aflatoxinas e em 97% das amostras de milho com contaminação de aflatoxinas. A média de contaminação nas amostras de arroz foi de 2,5 µg.kg⁻¹ para AFB₁, 1,9 µg.kg⁻¹ para AFG₁ e 3,6 µg.kg⁻¹ para as aflas totais (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), já a concentração máxima foi de 14 µg.kg⁻¹ para AFB₁, 17 µg.kg⁻¹ para AFG₁ e 33 µg.kg⁻¹ para as aflas totais. Já nas amostras de milho, a contaminação foi de 8,2 µg.kg⁻¹ para AFB₁, 7,3 µg.kg⁻¹ para AFG₁ e 14 µg.kg⁻¹ para as aflas totais (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), já a concentração máxima foi de 80 µg.kg⁻¹ para AFB₁, 84 µg.kg⁻¹ para AFG₁ e 173 µg.kg⁻¹ para as aflas totais. Oliveira et al., (2016) analisando amostras de milho do sul do Brasil verificou uma contaminação em 26% das amostras, com contaminação máxima de 49,9 µg.kg⁻¹ para as aflas totais e média de contaminação de 8,3 µg.kg⁻¹.

Piacentini et al. (2017) em estudo sobre a ocorrência da contaminação de cervejas brasileiras relata que a adição de outros cereais no processo de fermentação como milho, podem ter vantagens econômicas como redução dos custos de processo e aceleração do tempo de fermentação. Porém, possui desvantagens devido a utilização de matéria-prima de baixa qualidade, o que pode resultar na contaminação de micotoxinas na cerveja por outras fontes de matriz além da cevada (MATUMBA et al., 2014; PIACENTINI, et al., 2017).

A principal hipótese para a ocorrência da contaminação de aflatoxinas na cerveja pode ser a utilização de cereais maltados, tais como o milho e o arroz, que possuam contaminação e através da transferência do malte para a cerveja, ocorra a

contaminação por micotoxinas no produto fermentado final, a cerveja. Essa hipótese pode ser observada no trabalho realizado por Matumba et al., (2014) sobre a ocorrência de micotoxinas em malte a base de milho, a qual evidenciou 88% das amostras contaminadas por aflatoxinas, sendo estas com média de $26 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁ e $64 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas totais (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), já a concentração máxima encontrada nas amostras de mosto foi de $36 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁ e $90 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflas totais. A justificativa para a contaminação segundo o autor seria a utilização de milho durante o processo de fermentação, ocasionando concentrações altas de aflatoxinas mesmo após o processo cervejeiro.

Analisando os estudos de ocorrência, pode-se perceber que muitos grãos estão com uma contaminação de micotoxinas acima do LMT permitido, o que justifica uma possível ocorrência em boa parte das amostras de cerveja, a qual algumas amostras podem apresentar níveis elevados de contaminação. Devido a esses altos níveis de contaminação, a redução de micotoxinas presentes na matéria-prima pode estar comprometida, afinal como é descrito no estudo de Nathanail et al., (2016) apenas parte das micotoxinas podem ser reduzidas por processo de descontaminação da levedura, contudo a diminuição de 9-34% da concentração de micotoxinas pode não ser suficiente para garantir o consumo seguro da bebida, pois a contaminação de micotoxinas pode ocorrer em vários estágios do processo cervejeiro e pode ser transmitida do malte para a cerveja como uma consequência de sua estabilidade térmica e relativa solubilidade em água (INOUE et al., 2013; KOSTELANSKA et al., 2011).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CERVEJAS E CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

A caracterização físico-química e bioquímica foi realizada nas amostras de cerveja para avaliar se há relação entre a concentração de micotoxinas e as propriedades físico-químicas e bioquímicas das amostras. Por esse motivo, os parâmetros de pH, extrato seco, coloração, ° Brix, turbidez, acidez volátil, proteínas, fenóis, açúcares (reduzidos, não-reduzidos e totais), glutatona e peroxidase foram avaliados.

Como está no Apêndice 1, 2, 3 e 4 encontram-se as tabelas com os parâmetros físico-químicos e bioquímicos para cada um dos grupos. Todos os dados foram analisados quanto a Análise de Componentes Principais (PCA) com o objetivo de

correlacionar as variáveis que são diretamente ou inversamente proporcionais. Antes foi verificada a relação entre os autovalores gerados que detalha o poder de explicação dos dois primeiros eixos em relação a correlação entre as variáveis. Após isso, foi construído o gráfico de PCA que relaciona as variáveis entre si pela proximidade ou quando está em um ângulo de 90° relacionada inversamente entre si. Para auxiliar na interpretação do gráfico, a tabela de correlação dos dados foi apresentada para verificar o grau de significância das correlações considerando p significativo de 10%. Entre as correlações geradas pela PCA, os valores de 0,6 foram considerados com baixas correlações, os valores de 0,7 foram considerados com correlações moderadas entre as variáveis e os valores maiores que 0,8 foram considerados como uma boa correlação entre as variáveis.

Os dados de caracterização físico-química, bioquímica e determinação de micotoxinas (Apêndice 5) não apresentaram uma distribuição normal, gerando a necessidade de tratamento matemáticos dos dados para amenizar o efeito de unidades das variáveis através do Escore Padronizado ($[\text{Escore bruto} - \text{Média}] / \text{Desvio Padrão}$). As tabelas de correlação foram geradas a partir dos dados tratados para o Grupo 1 das cervejas do tipo puro malte (PM) (Eixo 1 explica 39% e Eixo 2 explica 30%), o Grupo 2 de cervejas que utilizava cereais não-maltados (CN-M) (Eixo 1 explica 23% e Eixo 2 explica 16%), o Grupo 3 que utilizava tanto cereais não-maltados assim como carboidratos vegetais (CN-M + CV) (Eixo 1 explica 44% e Eixo 2 explica 27%) e o Grupo 4 que utiliza carboidratos vegetais (CV) (Eixo 1 explica 44% e Eixo 2 explica 27%).

Figura 7: Gráfico da PCA para amostras de cerveja PM.

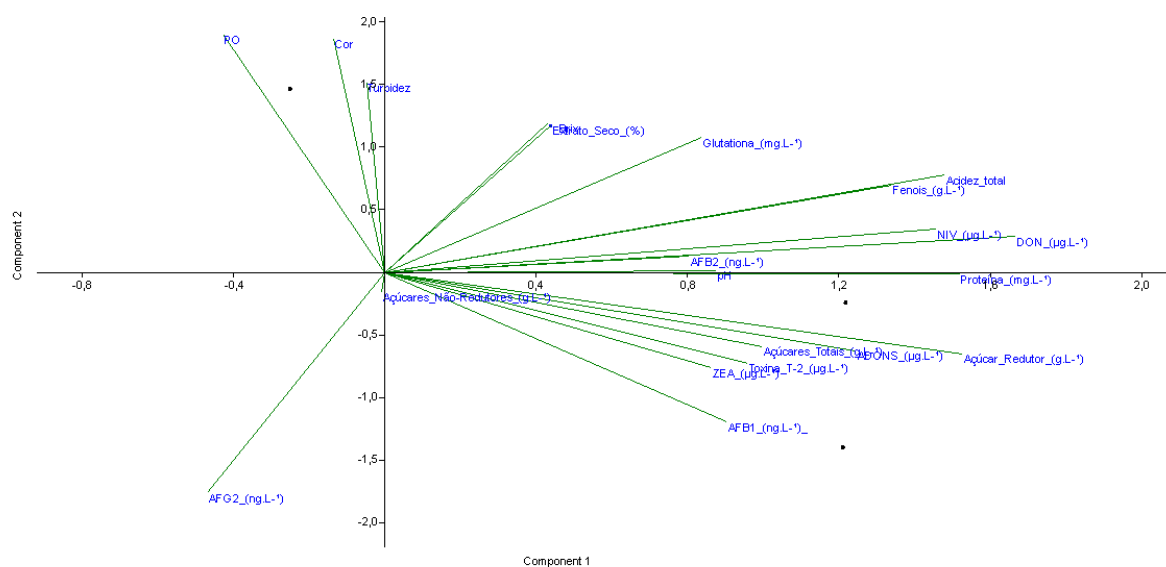


Figura 8: Gráfico da PCA para amostras de cerveja com C N-M.

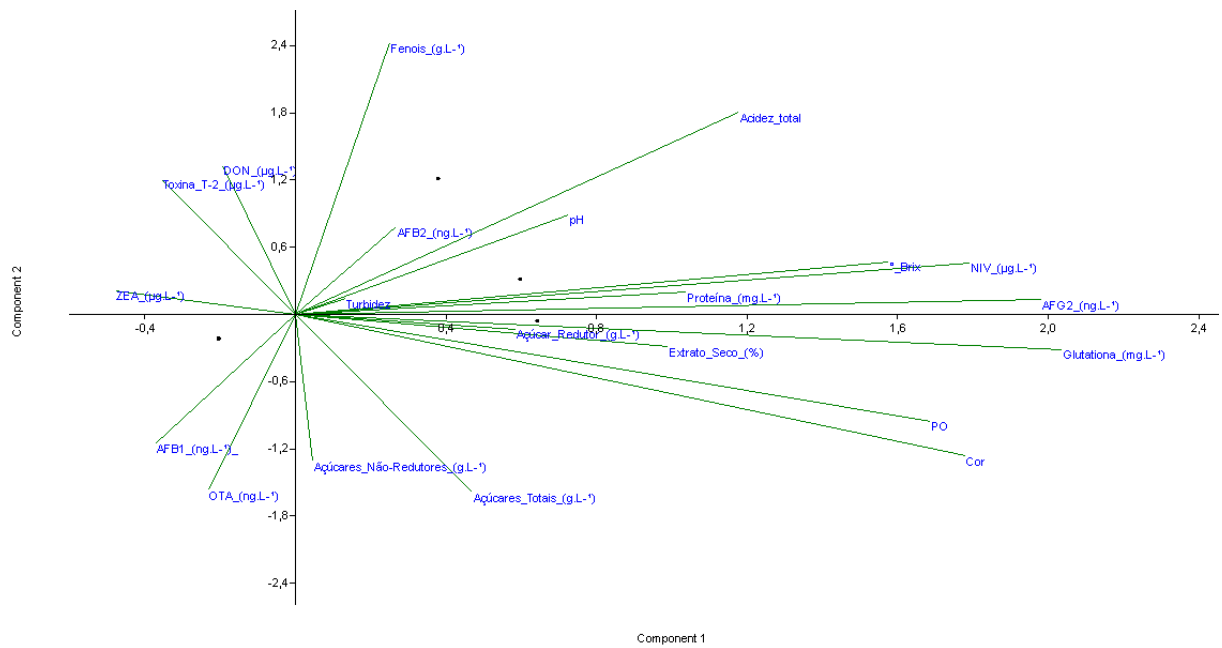


Figura 9: Gráfico da PCA para amostras de cerveja com cereais C N-M + CV.

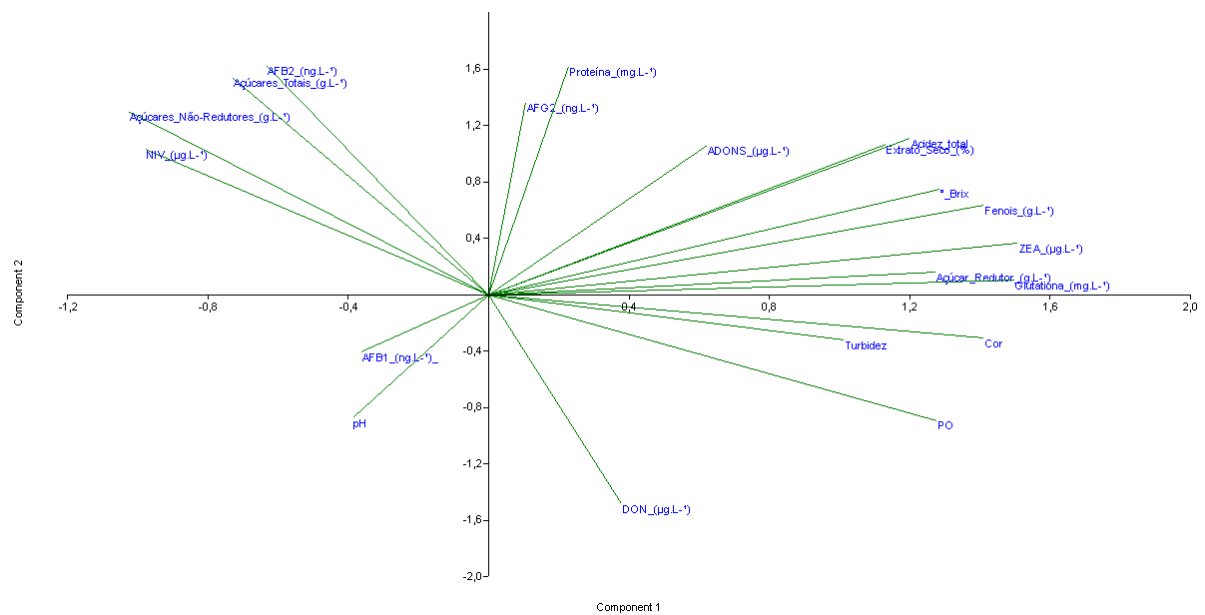
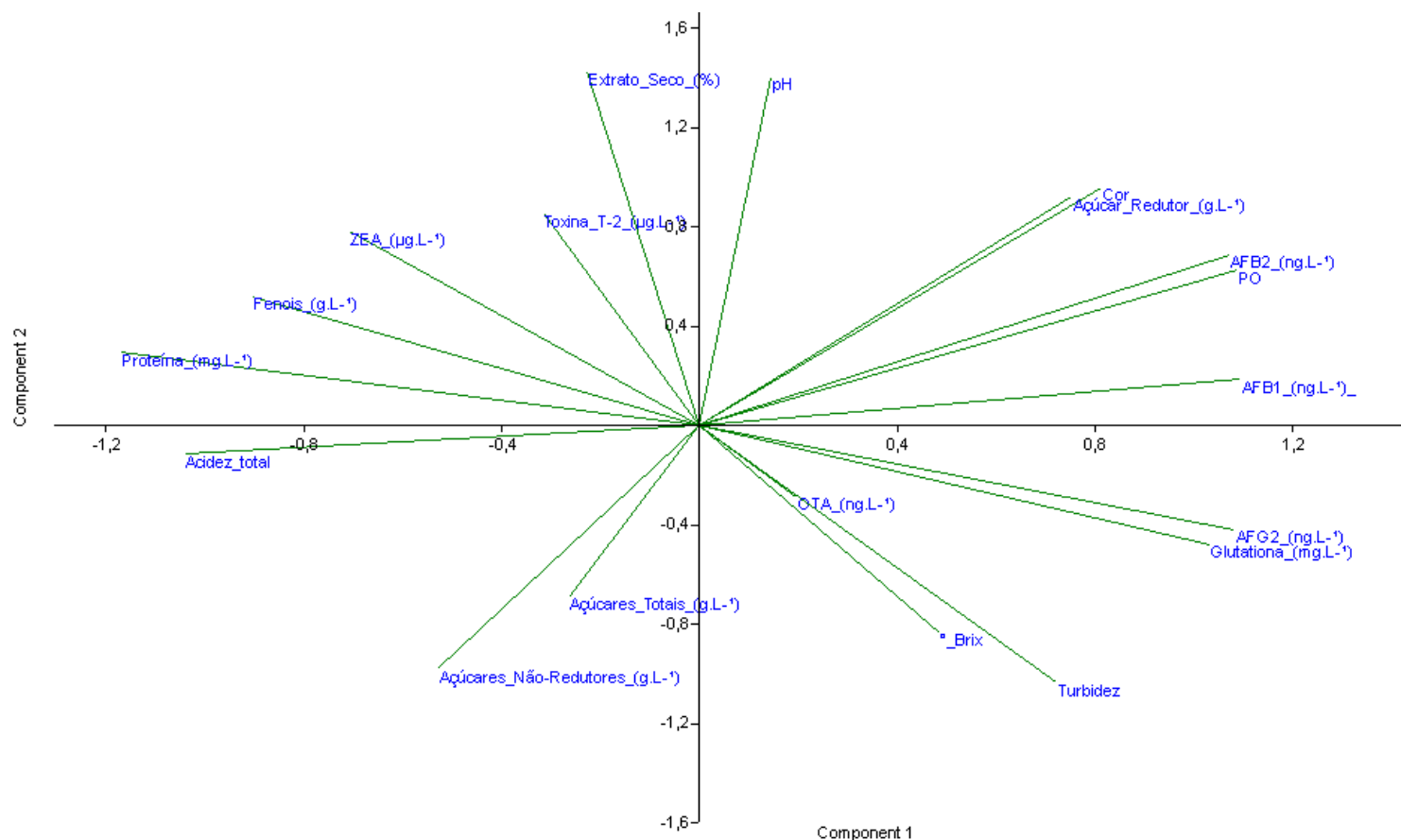


Figura 10: Gráfico da PCA para amostras de cerveja com CV.

As correlações geradas entre as variáveis em cada grupo encontram-se nos Apêndice 6, 7, 8 e 9. As Figuras 7, 8, 9 e 10 encontram-se os gráficos de componentes principais para cada um dos grupos de cerveja. Portanto a correlação entre as variáveis foi classificada em baixa (C) $0,6 < p < 0,7$, média (B) $0,7 < p < 0,8$ ou alta (A) $p > 0,8$, podendo ter correlação positiva (+) ou negativa (-) como está apresentada na Tabela 14.

Tabela 19: Tabela de correlações codificadas.

PM	CN-M	CN-M + CV	CV
(-A) DON e AFB ₂	X	(+C) DON e NIV (+A) DON e Toxina T-2 (+B) DON e Proteína (+A) DON e Açúcar Redutor (+A) DON e Acidez Total (+A) DON e Fenóis	N.D.
(+A) ADONS e AFG ₂ (+A) ADONS e ° Brix (+A) ADONS e Extrato Seco	N.D.	N.D.	N.D.
(+A) NIV e AFB ₂ (+A) NIV e Açúcares Totais (+A) NIV e Açúcares Não-Redutores	(+C) NIV e AFG ₂ (+B) NIV e Cor (+B) NIV e Glutaciona	(+B) NIV e OTA (+A) NIV e Açúcar Redutor	N.D.

N.D.	X	(+B) Toxina T-2 e Açúcar Redutor (+B) Toxina T-2 e Acidez Total	(-A) Toxina T-2 e Turbidez (+A) Toxina T-2 e Extrato Seco (+A) Toxina T-2 e Fenóis
(+A) ZEA e ° Brix (+B) ZEA e Cor (+B) ZEA e Turbidez (+B) ZEA e Extrato Seco (+B) ZEA e Açúcar Redutor (+A) ZEA e Fenóis (+B) ZEA e Acidez Total (+A) ZEA e Glutaciona	(+B) ZEA e AFB ₁	(+B) ZEA e OTA (-C) ZEA e Cor	(-A) ZEA e OTA (-A) ZEA e AFG ₂ (-A) ZEA e ° Brix
N.D.	X	X	(+A) OTA e ° Brix (+A) OTA e Açúcares Totais
(+B) AFB ₁ e pH	X	(-B) AFB ₁ e Turbidez (-B) AFB ₁ e PO (+A) AFB ₁ e Açúcares Totais	(+A) AFB ₁ e AFB ₂ (+A) AFB ₁ e AFG ₂ (+A) AFB ₁ e Cor (-A) AFB ₁ e Proteína AFB ₁ e Açúcar Redutor (+A) AFB ₁ e PO (+B) AFB ₁ e Glutaciona
(-B) AFB ₂ e PO (+A) AFB ₂ e Açúcares Totais (+A) AFB ₂ e Açúcares Não-Redutores	X	X	(+A) AFB ₂ e Cor (-A) AFB ₂ e Proteína (+A) AFB ₂ e Açúcar Redutor (-A) AFB ₂ e Acidez Total AFB ₂ e PO
(+B) AFG ₂ e Extrato Seco	(+C) AFG ₂ e Cor (+C) AFG ₂ e ° Brix (+C) AFG ₂ e PO (+B) AFG ₂ e Glutaciona	(-A) AFG ₂ e Cor (-A) AFG ₂ e Turbidez (-B) AFG ₂ e Extrato Seco (-B) AFG ₂ e PO (-A) AFG ₂ e Glutaciona	(-A) AFG ₂ e Proteína (+A) AFG ₂ e Glutaciona
X	(-C) pH e Extrato Seco	(+B) pH e Fenóis	(+A) pH e Extrato Seco
(+A) Cor e Fenóis (+A) Cor e PO (+A) Cor e Glutaciona	(+A) Cor e PO (+A) Cor e Glutaciona	(+A) Cor e PO	(+A) Cor e Açúcar Redutor (+A) Cor e PO
(+A) ° Brix e Extrato Seco (+A) ° Brix e Açúcar Redutor	(+C) ° Brix e Extrato Seco (+C) ° Brix e Acidez Total	(+B) ° Brix e Acidez Total	X
X	X	(+B) Turbidez e PO	(-A) Turbidez e Extrato Seco (-B) Turbidez e Proteína (-A) Turbidez e Fenóis
(+A) Extrato Seco e Açúcar Redutor (+B) Extrato Seco e Acidez Total	X	X	X
(+B) Proteína e Acidez Total (+B) Proteína e Açúcares Totais	X	(+B) Proteína e Fenóis	(+A) Proteína e Fenóis (+A) Proteína e Acidez Total (-A) Proteína e PO (-A) Proteína e Glutaciona
X	X	X	(+A) Açúcar Redutor e PO
(+A) Fenóis e Acidez Total (+A) Fenóis e Glutaciona	(+B) Fenóis e Acidez Total	(+B) Fenóis e Acidez Total	(+A) Fenóis e Acidez Total
(+A) Acidez total e Glutaciona	X	X	X
(+A) PO e Glutaciona (-B) PO e Açúcares Não-	(+B) PO e Glutaciona	X	X

Redutores			
(+A) Açúcares Totais e Não-Redutores	(+A) Açúcares Totais e Não-Redutores	(+A) Açúcares Totais e Não-Redutores	(+A) Açúcares Totais e Não-Redutores

PM= Puro Malte, CN-M= Cereais não-maltados, CN-M + CV= Cereais não maltados + Carboidratos vegetais, CV= Carboidratos vegetais. A= Boa correlação, B= média correlação e C= baixa correlação. (+) = correlação positiva, (-) = correlação negativa. N.D.= Não Detectado e X= sem correlação significativa.

A relação obtida entre as micotoxinas e os parâmetros bioquímicos e físico-químicos serão discutidas de acordo com cada correlação gerada entre os diferentes grupos de cerveja, pois a utilização de diferentes matérias-primas pode influenciar nos parâmetros, portanto a discussão será feita tanto pelas correlações quanto pelos grupos das amostras já descritos.

A primeira correlação a ser discutida é a relação entre as micotoxinas DON com NIV (+C) e Toxina T-2 (+A) no Grupo 3, que pode ser justificado devido a utilização de matéria-prima contaminada por essas micotoxinas mutuamente. Isso pode ser ocasionado devido altos níveis de estresse causado nos fungos produtores dessas micotoxinas que contaminam a matéria-prima, o que pode gerar a contaminação fúngica de mais de um tipo de fungo filamentosos toxigênicos (*Fusarium Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* ou *Stachybotrys*) na mesma matéria-prima (BENNETT e KLICH, 2003; HE et al., 2010; LAUREN et al, 1991).

No Grupo 1, os tricotecenos apresentaram correlações com algumas aflatoxinas. A primeira correlação a ser debatida será entre DON e AFB₂ (-A), que pode ser explicada devido aos fungos produtores dessas toxinas serem de espécies diferentes, pois DON é produzido a partir de fungos do gênero *Fusarium* e AFLAS especialmente do gênero *Aspergillus* (BENNETT e KLICH, 2003; EATON e GROOPMAN, 2013; HE et al., 2010; LAUREN et al, 1991; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2011). Devido a correlação ter se apresentado negativa, acredita-se que houve competição entre o crescimento dos fungos produtores, o que gerou uma interferência na produção de ambas as micotoxinas.

No Grupo 1 também houve uma correlação entre ADONS e AFG₂ (+A) e NIV com AFB₂ (+A) e no Grupo 2 a correlação entre NIV com AFG₂ (+C) e ZEA com AFB₁ (+B), que pode ser explicado devido a um estresse causado entre os fungos produtores de cada micotoxina, que nesse caso houve um incremento na produção de toxinas como mecanismo de defesa gerado pela competição entre os gêneros *Fusarium* produtores de tricotecenos e *Aspergillus* produtores de aflas (BENNETT e

KLICH, 2003; EATON e GROOPMAN, 2013; HE et al., 2010; LAUREN et al, 1991; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2011).

No Grupo 3, a correlação entre NIV e OTA (+B) e ZEA com OTA (+B) pode ser explicada devido a utilização de matéria-prima que contenha contaminação mútua dessas micotoxinas, o que poderia indicar a utilização de uma maior quantidade de cereais não-maltados como fonte de contaminação em comum dessas micotoxinas (KUZDRALISNSKI et al., 2013; MANIZAN et al., 2017).

No Grupo 4, a correlação ZEA e AFG₂ (-A) e ZEA e OTA (-A) pode ser explicada devido ao fato dessas micotoxinas serem provenientes de matérias-primas diferentes, o que pode ser explicado pelo fato da ZEA ser predominante na cevada e a OTA e AFG₂ estar presente predominantemente nos carboidratos de origem vegetal, por isso é explicada a relação negativa entre as variáveis, além de como explicado anteriormente, diferentes cepas fúngicas toxigências que competem pelo crescimento e produção. Outro ponto que reforça essa hipótese é a correlação entre ZEA e °Brix (-A) e OTA e °Brix (+A), o que significa que o teor de ZEA é diminuído com o aumento de partículas solúveis provenientes dos carboidratos vegetais, o que faz diminuir a quantidade de cevada utilizada como matéria-prima para a cerveja e aumenta a quantidade utilizada de carboidratos de origem vegetal, o que explica a correlação da OTA e °Brix.

As correlações no Grupo 1 entre ZEA e cor (+B), e no Grupo 2 entre NIV e cor (+B) e AFG₂ (+C) pode ser explicada devido ao tipo de malte utilizado e a disponibilidade de açúcares e conteúdo amiláceo que contribui com a contaminação fúngica e consequente produção de micotoxinas, além favorecer reações de escurecimento como a reação de Maillard (DENK et al., 2000; WOFFENDEN et al., 2001).

No caso do Grupo 3, a correlação entre ZEA e cor (-C) e AFG₂ e cor (-A) pode ser explicada pelo fato do malte dar as características de cor e textura a bebida, e quando este é substituído por uma fração maior de cereais não-maltados e carboidratos, a cerveja adquire características de maior leveza e diminuição da cor, afinal no Brasil tem-se o hábito de substituir parte da cevada por cereais como milho ou arroz, pois essa troca é responsável por diminuir os custos da matéria prima e pela característica de leveza da cerveja brasileira (D'AVILA et al., 2012; VARNAM, 1996).

No Grupo 4, a correlação entre a AFB₁ e cor (+A) e AFB₂ com cor (+A) pode ser explicada devido a adição de um carboidrato de origem vegetal que, como por

exemplo xaropes de cereais, que segundo (HAZEL e PATEL, 2004) podem estar contaminados com micotoxinas além de favorecer a reação de Maillard. Essa hipótese é reforçada se analisarmos a correlação entre a cor e açúcar redutor (+A), assim como a AFB₁ e açúcar redutor (+A) e AFB₂ com açúcar redutor (+A), indicando e reforçando a hipótese de que a fonte de contaminação de micotoxinas pode ser devido a utilização de xaropes de cereais como fontes de açúcares fermentáveis.

A correlação entre micotoxinas como ZEA e fenóis (+A) e ZEA e acidez total (+B) no Grupo 1, DON e fenóis (+A) e DON e acidez total (+A) no Grupo 3 e a Toxina T-2 com fenóis (+A) no Grupo 4 pode ser explicado devido aos ácidos fenólicos serem descritos como agentes de defesa contra patógenos fúngicos em plantas, seja por interferência direta com o fungo ou pelo reforço de componentes estruturais de plantas que atuam como barreira mecânica, o que resulta em um incremento de sua produção em plantas que são atacadas por fungos, além disso pode atuar como mecanismo de defesa para a degradação de micotoxinas (BOUTIGNY et al., 2009; LATTANZIO et al., 2006; SIRANIDOU et al., 2002).

Outra hipótese para DON e a Toxina T-2 estarem correlacionados aos compostos fenólicos seria a adição de sorgo, afinal estes são ricos em compostos fenólicos, o que indica que adição desta matéria-prima aumenta o teor de compostos fenólicos, assim como a concentração de micotoxinas (US Grain Council, 2008). Portanto, devido ao aumento na produção de compostos fenólicos, há um proporcional aumento na acidez total, pois os compostos fenólicos na verdade são ácidos orgânicos, portanto uma maior produção de ácidos fenólicos contribui para uma maior acidez das amostras, como pode ser observado na tabela de correlação entre fenóis com a acidez total (+B).

A correlação entre DON e proteína (+B) pode ser explicada devido ao efeito tóxico da micotoxina atuar na síntese de proteínas da levedura, como é explicado por Cougo et al. (2015), que relatou uma alteração cinética nos perfis proteicos da levedura quando o mosto estava contaminado com NIV, porém DON pode ter o mesmo efeito tóxico e pode ter ocorrido uma queda na produção de proteínas pela levedura na tentativa de reverter o efeito tóxico da micotoxina.

No Grupo 1 os ADONS estão correlacionados com ° Brix (+A) e com o extrato seco (+A), assim como a ZEA se correlaciona com os ° Brix (+A), com o extrato seco (+B) e com a turbidez (+B) e a AFG₂ com o extrato seco e no Grupo 2 a AFG₂ se correlaciona com os ° Brix (+C). Essas correlações podem ser explicadas

primeiramente como parâmetros de qualidade da etapa de moagem, pois indica como a matéria-prima foi utilizada e pode ser explicado devido a granulometria da cevada, pois segundo Lewis e Young (1995) e Kunze, (2006) uma moagem mais eficiente não garante um processo de maior qualidade, pois durante a moagem as cascas também são moídas, o que dificulta a etapa de filtração e poderia estar comprometendo o processo devido a uma baixa filtração por excessiva etapa de moagem das cascas de cevada, o que ocasiona aumento na quantidade de extrato seco e dos ° Brix nas amostras e contribui para o aumento de micotoxinas, já que porções externas são descritas por conter maior probabilidade de contaminação por micotoxinas (CARVALHO et al., 2012; MALACHOVA et al., 2010).

Outro ponto preocupante da etapa de moagem é quando excede a granulometria, e isso aumentar a concentração de micotoxinas, como é explicado segundo Malachova et al., (2010), pois os resíduos das cascas servem como adsorventes e possuem propriedades de reter uma certa quantidade de micotoxinas, mas devido a vantagem de fornecer uma quantidade maior de açúcares solúveis para a levedura e aumentar sua eficiência de produção devido a menor superfície de contato, as partículas menores são hidrolisadas mais facilmente, em contrapartida aumenta o teor de micotoxinas devido a uma etapa de filtração inadequada.

No Grupo 3 há correlações entre a AFB₁ e turbidez (-B), AFG₂ e a turbidez (-A) e AFG₂ com extrato seco (-B), assim como no Grupo 4 a Toxina T-2 e a turbidez (-A). A hipótese para essas correlações pode ser explicada quando se considera um indício de que a micotoxina é proveniente de fontes fermentáveis solúveis, no caso dos carboidratos vegetais, afinal uma maior turbidez é sinal da utilização de uma maior proporção de cevada, porém com uma maior utilização de carboidratos vegetais, esses ficam solúveis na bebida diminuindo a turbidez da cerveja. No caso da correlação apontada foi entre a Toxina T-2 com extrato seco (+A), o que pode ocorrer é uma maior solubilização do carboidrato vegetal na bebida, quando esse é seco, resulta em um maior teor de matéria orgânica.

A correlação no Grupo 1 entre NIV e açúcares não-redutores (+A) e NIV com açúcares totais (+A) pode ser explicado segundo Boeira et al., (2016) que relataram modificações no perfil proteico da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como também maior aporte de substrato pela célula durante a fermentação em meio sintético YPD quando havia contaminação com NIV. Portanto, uma maior contaminação de NIV pode ter inibido a produção das enzimas responsáveis pela hidrólise dos açúcares,

aumentando o aporte de açúcares totais e não-redutores. O mesmo pode ser explicado na relação entre AFB₂ e açúcares não-redutores (+A) e AFB₂ com açúcares totais (+B), assim como no Grupo 3 entre a Toxina T-2 e os açúcares não-redutores (+A) e Toxina T-2 com açúcares totais (+B) assim como a AFB₁ com os açúcares totais (+A) e no Grupo 4 a correlação entre OTA e açúcares totais (+A), pois assim como NIV, as AFLAS, a OTA e a Toxina T-2 possuem acentuada toxicidade e pode causar danos a levedura.

A relação no Grupo 1 entre ZEA e açúcar redutor (+B) e no Grupo 3 entre DON e açúcar redutor (+A) e NIV com açúcar redutor (+A), pode ser explicada pela inibição do consumo, pois segundo Koshinsky et al. (1992), em estudo percebeu que a Toxina T-2 inibia o consumo na levedura devido a sua alta toxicidade, porém acredita-se que essa hipótese poderia ser válida para DON, como mostrada na correlação com os açúcares redutores. No caso do Grupo 1 (ZEA) pode ser influência da granulometria de moagem exagerada da cevada que aumenta o teor total de açúcares redutores disponíveis para a levedura.

No Grupo 1, a correlação entre AFB₁ e pH (+B) que pode ser explicada devido ao efeito do pH ser um fator dependente da proliferação de fungos, ainda mais se o meio tiver pH próximo entre 5 e 6, com elevadas concentrações de açúcar e alta pressão osmótica, o que torna o meio propício a produção de aflatoxinas (PEREIRA, 2002).

No Grupo 4, a AFB₁ e AFB₂ (+A) assim como a AFB₁ e AFG₂ (+A) encontram-se correlacionadas entre si, o que significa que as micotoxinas são provenientes da mesma fonte de contaminação e acredita-se que o fungo produtor dessas toxinas quando condicionado a situações de estresse aumenta a produção de ambas a partir da AFB₁ que é a precursora das demais.

No Grupo 4, a correlação entre as AFLAS com a proteína (-A) pode ser devido a uma inibição de proteínas pela adsorção de aflatoxinas na parede da levedura (SHETTY et al., 2007). Outra hipótese seria a utilização de carboidratos vegetais contaminados como xaropes de glicose que possuem alto teor de carboidratos e baixos valores de proteínas, afinal acredita-se que a maior fonte de proteínas é proveniente da maior utilização de cevada, então a substituição de parte da cevada por xarope de glicose pode elevar a concentração de aflatoxinas e diminuir o teor de proteínas na bebida.

Algumas micotoxinas apresentaram correlação com a glutatona e com a PO, entre elas no Grupo 1 ZEA e PO (+A), AFB₂ e PO (-B), no Grupo 2 NIV e glutatona (+B), AFG₂ e PO (+C) e AFG₂ e glutatona (+B), no Grupo 3 AFB₁ e PO (-B), AFG₂ e PO (-B) e AFG₂ e glutatona (-A) e no Grupo 4 AFB₁ e PO (+A), AFB₁ e glutatona (+B), AFB₂ e PO (+A), AFG₂ e glutatona (+A). Primeiramente a glutatona é um tripeptídeo linear constituído por três aminoácidos, ácido glutâmico, cisteína e glicina produzido pela levedura sob condições de estresse provocado pela ação de micotoxinas e atua como um mecanismo de defesa para diminuir a incidência de contaminantes, pois possui capacidades antioxidantes utilizadas contra efeitos tóxicos do oxigênio e outros compostos tóxicos, como micotoxinas (LIU et al. 1999; ROLLINI e MANZONI 2006; WANG, ZHANG e TAN 2010).

A correlação entre NIV com a glutatona pode ser explicada devido a glutatona atuar como um mecanismo de defesa da levedura quando está sob condições de estresse, o que ocasiona uma maior produção desse tripeptídeo para atuar como defesa para a degradação do fator estressante, como é descrito por Boeira et al. (2015) relatou que a levedura condicionada a situação de estresse celular pela micotoxina aumentou a produção de GSH, em consequência do aumento dessa produção, houve uma taxa de degradação da micotoxina de 56%.

Outra hipótese é o estresse causado por micotoxinas em grãos, como é relatado por Kluger et al. (2013) em estudo que encontrou metabólitos de degradação de DON no trigo, descobriu novos conjugados na planta, em especial um deles formado pela ligação de uma molécula de GSH com uma de DON. Acredita-se que esse seja um produto de degradação formado como um mecanismo de defesa da planta, aumentando a produção de GSH para detoxificar micotoxinas (KLUGER et al. 2013; LEAL et al. 1999).

Em relação a correlação entre as micotoxinas com a PO pode ser explicado pelo fato da PO assim como a glutatona ser um mecanismo de defesa da levedura quando é condicionada a situações de estresse, como ocorre quando há a presença de micotoxinas solúveis no meio, afinal segundo Kim et al. (2005) ocorre um incremento na produção de PO pela levedura para ocorrer a detoxificação de micotoxinas. Da mesma maneira que NIV e DON, outras micotoxinas como AFLAS e ZEA podem apresentar toxicidade elevada para a levedura e causar estresse, o que pode provocar em um incremento na produção de glutatona e PO como tentativa de detoxificação dessas toxinas.

Analisando as principais relações geradas no Grupo 1, podemos perceber que as correlações entre os tricotecenos e ZEA encontra-se altamente correlacionado com parâmetros físico-químicos tais como °Brix, extrato seco e açúcares totais e não-redutores. Esse fato indica a importância de controlar o processo de moagem das matérias-primas, especialmente a importância que as cascas possuem durante o processo cervejeiro pois atuam como um agente filtrante de impurezas e até mesmo micotoxinas.

No Grupo 2 acredita-se que a utilização de diferentes tipos de cereais não-maltados (trigo, aveia, milho, arroz, entre outros) dificultou a análise estatística desse grupo devido a ser heterogêneo entre si, afinal a utilização de diferentes cereais poderia influenciar na contaminação de micotoxinas assim como modificar os parâmetros físico-químicos e bioquímicos ao longo do processo cervejeiro.

Em relação ao Grupo 3 percebe-se uma alta correlação dos tricotecenos entre si, o que pode indicar que essas micotoxinas são provenientes de uma mesma fonte de contaminação, assim ocorreram correlações entre NIV e ZEA com OTA, o que indica que a correlação se deve a fontes de contaminação devido a utilização de matérias-primas contaminadas.

Durante a análise das correlações entre as micotoxinas com alguns dos parâmetros físicos percebeu-se que algumas micotoxinas apresentaram relação com maior quantidade de açúcares totais e redutores. Isso indica que a contaminação de algumas micotoxinas como Toxina T-2, NIV e DON são responsáveis pela ação inibitória das enzimas hidrolíticas responsáveis pela quebra dos açúcares, portanto ocorre uma quantidade de açúcares não-redutores e totais, podendo ser um indicativo de contaminação dessas micotoxinas.

No Grupo 4 observa-se que há duas situações distintas, onde a utilização de cevada contaminada influencia a concentração de ZEA, porém a maior adição de carboidratos de origem vegetal aumenta a concentração de AFLAS e OTA. Isso pode ser observado quando percebemos as correlações entre essas micotoxinas que são inversamente proporcionais e ao analisar os parâmetros físico-químicos com essas micotoxinas.

Em todos os grupos a correlação entre as AFLAS com os parâmetros bioquímicos (PO e glutatona) foram verificados, afinal essas micotoxinas possuem toxicidade para a levedura, o que pode ser considerado como um parâmetro para o controle das mesmas. A dificuldade de utilizar essas biomoléculas de defesa da

levedura como parâmetro é que essas são produzidas de acordo com a concentração das micotoxinas no meio, o que pode levar a uma maior produção dessas quando apenas estressa a levedura, ou mesmo em concentrações altas pode ocasionar danos na levedura e causar a inibição da produção dessas biomoléculas.

6. CONCLUSÕES

O método QuEChERS testado por este estudo e o de SEUS (2016-2020) para a extração de tricotecenos, OTA e ZEA foi testado e verificado como seguro através do cumprimento das figuras de mérito como exatidão por ensaios de recuperação (70-120%), por precisão por análises da amostra em dias diferentes (RSD < 20%), assim como baixos LOD e LOQ do método.

O método de PLL otimizado a partir de Garda-Buffon et al. (2004), e Bauer et al., (2016) com clorofórmio para a extração de aflatoxinas foi testado através das figuras de mérito e constatado como seguro devido a apresentar resultados dentro da faixa de exatidão por ensaios de recuperação (70-120%), por precisão nas amostras realizadas em triplicata (RSD < 20%), assim como baixos LOD e LOQ do método.

A ocorrência de micotoxinas nas amostras de cerveja constatou a grande variabilidade e níveis detectados nas amostras, mas em especial destacando a Toxina T-2 devido a sua alta toxicidade em 48% das amostras e DON em 63% das amostras.

Portanto, devido a contaminação das micotoxinas nas amostras acredita-se que a etapa de descontaminação pela levedura não é suficiente para isentar a bebida da presença de micotoxinas. Esse motivo se deve a utilização de matéria-prima contaminada, como a cevada que é fonte de contaminação de tricotecenos, os cereais não-maltados como milho, aveia, arroz e trigo que são fontes de diversas micotoxinas como OTA, ZEA, AFLAS e tricotecenos (aumentando sua concentração) e os carboidratos vegetais tais como sorgo, xaropes de cereais entre outros que podem estar contaminados e aumentam a concentração de micotoxinas na bebida.

As correlações apontaram que as amostras do Grupo 1 do tipo puro malte sofreram maior influência por processos físico-químicos como a moagem excessiva das cascas de cevada que levou a uma etapa de filtração ineficiente e pode ter aumentado a concentração de micotoxinas no produto final.

Em relação ao Grupo 2, as correlações tiveram valores intermediários e não foram mais efetivas para fornecer mais informações sobre esse grupo devido à variedade de cereais não-maltados utilizados (trigo, arroz, aveia, milho, entre outros) poderiam ser diferentes entre as amostras, o que poderia influenciar nos resultados

de contaminação das micotoxinas nas diferentes amostras assim como poderia gerar as variações entre os parâmetros físico-químicos e bioquímicos das amostras.

No Grupo 3, é possível perceber que as amostras foram influenciadas principalmente pela adição dos carboidratos vegetais do que pelos cereais não-maltados, pois apresenta correlações próximas com os açúcares redutores, não-redutores ou totais. Estes dados também podem indicar a influencia no consumo de açúcares pela levedura em função da toxicidade.

No Grupo 4, percebe-se uma diferença evidente entre as bebidas que utilizaram maior teor de carboidratos vegetais do que de cevada devido a contaminação de diferentes micotoxinas nas amostras. Outro fato evidente é a contaminação de AFLAS relacionados aos tipos de açúcares.

Em geral, as AFLAS foram as micotoxinas que mostraram em todos os grupos maior correlação com os parâmetros bioquímicos, portanto influenciam com maior toxicidade na fermentação da levedura, causando o estresse e a liberação de compostos de detoxificação como mecanismo de defesa.

Devido ao fato de serem encontradas diversas micotoxinas nas amostras de cerveja (mesmo que algumas em baixa concentração), há a necessidade de haver uma fiscalização mais rigorosa sobre o produto, estendendo o LMT não somente para as matérias-primas, mas também para o produto final pois a levedura durante o processo de fermentação não garante a remoção das micotoxinas no produto final, como foi constatado nesse estudo de ocorrência que existem micotoxinas mesmo após todas as etapas de produção da bebida.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS:

Os resultados obtidos neste estudo possibilitaram a avaliação da ocorrência de micotoxinas em amostras de cerveja, tal como indicar características do processo cervejeiro poderiam influenciar como indicativos para a contaminação. A partir das considerações já apresentadas sugere-se para trabalhos futuros:

- Realizar estudos de recuperação das aflatoxinas em cerveja, através da utilização de métodos com solventes ambientalmente corretos;
- Realizar um ensaio *in vitro* de fermentação alcohólica avaliando o efeito das micotoxinas em relação aos parâmetros químicos e bioquímicos ao longo do tempo;
- Verificar o efeito das micotoxinas presentes no malte durante o processo de mosturação e avaliar se diferentes tipos de granulometria no processo de moagem afetam a concentração de micotoxinas;
- Analisar o perfil de açúcares, alcóois e aminoácidos procurando relacionar com a presença de micotoxinas;
- Avaliar as moléculas bioquímicas (PO e glutatona) assim como os compostos fenólicos afim de verificar se as micotoxinas (e quais micotoxinas) alteram a produção dessas moléculas ao longo do processo cervejeiro;
- Avaliar a associação de micotoxinas com as macromoléculas.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALEXANDER, N.J., PROCTOR, R.H., MCCORMICK, S.P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. **Toxin Reviews**, v. 28, p. 198-215, 2009.
- ALEXANDER, N. J., MCCORMICK, S. P., WAALWIJK, C., VAN DER LEE, T., & PROCTOR, R. H. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 485-495, 2011.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.
- AQUARONE, E. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, Vol. 5, pag 243, 1983.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos**. 1.ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. 4V.
- ANTEP, H. M.; MERDIVAN, M. Development of new dispersive liquid–liquid micro extraction technique for the identification of zearalenone in beer. **Analytical Methods**, v. 4, n. 12, p. 4129-4134, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Food composition, additives, natural contaminants, In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. Washington: AOAC International, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of International**. 17th. Gaithersburg, v.2. 2000.
- BACA, E. The role of unmalted adjuncts in the creation of sensory characteristics of beer. **Proceedings of the School Fermentation Technology**, p. 113-126, 2001.
- BAUER, J.I.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. **Food Control**.v.63,p.135-139, 2016.
- BECCARI, G., CAPRONI, L., TINI, F., UHLIG, S., & COVARELLI, L. Presence of *Fusarium* Species and Other Toxigenic Fungi in Malting Barley and Multi-Mycotoxin Analysis by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 21, p. 4390-4399, 2016.
- BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 73, p. 270-275, 1990.
- BERSOT, L. S.; MAZIERO, M. T. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 89-99, 2010.
- BERTUZZI, T., RASTELLI, S., MULAZZI, A., DONADINI, G., & PIETRI, A. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 2059-2064, 2011.
- BOEIRA, C.Z.; SILVELLO, M.A.C.; REMEDI, R.D. Redução da contaminação de nivalenol durante fermentação alcoólica com aplicação de campos magnéticos. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Engenharia Bioquímica- FURG, 2015.
- BOLECHOVÁ, M.; BENEŠOVÁ, K., BĚLÁKOVÁ, S; ČÁSLAVSKÝ, J; POSPÍHALOVÁ, M; & MIKULÍKOVÁ, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **FoodControl**, v.47, p. 108-113, 2015.

BOORMAN, G. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A F344/N rats (gavage studies). Technical Report Series No. 358. **NIH publication**, v. 89, p. 2813, 1989.

BOUTIGNY, A.-L., RICHARD-FORGET, F., BARREAU, C. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium trichothecenes*. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 411–423, 2008.

BRASIL. Instrução normativa n.24 de 8 de Setembro de 2005. **Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.

BRASIL. Decreto-lei nº 6.871, de 4 de Junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 jun. 2009.

BRASIL. (2011b). ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, 22 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2014-01/diario-oficial---rdc--7.pdf>>. Acessado em: Dezembro de 2017.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BULLOCK, E.; ROBERTS, JOHN C.; UNDERWOOD, J. G. 808. Studies in mycological chemistry. Part XI. The structure of isosterigmatocystin and an amended structure for sterigmatocystin. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 4179-4183, 1962.

CANO-SANCHO, F.M. VALLE-ALGARRA, M. JIMÉNEZ, P. BURDASPAL, T.M. LEGARDA, A.J. RAMOS, V. SANCHIS, S. MARÍN. Presence of trichothecenes and co- occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). **Food Control**, v. 22, p. 490- 495, 2011.

CARVALHO, A. P. M. G. ; HACKBART, H. C. S. ; SOUZA, Michele Moraes de ; BADIALE-FURLONG, E. . Emprego de casca de arroz como adsorvente para execução de técnica de MSPD para determinar aflatoxinas em cebolas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, p. 630-637, 2012

CASSIANO, M. N. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CERVBRAIL. Associação Brasileira da Indústria Cervejeira. **Anuário de 2017**. Disponível em:<http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIOCB_2017_WEB.pdf>. Acessado em: Dezembro de 2017.

CHEN, L., WEN, F., LI, M., GUO, X., LI, S., ZHENG, N., & WANG, J. A simple aptamer-based fluorescent assay for the detection of Aflatoxin B1 in infant rice cereal. **Food chemistry**, v. 215, p. 377-382, 2017.

CHILAKA, C. A., DE BOEVRE, M., ATANDA, O. O., & DE SAEGER, S. Quantification of *Fusarium* Mycotoxins in Nigerian Traditional Beers and Spices using a Multi-mycotoxin LC-MS/MS Method. **Food Control**, 2017.

CISA. **Centro de Informações sobre Saúde e Álcool**. Disponível em: <http://www.cisa.org.br/artigo/155/ilevanta_mento-nacional-sobre-os-padroes.php>. Acessado em: Janeiro de 2018.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Joint FAO/WHO Food Standards programme; **Codex Committee on Contaminants in Foods**; First Session; Beijing, China, 2007.

COLE, R. J., & COX, R. H. (1981). Handbook of toxic fungal metabolites. **New York: Academic Press**. pp. 152-263.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora

da Unicamp, 456 p., 2006.

COMMISSION REGULATION (EC) No. 856/2005 of 6 June 2005. Official Journal of the European Union L 143: 3–5.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias-primas amiláceas visando a obtenção de etanol. 2010. 109 p.** 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL.

COUGO, C.; FONTES, M.; DUARTE, V. **Identificação de biomarcadores de exposição para Nivalenol durante fermentação alcoólica.** Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

CREPPY, E.E., LUGNIER, A.A.J., FASIOLO, F., HELLER, K., RÖSCHENTHALER, R., DIRHEIMER, G. In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. **Chem. Biol. Interact.** 24, 257–261, 1979.

D'AVILA, R. F.; LUVIELMO, M.; MENDONÇA, C. R. B.; JANTZEN, M. M. **Adjuncts used for beer production: Features and applications.** Estudos Tecnológicos em Engenharia, v. 8, n. 2, p. 60-68, 2012.

DENK, V., FELGENTRAEGER, H., FLAD, W., LENEOL, M., MICHEL, R., MIEDANER, H., ... & O'ROURKE, T. European brewery convention: manual of good practice, wort boiling and clarification. **Nuremberg: Fachverlag Hans Carl**, 176, 2000.

DONG, W., PESTKA, J.J. Persistent dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse following withdrawal of dietary vomitoxin (deoxynivalenol). **Fundam. Appl. Toxicol.** 20, 38–47, 1993.

EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. (Ed.). **The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance.** Elsevier, 2013.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analysis Committee. **Analytica – EBC.** London: Elsevier, 1963. Method 8.5. Revised Oct. 2005.

FAO, 2013. **Mycotoxins.** <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/en/>> Acessado em: Dezembro de 2017.

FACCHIN, I., PASQUINI, C. EXTRACAO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM SISTEMAS DE FLUXO. **QUIMICA NOVA**, v. 21, p. 1, 1998.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. **As Micotoxinas**, v. 7, p. 34-40, 2009.

FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reactores Biológicos, Fundamentos e Aplicações. 1. ed.** Lisboa: Editora Lidel, 2007.

FRENICH, A. G., ROMERO-GONZÁLEZ, R., GÓMEZ-PÉREZ, M. L., & VIDAL, J. L. M. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4349-4356, 2011.

FU, L. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 285-289, 2009.

GARDA-BUFFON, J. **Micotoxinas em Cerveja: Metodologia, Ocorrência e Influência no Processo Fermentativo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2002.

GARDA, J., MACEDO, R. M., BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciênc Tecnol Aliment**, v.

24, p. 657-63, 2004.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 3, p.198-20, 2011.

GONZÁLEZ-PEÑAS, E., LEACHE, C., DE CERAIN, A. L., & LIZARRAGA, E. Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine. **Food chemistry**, v. 97, n. 2, p. 349-354, 2006.

GONZALEZ-PEREYRA, M. L., ROSA, C. A. R., DALCERO, A. M., & CAVAGLIERI, L. R. Mycobiota and mycotoxins in malted barley and brewer's spent grain from Argentinean breweries. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 6, p. 649-655, 2011.

HARRIS, D.C. **Explorando a Química analítica**. LTC, 2011.

HAZEL, Clare M.; PATEL, Sue. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 51-59, 2004.

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

HOVE, M., DE BOEVRE, M., LACHAT, C., JACXSENS, L., NYANGA, L. K., & DE SAEGER, S. Occurrence and risk assessment of mycotoxins in subsistence farmed maize from Zimbabwe. **Food Control**, v. 69, p. 36-44, 2016.

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. World Health Organization, v. 56, p. 397-333, 1993.

International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, volume 82**. Lyon 2002. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82.pdf>>. Acessado em Fevereiro de 2018.

JESTOI, M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 1, p. 21-49, 2008.

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

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. **Toxins**. v.2, p. 461-493, 2010.

KIESSLING, K. H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry*, v.58, n. 2, p.327-338, 1986.

KIM, J. H., CAMPBELL, B. C., YU, J., MAHONEY, N., CHAN, K. L., MOLYNEUX, R. J., ... & CLEVELAND, T. E. "Examination of fungal stress response genes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model system: targeting genes affecting aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus* Link." **Applied microbiology and biotechnology** 67.6: 807-815, 2005.

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

- KLUGER, Bernhard et al. Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 15, p. 5031-5036, 2013.
- KHOSHINSKY, H.A, COSBY, R.H., KHACHATOURIANS, G, G. Effects of T-2 toxin on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Chemistry**, v.16, n.2, p. 275-286, 1992.
- KOSTELANSKA, M.; ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; FENCLOVA, M.; KOLLOS, A.; HAJLSLOVA, J. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC–TOF MS method. **Food Chemistry**, v.126, p.1870–1876, 2011.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of Fusarium toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241-264, 2007.
- KUMAR, VINOD; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905, 2008.
- KUNZE, W. **Tecnología para cerveceros y malteros** (1 ed.). Berlin: Westkreuz- Duckerei Ahrens KG, 2006.
- KUPSKI, L. **Degradação de Ocratoxina a: estudo de processo e toxicidade**. Tese de Doutorado, 2015.
- KUZDRALIŃSKI, A., SOLARSKA, E., & MAZURKIEWICZ, J. Mycotoxin content of organic and conventional oats from southeastern Poland. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 68-72, 2013.
- LAITILA, A. Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain. **Brewing microbiology**, p. 107-139, 2015.
- LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.
- LATTANZIO, V., LATTANZIO, V.M.T., CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry** 23-67, 2006.
- LATTANZIO, V.M.T; SOLFRIZZO, M.; POWERS, S.; VISCONTI, A. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 3253-3261, 2007.
- LAUREN, D. R., AGNEW, M. P., SMITH, W. A., and SAYER, S. T. A survey of the natural occurrence of Fusarium mycotoxins in cereals grown in New Zealand in 1986-1989. **Food Additives and Contaminants**, 8, 599-605, 1991.
- LEAL, Myriam et al. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. **Toxicology letters**, v. 109, n. 1, p. 1-10, 1999.
- LEHOTAY, S. J., KOK, A. D., HIEMSTRA, M., & BODEGRAVEN, P. V. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.
- LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing** (1 ed.). Norwich: Page Bros. 1995.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951.
- LIU, C.; HWANG, C.; LIAO, C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 17-23, 1999.
- MAGAN, N. & ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 131-139, 2007.

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

MALACHOVA, A., DZUMAN, Z., VEPRIKOVA, Z., VACLAVIKOVA, M., ZACHARIASOVA, M., & HAJLSLOVA, J. Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-glucoside, and Enniatins: The Major Mycotoxins Found in Cereal-Based Products on the Czech Market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12990-12997, 2011.

MANIZAN, A. L., OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M., PIRO-METAYER, I., CAMPBELL, K., KOFFI-NEVRY, R., ELLIOTT, C., ... & BRABET, C. Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. **Food Control**, 2017.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações, 2012.

MATUMBA, L., VAN POUCKE, C., BISWICK, T., MONJEREZI, M., MWATSETEZA, J., & DE SAEGER, S. A limited survey of mycotoxins in traditional maize based opaque beers in Malawi. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 253-256, 2014.

MEDINA, Á., JIMÉNEZ, M., GIMENO-ADELANTADO, J. V., VALLE-ALGARRA, F. M., & MATEO, R. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, n. 1-2, p. 7-13, 2005.

MILANEZ, T. V. **Tricotecenos em milho: otimização e avaliação de método analítico utilizando cromatografia a gás associada à espectrometria de massas e levantamento da incidência em milho e em produtos de milho no Estado de São Paulo**. Dissertação de mestrado, 2003.

MILLER, G.L. Use of Dynitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. v.31,p-426-428,1959.

MILLER J. D. Significance of grain mycotoxins for health and nutrition. *ACIAR Proc.* 36, 126-135, 1991.

MILJKOVIC, A., PFOHL-LESZKOWICZ, A., DOBROTA, M., & MANTLE, P. G. Comparative responses to mode of oral administration and dose of ochratoxin A or nephrotoxic extract of *Penicillium polonicum* in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, n. 4, p. 305-312, 2003.

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

NATHANAIL, A. V.; GIBSON, B.; HAN, L.; PELTONEN, K.; OLLILAINEN, V.; JESTOI, M.; LAITILA, A. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium* trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. **Food chemistry**, v.203, p.448-455, 2016.

NIDA'M, S., & AHMAD, R. Mycotoxins in food from Jordan: preliminary survey. **Food Control**, v. 21, n. 8, p. 1099-1103, 2010.

NIELSEN, L. K., COOK, D. J., EDWARDS, S. G., & RAY, R. V. The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. **International journal of food microbiology**, v. 179, p. 38-49, 2014.

ODHAV, B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n. 1, p. 55-61, 2002.

OJEDA CB, ROJAS FS. Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure: Recent Applications. **Chromatographia**, v. 74, 651- 679, 2011.

OLIVEIRA, S. G. **Sistema modelo para redução dos níveis de zearalenona por ação enzimática**. Dissertação de Mestrado, 2016.

OLIVEIRA, M. S., ROCHA, A., SULYOK, M., KRŠKA, R., & MALLMANN, C. A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 127-132, 2017.

OWENS, C. W. I.; BELCHER, R.V.; A Colorimetric micro-method for the Determination of Glutathione. **Biochemical Journal**, v. 94, p.705-711, 1965.

PASCARI, X.; RAMOS, A. J; MARÍN, S.; SANCHÍS, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 121-29, 2017.

PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, p. 290-296, 2011.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal feed science and technology**, v. 137, n. 3-4, p. 283-298, 2007.

PIACENTINI, K. C. **Fungos e micotoxinas em grãos de cevada (*Hordeum vulgare* L.) cervejeira, descontaminação pelo gás ozônio e segurança de cervejas artesanais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

PIACENTINI, K. C.; SAVI, G. D.; OLIVO, G.; & SCUSSEL, V. M. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. **Food Control**, v.50, p. 925-929, 2015.

PIACENTINI, K. C., ROCHA, L. O., FONTES, L. C., CARNIELLI, L., REIS, T. A., & CORRÊA, B. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food chemistry**, v. 218, p. 64-69, 2017.

PIETRI, A., BERTUZZI, T., AGOSTI, B., & DONADINI, G. Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 10, p. 1431-1439, 2010.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010.

PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A., & VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 11, p. 3564-3569, 1996.

PRANGE, A.; BIRZELE, B.; KRÄMER, J.; MEIER, A.; MODROW, H.; KÖHLER, P. Fusarium-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. **Food Control**, v. 16, p. 739-745, 2005.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: Um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. Handbook of Brewing. **Food Science and Technology**. 2.ed. USA: Editora Taylor and Francis Group, 2006.

PURI, K. D., & ZHONG, S. The 3ADON population of *Fusarium graminearu* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. **Phytopathology**, v. 100, p. 1007-1014, 2010.

RAZZAGHI-ABYANEH, M., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., CHANG, P. K. Mechanisms of Inhibition by

Antagonistic Plants and Microorganisms, **Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology**. Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.): USA, 2011.

REICHERT, B., DE KOK, A., PIZZUTTI, I. R., SCHOLTEN, J., CARDOSO, C. D., & SPANJER, M. Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in raw coffee, without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analysis. **Analytica chimica acta**, v. 1004, p. 40-50, 2018.

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

ROBBANA-BARNAT, S., LAFARGE-FRAYSSINET, C., COHEN, H., NEISH, G. A., & FRAYSSINET, C. Immunosuppressive properties of deoxynivalenol. **Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 155-166, 1988.

RODRIGUES, S. **Otimização e validação de métodos empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola**. 2010. Dissertação de Mestrado em Química - FURG, Rio Grande, RS.

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

ROLLINI, M.; MANZONI, M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1501-1505, 2006

RUBERT, J.; DZUMAN, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; SOLER, C.; HAJLSLOVA, J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: Comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. **Talanta**, v.99, p. 712–719, 2012.

RUBERT, J., SOLER, C., MARÍN, R., JAMES, K. J., & MAÑES, J. Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 122-128, 2013.

SABINO, M. Ocorrência e métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: **Simpósio Internacional Sobre Micotoxinas E Micotoxicoses Em Aves**, 1995, Curitiba. Campinas: FACTA, 1995. p. 35-47.

SANTE/11813/2017. (2017). **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2_017-11813.pdf. Acessado em Junho de 2018.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; BADIALEFURLONG, E. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 371–377, 2014.

SCHÖNEBERG, T., MARTIN, C., WETTSTEIN, F. E., BUCHELI, T. D., MASCHER, F., BERTOSSA, M., ... & VOGELGSANG, S. Fusarium and mycotoxin spectra in Swiss barley are affected by various cropping techniques. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n. 10, p. 1608-1619, 2016.

SCHÖNEBERG, T., JENNY, E., WETTSTEIN, F. E., BUCHELI, T. D., MASCHER, F., BERTOSSA, M., ... & VOGELGSANG, S. Occurrence of Fusarium species and mycotoxins in Swiss oats—Impact of cropping factors. **European Journal of Agronomy**, v. 92, p. 123-132, 2018.

SCOTT, R.P.W. Liquid Chromatography Detectors. **Chrom-Ed Book Series- library4science, LLC**, 2003. Disponível em <<http://www.Library4science.com/>> Acesso em Fevereiro de 2018.

SEKIYAMA, B. L.; RIBEIRO, A. B.; MACHINSKI, P. A.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 289-294, 2005.

SEUS, E. R. **Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo**. Dissertação de Mestrado, 2015.

SEUS, E. R. Tese de Doutorado em andamento (2016-2020).

SIRANIDOU, E., KANG, Z., BUCHENAUER, H. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to Fusarium Head Blight. *J. Phytopathol.* 150, 200–208, 2002.

SKOOG, D. A. HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 836 p., 2002.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana., Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SOINE, TAITO O. Naturally occurring coumarins and related physiological activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n. 3, p. 231-264, 1964.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology letters*, v. 153, n 1, p. 91-98, 2004.

STANCIU, O., JUAN, C., MIERE, D., LOGHIN, F., & MAÑES, J. Occurrence and co-occurrence of Fusarium mycotoxins in wheat grains and wheat flour from Romania. *Food Control*, v. 73, p. 147-155, 2017.

TAMURA, M., UYAMA, A., & MOCHIZUKI, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical sciences*, v. 27, n. 6, p. 629-629, 2011.

TANAKA, T., HASEGAWA, A., MATSUKI, Y., ISHII, K., & UENO, Y. Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. *Food Additives & Contaminants*, v. 2, n. 2, p. 125-137, 1985.

TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.882, p.23–28, 2000.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, v.38, p. 328-334, 2005.

TELLES, A. C. **Feijões: características químicas e ocorrência de aflatoxinas**. Dissertação de Mestrado, 2015.

UENO, Y. Toxicological evaluation of trichothecene mycotoxins. In: *Natural Toxins*. 1980. p. 663-671.

UENO, Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Toxicological Sciences*, v. 4, n.2 part2, p. 124-132, 1984.

US Grain Council, 2008. **Sorghum**. Disponível em: <www.grain.org/galleries/default-file/Sorghum>.

URRY, W. H.; WEHRMEISTER, H. L.; HODGE, E. B.; HIDY, P. H. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, v. 7, n. 27, p. 3109–3114, 1966.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, v.99, n. 3, p. 321-328, 2005.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: tecnología, química y microbiología**. Acribia, 1996.
VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Editora

Blucher, 2010. Vol. 1

VIEIRA, Heulla Pereira; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

WANG, D. I. C. et al. **Fermentation and enzyme technology**. New York: John Wiley e Sons, pag 374, 1979

WANG, Z.; ZHANG, L.; TAN, T. Efficient screening a high glutathione content mutant of *Saccharomyces cerevisiae* by flow. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1168-1171, 2010.

YOSHISAWA, T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. **Training Course, Japão**, v. 253, 2001.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129–144, 2011.

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

Apêndice 1: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 1.

	DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ADONS ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	AFB1 (ng.L^{-1})	AFB2 (ng.L^{-1})	AFG2 (ng.L^{-1})	pH	Cor	° Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L^{-1})	Açúcar Redutor (g.L^{-1})	Fenois (g.L^{-1})	Acidez total	PO	Glutaciona (mg.L^{-1})	Açúcares Totais (g.L^{-1})	Açúcares Não- Redutores (g.L^{-1})
	40,8	1,35	0,7	0,01	3,37	0,14	0,012	4,42	0,337	4,9	4	3,374	13,84	0,124	5,06	0,224	0,178	0,0208	0,21	0,086
	52,8	0,78	0,3	1,35	4,74	0,16	0,012	4,54	0,339	5,4	3,3	3,9	14,96	0,161	5,09	0,237	0,177	0,021	0,238	0,077
	10,2	0,78	0,3	0,07	3,8	0,14	1,3	4,21	0,227	4,9	2,3	3,858	8,42	0,151	3,22	0,139	0,12	0,0142	0,28	0,129
	0,03	0,78	0,3	0,01	6,2	0,43	1,35	4,36	0,267	5,2	3,7	4,212	8,15	0,155	2,92	0,125	0,148	0,0157	0,29	0,135
	0,03	0,78	0,3	0,08	5,2	0,006	0,012	4,53	0,244	5	3,5	3,528	11,6	0,128	4,32	0,148	0,133	0,0184	0,235	0,107
	27,8	3,15	0,62	1,91	3,92	0,006	1,57	4,43	0,326	6,1	4,3	4,47	17,08	0,159	5,34	0,282	0,163	0,0212	0,231	0,072
Média	35,15	2,25	0,83	0,842	4,09	0,202	1,39	4,47	0,302	5,2	3,5	3,79	15,87	0,138	4,94	0,229	0,155	0,0202	0,256	0,118

Apêndice 2: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 2.

	DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Toxina T- 2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	OTA (ng.L^{-1})	AFB1 (ng.L^{-1})	AFB2 (ng.L^{-1})	AFG2 (ng.L^{-1})	pH	Cor	° Brix	Turbid ez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L^{-1})	Açúcar Redutor (g.L^{-1})	Fenois (g.L^{-1})	Acidez total	PO	Glutaciona (mg.L^{-1})	Açúcares Totais (g.L^{-1})	Açúcares Não- Redutores (g.L^{-1})
	14	0,3	13,6	0,01	0,7	0,024	0,006	1,4	4,11	0,236	5,2	1,8	4,482	8,6	0,135	3,69	0,174	0,13	0,0143	0,233	0,098
	23,9	1,39	17,95	0,01	0,7	2,92	0,006	1,3	4,3	0,196	4,9	2,1	3,404	8,77	0,113	4,3	0,152	0,108	0,0138	0,223	0,11
	10,2	0,3	1,33	0,07	0,7	3,8	0,14	1,3	4,21	0,227	4,9	2,3	3,858	8,42	0,151	3,22	0,139	0,12	0,0142	0,28	0,129
	18,8	0,3	2,97	0,23	0,7	5,01	0,22	1,37	4,3	0,233	5,2	2,3	3,788	16,59	0,153	3,22	0,143	0,114	0,0163	0,286	0,133
	17,7	0,73	7,89	0,01	0,7	6,12	0,12	1,3	4,15	0,205	5	1,7	4,002	17,59	0,145	3,09	0,152	0,112	0,0155	0,28	0,135
	9,3	1,06	0,5	0,01	0,7	6,41	0,12	0,012	4,27	0,262	5	2,2	3,654	13,1	0,134	2,44	0,107	0,135	0,0176	0,297	0,163
	0,03	2,5	0,5	0,01	0,7	0,024	0,006	1,44	4,36	0,325	5,4	1,6	4,072	19,67	0,15	3,75	0,179	0,153	0,0241	0,289	0,139
	13,3	0,97	13,5	2,23	0,7	9,22	0,19	1,34	4,26	0,203	5,2	2,4	3,922	12,83	0,13	3,61	0,157	0,093	0,0139	0,315	0,185
	9,6	0,3	0,5	0,32	0,7	4,16	0,006	0,012	4,41	0,189	4,8	2,3	3,468	16,5	0,097	4,42	0,148	0,096	0,0154	0,264	0,167
	12	0,3	0,5	0,75	0,7	3,32	0,006	1,36	4,27	0,219	5,1	2,2	3,946	13,13	0,136	3,55	0,157	0,109	0,0148	0,323	0,187
	16,6	0,3	0,5	0,08	0,7	4,34	0,006	1,38	4,18	0,227	5,4	4,5	4,024	11,45	0,121	3,56	0,157	0,124	0,0153	0,305	0,184
	0,03	0,3	9,55	0,13	8,4	5,42	0,006	1,36	4,21	0,276	4,8	2,2	3,8	8,33	0,09	2,72	0,112	0,14	0,0167	0,293	0,203
	0,03	0,3	0,5	0,22	0,7	3,13	0,006	1,43	4,37	0,236	5,2	3,3	3,926	12,87	0,11	4,26	0,206	0,14	0,0202	0,287	0,177
Média	14,54	1,33	9,541	0,504	8,4	4,89	0,158	1,36	4,26	0,23	5,1	2,3	3,872	12,91	0,128	3,52	0,152	0,121	0,0163	0,282	0,154

Apêndice 3: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 3.

	DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ADONS ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Toxina T-2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	AFB1 (ng.L^{-1})	AFB2 (ng.L^{-1})	AFG2 (ng.L^{-1})	pH	Cor	° Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L^{-1})	Açúcar Redutor (g.L^{-1})	Fenois (g.L^{-1})	Acidez total	PO	Glutationa (mg.L^{-1})	Açúcares Totais (g.L^{-1})	Açúcares Não- Redutores (g.L^{-1})
	18,8	0,78	0,79	2,17	0,73	0,024	0,006	0,012	4,19	0,26	5,3	2,1	3,976	7,71	0,155	3,53	0,157	0,132	0,0145	0,28	0,125
	9,5	0,78	0,54	5,67	0,01	4,44	0,006	1,35	4,09	0,21	5	2,4	3,45	5,93	0,131	3,09	0,094	0,113	0,0141	0,24	0,109
	0,03	0,78	0,3	6,09	0,01	3,32	0,006	1,3	4,12	0,272	5,3	4,5	4,502	11,04	0,132	3,62	0,161	0,149	0,016	0,256	0,124
	10,8	0,78	0,3	0,5	0,01	7,33	0,12	0,012	4,07	0,226	5	2,4	4,298	6,6	0,133	2,8	0,103	0,116	0,0148	0,269	0,136
	18,4	0,78	0,3	12,7	0,01	7,74	0,19	0,012	4,06	0,218	5,4	1,9	3,998	8,98	0,161	3,2	0,174	0,115	0,0159	0,309	0,148
	22,6	0,45	0,86	11,11	3,64	7,9	0,16	0,012	4,17	0,211	5	2,6	3,917	14,19	0,214	3,79	0,161	0,102	0,0154	0,294	0,08
	0,03	0,78	0,3	0,5	0,01	9,12	0,15	1,34	4,21	0,219	5,2	1,9	4,278	14,14	0,15	3,4	0,157	0,111	0,0142	0,375	0,225
Média	16,02	0,45	0,73	7,548	2,185	6,64	0,155	1,33	4,13	0,23	5,2	2,54	4,06	9,79	0,153	3,34	0,144	0,119	0,0149	0,289	0,135

Apêndice 4: Dados sem tratamento das amostras do Grupo 4.

	Toxina T-2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	OTA (ng.L^{-1})	AFB1 (ng.L^{-1})	AFB2 (ng.L^{-1})	AFG2 (ng.L^{-1})	pH	Cor	° Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L^{-1})	Açúcar Redutor (g.L^{-1})	Fenois (g.L^{-1})	Acidez total	PO	Glutationa (mg.L^{-1})	Açúcares Totais (g.L^{-1})	Açúcares Não- Redutores (g.L^{-1})
	2,11	0,01	0,7	6,2	0,43	1,35	4,36	0,267	5,2	3,7	4,212	8,15	0,155	2,92	0,125	0,148	0,0157	0,29	0,135
	0,5	0,13	2,04	4,53	0,006	1,3	4,3	0,215	4,9	3,1	4,262	11,45	0,125	3,35	0,161	0,11	0,0147	0,279	0,154
	2,85	0,01	2,09	5,32	0,006	1,32	4,28	0,234	5,3	3	4,288	11,14	0,144	3,58	0,179	0,117	0,0148	0,363	0,219
	0,5	0,01	0,7	5,36	0,006	1,34	3,91	0,221	5,2	3,6	4,022	9,96	0,124	3,22	0,161	0,116	0,0156	0,342	0,218
	1,44	0,01	0,7	5,04	0,006	0,012	4,03	0,198	5,3	4,1	3,94	9,42	0,123	2,92	0,148	0,112	0,0152	0,319	0,196
Média	2,13	0,13	2,06	5,29	0,43	1,33	4,18	0,227	5,18	3,5	4,145	10,02	0,134	3,2	0,155	0,120	0,0152	0,319	0,184

Apêndice 5: Dados sem tratamento das amostras.

Amostr as	DON (µg.L ⁻¹)	ADON S (µg.L ⁻¹)	NIV (µg.L ⁻¹)	Toxina T-2 (µg.L ⁻¹)	ZEA (µg.L ⁻¹)	OTA (ng.L ⁻¹)	AFB1 (ng.L ⁻¹)	AFB2 (ng.L ⁻¹)	AFG2 (ng.L ⁻¹)	pH	Cor	° Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L ⁻¹)	Açúcar Redutor (g.L ⁻¹)	Fenois (g.L ⁻¹)	Acidez total	PO	Glutationa (mg.L ⁻¹)	Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	Açúcares Não- Redutores (g.L ⁻¹)
1	18,8	0,78	0,79	2,17	0,73	0,7	0,024	0,006	0,012	4,19	0,26	5,3	2,1	3,976	7,71	0,155	3,53	0,157	0,132	0,0145	0,28	0,125
2	9,5	0,78	0,54	5,67	0,01	0,7	4,44	0,006	1,35	4,09	0,21	5	2,4	3,45	5,93	0,131	3,09	0,094	0,113	0,0141	0,24	0,109
3	14	0,78	0,3	13,6	0,01	0,7	0,024	0,006	1,4	4,11	0,236	5,2	1,8	4,482	8,6	0,135	3,69	0,174	0,13	0,0143	0,233	0,098
4	0,03	0,78	0,3	6,09	0,01	0,7	3,32	0,006	1,3	4,12	0,272	5,3	4,5	4,502	11,04	0,132	3,62	0,161	0,149	0,016	0,256	0,124
5	23,9	0,78	1,39	17,95	0,01	0,7	2,92	0,006	1,3	4,3	0,196	4,9	2,1	3,404	8,77	0,113	4,3	0,152	0,108	0,0138	0,223	0,11
6	40,8	1,35	0,7	0,5	0,01	0,7	3,37	0,14	0,012	4,42	0,337	4,9	4	3,374	13,84	0,124	5,06	0,224	0,178	0,0208	0,21	0,086
7	52,8	0,78	0,3	0,5	1,35	0,7	4,74	0,16	0,012	4,54	0,339	5,4	3,3	3,9	14,96	0,161	5,09	0,237	0,177	0,021	0,238	0,077
8	10,2	0,78	0,3	1,33	0,07	0,7	3,8	0,14	1,3	4,21	0,227	4,9	2,3	3,858	8,42	0,151	3,22	0,139	0,12	0,0142	0,28	0,129
9	0,03	0,78	0,3	2,11	0,01	0,7	6,2	0,43	1,35	4,36	0,267	5,2	3,7	4,212	8,15	0,155	2,92	0,125	0,148	0,0157	0,29	0,135
10	0,03	0,78	0,3	0,5	0,08	0,7	5,2	0,006	0,012	4,53	0,244	5	3,5	3,528	11,6	0,128	4,32	0,148	0,133	0,0184	0,235	0,107
11	10,8	0,78	0,3	0,5	0,01	0,7	7,33	0,12	0,012	4,07	0,226	5	2,4	4,298	6,6	0,133	2,8	0,103	0,116	0,0148	0,269	0,136
12	18,4	0,78	0,3	12,7	0,01	0,7	7,74	0,19	0,012	4,06	0,218	5,4	1,9	3,998	8,98	0,161	3,2	0,174	0,115	0,0159	0,309	0,148
13	18,8	0,78	0,3	2,97	0,23	0,7	5,01	0,22	1,37	4,3	0,233	5,2	2,3	3,788	16,59	0,153	3,22	0,143	0,114	0,0163	0,286	0,133
14	17,7	0,78	0,73	7,89	0,01	0,7	6,12	0,12	1,3	4,15	0,205	5	1,7	4,002	17,59	0,145	3,09	0,152	0,112	0,0155	0,28	0,135
15	9,3	0,78	1,06	0,5	0,01	0,7	6,41	0,12	0,012	4,27	0,262	5	2,2	3,654	13,1	0,134	2,44	0,107	0,135	0,0176	0,297	0,163
16	0,03	0,78	2,5	0,5	0,01	0,7	0,024	0,006	1,44	4,36	0,325	5,4	1,6	4,072	19,67	0,15	3,75	0,179	0,153	0,0241	0,289	0,139
17	22,6	0,45	0,86	11,11	3,64	0,7	7,9	0,16	0,012	4,17	0,211	5	2,6	3,917	14,19	0,214	3,79	0,161	0,102	0,0154	0,294	0,08
18	0,03	0,78	0,3	0,5	0,01	0,7	9,12	0,15	1,34	4,21	0,219	5,2	1,9	4,278	14,14	0,15	3,4	0,157	0,111	0,0142	0,375	0,225
19	13,3	0,78	0,97	13,5	2,23	0,7	9,22	0,19	1,34	4,26	0,203	5,2	2,4	3,922	12,83	0,13	3,61	0,157	0,093	0,0139	0,315	0,185
20	27,8	3,15	0,62	0,5	1,91	0,7	3,92	0,006	1,57	4,43	0,326	6,1	4,3	4,47	17,08	0,159	5,34	0,282	0,163	0,0212	0,231	0,072
21	9,6	0,78	0,3	0,5	0,32	0,7	4,16	0,006	0,012	4,41	0,189	4,8	2,3	3,468	16,5	0,097	4,42	0,148	0,096	0,0154	0,264	0,167
22	0,03	0,78	0,3	0,5	0,03	0,7	3,3	0,2	1,3	4,47	0,279	5	2,6	3,658	18,46	0,133	4,82	0,228	0,145	0,0199	0,283	0,15
23	19,2	0,15	1,17	0,5	0,01	0,7	4,03	0,31	1,3	4,42	0,288	5,2	3,3	3,85	19,32	0,128	5,03	0,255	0,137	0,0199	0,341	0,213
24	12	0,78	0,3	0,5	0,75	0,7	3,32	0,006	1,36	4,27	0,219	5,1	2,2	3,946	13,13	0,136	3,55	0,157	0,109	0,0148	0,323	0,187
25	0,03	0,78	0,3	0,5	0,13	2,04	4,53	0,006	1,3	4,3	0,215	4,9	3,1	4,262	11,45	0,125	3,35	0,161	0,11	0,0147	0,279	0,154
26	0,03	0,78	0,3	2,85	0,01	2,09	5,32	0,006	1,32	4,28	0,234	5,3	3	4,288	11,14	0,144	3,58	0,179	0,117	0,0148	0,363	0,219
27	0,03	0,78	0,3	0,5	0,01	0,7	5,36	0,006	1,34	3,91	0,221	5,2	3,6	4,022	9,96	0,124	3,22	0,161	0,116	0,0156	0,342	0,218
28	0,03	0,78	0,3	1,44	0,01	0,7	5,04	0,006	0,012	4,03	0,198	5,3	4,1	3,94	9,42	0,123	2,92	0,148	0,112	0,0152	0,319	0,196
29	16,6	0,78	0,3	0,5	0,08	0,7	4,34	0,006	1,38	4,18	0,227	5,4	4,5	4,024	11,45	0,121	3,56	0,157	0,124	0,0153	0,305	0,184
30	0,03	0,78	0,3	9,55	0,13	8,4	5,42	0,006	1,36	4,21	0,276	4,8	2,2	3,8	8,33	0,09	2,72	0,112	0,14	0,0167	0,293	0,203

31 0,03 0,78 0,3 0,5 0,22 0,7 3,13 0,006 1,43 4,37 0,236 5,2 3,3 3,926 12,87 0,11 4,26 0,206 0,14 0,0202 0,287 0,177

Apêndice 6: Tabela de correlação do Grupo 1

	DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ADONS ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	AFB1 (ng.L^{-1})	AFB1 (ng.L^{-1})	AFG2 (ng.L^{-1})	pH	Cor	°Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L^{-1})	Açúcar Redutor (g.L^{-1})	Fenóis (g.L^{-1})	Acidez total	PO	Glutationa (mg.L^{-1})	Açúcares Totais (g.L^{-1})	Açúcares Não- Redutores (g.L^{-1})
DON ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0	0,48329	0,39477	0,95994	0,66991	0,03647	0,37797	0,16054	0,41618	0,7215	0,85094	0,57668	0,26383	0,49756	0,9206	0,60625	0,15672	0,63088	0,17095	0,14878
ADONS ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	-0,36003	0	0,79942	0,35327	0,6593	0,51452	0,012351	0,91363	0,86334	0,031514	0,76365	0,013731	0,49861	0,14991	0,62615	0,42282	0,64943	0,81876	0,79316	0,87907
NIV ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	-0,42998	-0,13453	0	0,52509	0,77069	0,05135	0,67939	0,93912	0,43095	0,48573	0,27201	0,71929	0,3973	0,45392	0,68767	0,94181	0,23102	0,43368	0,01685	0,015548
ZEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,026715	0,46458	-0,32841	0	0,96917	0,86316	0,73425	0,61134	0,070007	0,031785	0,13349	0,066848	0,72499	0,081591	0,03188	0,083708	0,19235	0,047157	0,64683	0,38251
AFB1 (ng.L^{-1})	0,2238	0,23125	0,1541	-0,02056	0	0,91253	0,68257	0,076671	0,49237	0,886	0,93521	0,93237	0,23554	0,65009	0,31056	0,27226	0,62642	0,35157	0,80063	0,71955
AFB2 (ng.L^{-1})	-0,83973	0,33633	0,80878	-0,09148	0,05838	0	0,23507	0,53144	0,3527	0,87713	0,64765	0,63406	0,19564	0,64974	0,94272	0,69061	0,098378	0,51413	0,013567	0,027168
AFG2 (ng.L^{-1})	-0,44383	0,90783	0,21716	0,17908	0,21493	0,5725	0	0,81993	0,53748	0,20367	0,65695	0,094363	0,27416	0,33597	0,87603	0,5339	0,31926	0,86848	0,33022	0,59414
pH	0,65205	0,057646	-0,04061	-0,26533	0,76448	-0,32368	0,12063	0	0,59514	0,77701	0,46738	0,75534	0,26473	0,56164	0,25075	0,20404	0,90551	0,46486	0,61364	0,5334
Cor	0,41263	-0,09136	-0,40083	0,77539	-0,35309	-0,46506	-0,31919	-0,27699	0	0,42213	0,35335	0,53987	0,82915	0,27349	0,028771	0,14509	0,005214	0,002559	0,45693	0,31759
°Brix	-0,18788	0,85132	-0,35816	0,85067	0,07615	0,082097	0,60453	-0,14978	0,40786	0	0,27519	0,000868	0,58804	0,046593	0,16534	0,14562	0,63906	0,24753	0,80937	0,48256
Turbidez	-0,09971	0,1589	-0,53692	0,68465	0,043222	-0,23948	-0,23291	-0,37228	0,46451	0,53395	0	0,47369	0,52444	0,6533	0,40157	0,62842	0,3835	0,42086	0,24263	0,24199
Extrato Seco (%)	-0,29038	0,90274	-0,1894	0,78073	0,045114	0,24912	0,73743	-0,16459	0,31741	0,97585	0,3674	0	0,36844	0,061081	0,17746	0,10926	0,83294	0,3056	0,88303	0,74424
Proteína (mg.L^{-1})	-0,54463	0,34835	0,42792	0,18547	-0,57203	0,61303	0,53491	-0,54378	0,1144	0,28213	-0,3289	0,45178	0	0,82856	0,27054	0,082631	0,74092	0,51555	0,081964	0,18348
Açúcar Redutor (g.L^{-1})	0,34915	0,66456	-0,38274	0,7567	0,23775	-0,238	0,47942	0,30137	0,53554	0,81816	0,23549	0,79078	0,1148	0	0,25319	0,29841	0,33293	0,19187	0,60648	0,26956
Fenóis (g.L^{-1})	-0,05298	0,25475	-0,21137	0,85044	-0,50173	-0,03821	0,082837	-0,55714	0,85811	0,64651	0,42444	0,63285	0,5383	0,55479	0	0,003386	0,16289	0,003809	0,98563	0,73709
Acidez total	-0,26899	0,40731	-0,03882	0,75342	-0,53669	0,20932	0,32185	-0,60414	0,67035	0,66971	0,25313	0,71637	0,75508	0,51263	0,9521	0	0,42766	0,040577	0,63926	0,91212
PO	0,6565	-0,23822	-0,57653	0,61656	-0,25455	-0,73162	-0,49401	-0,06308	0,94045	0,24556	0,43925	0,11184	0,17449	0,48205	0,64933	0,40345	0	0,035065	0,18203	0,12494
Glutationa (mg.L^{-1})	0,25138	0,12142	-0,39867	0,81702	-0,46602	-0,33663	-0,08791	-0,37423	0,9584	0,56027	0,40888	0,50616	0,33556	0,61708	0,94918	0,83068	0,84294	0	0,63002	0,42193
Açúcares Totais (g.L^{-1})	-0,64014	0,13878	0,89205	-0,24006	-0,13371	0,90333	0,48441	-0,26368	-0,38039	-0,12778	-0,56505	0,078138	0,75612	-0,26882	-0,00958	0,24542	-0,62779	-0,25199	0	0,002846
Açúcares Não-Redutores (g.L^{-1})	-0,66591	-0,08079	0,89639	-0,44006	-0,18923	0,86222	0,27772	-0,32222	-0,49549	-0,36059	-0,56568	-0,17221	0,6262	-0,53922	-0,17713	0,058656	-0,69553	-0,40802	0,95612	0

Apêndice 7: Tabela de correlação do Grupo 2.

	DON (µg.L ⁻¹)	NIV (µg.L ⁻¹)	Toxina T- 2 (µg.L ⁻¹)	ZEA (µg.L ⁻¹)	OTA (ng.L ⁻¹)	AFB1 (ng.L ⁻¹)	AFB2 (ng.L ⁻¹)	AFG2 (ng.L ⁻¹)	pH	Cor	° Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L ⁻¹)	Açúcar Redutor (g.L ⁻¹)	Fenóis (g.L ⁻¹)	Acidez total	PO	Glutaciona (mg.L ⁻¹)	Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	Açúcares Não- Redutores (g.L ⁻¹)
DON (µg.L ⁻¹)	0	0,93045	0,23164	0,81057	0,99931	0,5212	0,31748	0,53204	0,71373	0,60836	0,61045	0,88289	0,73558	0,87971	0,99861	0,42824	0,5131	0,82868	0,76246	0,15082	0,21121
NIV (µg.L ⁻¹)	0,026915	0	0,99137	0,44676	0,99948	0,24682	0,57204	0,027205	0,14415	0,007465	0,17842	0,67065	0,67761	0,38411	0,68698	0,33418	0,26279	0,047608	0,007009	0,81361	0,64412
Toxina T-2 (µg.L ⁻¹)	0,35664	0,003336	0	0,14349	0,99894	0,8	0,86383	0,88173	0,96658	0,57738	0,93266	0,84631	0,85082	0,41727	0,12306	0,15133	0,49567	0,68502	0,66226	0,18888	0,84727
ZEA (µg.L ⁻¹)	-0,07383	-0,23145	0,42904	0	0,50942	0,005172	0,38239	0,66785	0,96977	0,4343	0,55867	0,50663	0,78403	0,74542	0,69507	0,81824	0,76197	0,095269	0,47554	0,34653	0,56898
OTA (ng.L ⁻¹)	0,000267	0,0002	0,000411	-0,20138	0	0,7622	0,99948	0,96864	0,56745	0,24674	0,15279	0,82053	0,79601	0,22359	0,048541	0,16681	0,10587	0,29289	0,89821	0,72644	0,12827
AFB1 (ng.L ⁻¹)	-0,19592	-0,34602	0,078021	0,72364	0,093125	0	0,70705	0,7031	0,41838	0,8807	0,69067	0,5327	0,58187	0,53298	0,57429	0,11872	0,32208	0,51379	0,77493	0,21627	0,4797
AFB2 (ng.L ⁻¹)	0,30109	0,17295	-0,05286	0,26456	0,0002	0,11552	0	0,44468	0,38952	0,8023	0,2783	0,68168	0,99983	0,73906	0,87022	0,40032	0,53069	0,37631	0,83705	0,75962	0,86818
AFG2 (ng.L ⁻¹)	-0,19095	0,60887	0,045865	-0,13177	-0,01213	-0,11715	0,23248	0	0,26739	0,024697	0,020973	0,51556	0,13435	0,31915	0,83923	0,47902	0,065256	0,020918	0,004197	0,59459	0,55014
pH	-0,11278	0,4284	0,012923	0,011688	-0,17499	-0,24573	0,26076	0,33224	0	0,81367	0,86064	0,99507	0,034075	0,10464	0,40673	0,074903	0,45875	0,89983	0,089134	0,81722	0,46819
Cor	-0,15706	0,70209	-0,17059	-0,23766	0,34607	0,046265	-0,07711	0,61694	0,072598	0	0,23079	0,55429	0,286	0,53902	0,54147	0,20186	0,93014	5,49E-05	0,000956	0,47895	0,81416
° Brix	0,15615	0,39767	0,026057	0,17891	-0,42024	0,12228	0,32519	0,63013	-0,05411	0,35725	0	0,22942	0,02339	0,27238	0,11736	0,69098	0,035019	0,29175	0,15184	0,31092	0,95221
Turbidez	0,045412	-0,1306	-0,05973	-0,20268	-0,06989	-0,19065	0,126	0,19853	-0,0019	-0,18087	0,35822	0	0,98435	0,48371	0,31377	0,5992	0,55249	0,97286	0,80294	0,2863	0,10312
Extrato Seco (%)	-0,10388	0,12769	-0,05796	0,084381	-0,07961	0,16861	-6,68E-05	0,43806	-0,58925	0,3203	0,62139	-0,00605	0	0,92749	0,15957	0,66556	0,12456	0,20584	0,65752	0,72645	0,58833
Proteína (mg.L ⁻¹)	-0,04665	0,26364	-0,2463	0,099889	-0,36244	0,19052	0,10246	0,3001	0,47054	0,18777	0,32899	-0,2135	-0,02806	0	0,24559	0,77096	0,46301	0,96313	0,050403	0,34037	0,90966
Açúcar Redutor (g.L ⁻¹)	0,000536	0,1238	-0,44977	0,12045	-0,55589	0,17196	0,05036	-0,06251	-0,25173	0,18666	0,45596	-0,3033	0,41405	0,34687	0	0,31541	0,74547	0,86496	0,74063	0,61756	0,085981
Fenóis (g.L ⁻¹)	0,24071	0,29133	0,42159	0,070791	-0,40761	-0,45446	0,25507	0,21574	0,51013	-0,37877	0,12215	0,16103	-0,13273	0,089608	-0,30232	0	0,004972	0,34563	0,93464	0,15955	0,56948
Acidez total	0,19967	0,33527	0,20782	0,093217	-0,46907	-0,29837	0,19156	0,52531	0,22555	-0,02704	0,58679	0,18168	0,44817	0,22347	0,099869	0,72584	0	0,68941	0,25801	0,66519	0,5569
PO	-0,06667	0,5578	-0,12462	-0,48207	0,316	-0,19935	-0,26783	0,63034	-0,03881	0,88621	0,31671	0,010491	0,3757	-0,01426	0,052416	-0,28479	0,1228	0	0,002817	0,93417	0,97268
Glutaciona (mg.L ⁻¹)	-0,09302	0,70592	-0,13411	-0,21741	0,039441	-0,08802	-0,06337	0,73512	0,49004	0,80271	0,42113	-0,07685	0,1361	0,55214	0,10183	0,025292	0,33844	0,75556	0	0,51399	0,71752
Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	-0,42207	-0,07262	-0,38905	0,28428	0,10759	0,36783	0,094163	0,16304	0,071194	0,21577	0,305	0,32012	0,10759	0,28778	0,15309	-0,41406	-0,13288	0,025472	0,19926	0	0,001536
Açúcares Não- Redutores (g.L ⁻¹)	-0,37162	-0,14175	-0,05935	0,17431	0,44428	0,21541	0,051158	0,18274	0,22095	0,072405	-0,01848	0,47235	-0,16577	0,034986	-0,49429	-0,17409	-0,1797	-0,01056	0,11123	0,78338	0

Apêndice 8: Tabela de correlação do Grupo 3.

	DON (μg.L ⁻¹)	NIV (μg.L ⁻¹)	Toxina T-2 (μg.L ⁻¹)	ZEA (μg.L ⁻¹)	OTA (ng.L ⁻¹)	AFB1 (ng.L ⁻¹)	AFB2 (ng.L ⁻¹)	AFG2 (ng.L ⁻¹)	pH	Cor	° Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L ⁻¹)	Açúcar Redutor (g.L ⁻¹)	Fenóis (g.L ⁻¹)	Acidez total	PO	Glutaciona (mg.L ⁻¹)	Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	Açúcares Não-Redutores (g.L ⁻¹)
DON (μg.L ⁻¹)	0	0,12792	0,016688	0,45387	0,60712	0,39642	0,21967	0,49896	0,24811	0,79975	0,39959	0,95222	0,74781	0,098863	0,018747	0,026513	0,010438	0,88119	0,28082	0,38338	0,73794
NIV (μg.L ⁻¹)	0,63188	0	0,16339	0,3138	0,046012	0,55783	0,81815	0,99944	0,52422	0,43796	0,31886	0,95267	0,69283	0,18407	0,004435	0,1776	0,60558	0,25599	0,61609	0,91567	0,21002
Toxina T-2 (μg.L ⁻¹)	0,84498	0,58978	0	0,59866	0,65566	0,26809	0,90803	0,33972	0,29122	0,64117	0,69677	0,97392	0,29512	0,15993	0,069152	0,16135	0,094054	0,9466	0,34614	0,42083	0,82042
ZEA (μg.L ⁻¹)	0,34121	0,44768	0,24357	0	0,059287	0,32002	0,2987	0,96668	0,43376	0,1527	0,99556	0,70843	0,97029	0,38517	0,23168	0,98077	0,48131	0,19533	0,20813	0,46701	0,98228
OTA (ng.L ⁻¹)	0,23812	0,76299	0,20726	0,73604	0	0,70521	0,88111	1	0,83701	0,18183	0,24439	0,73194	0,91609	0,20307	0,17022	0,63557	0,9387	0,19949	0,46906	0,84582	0,53171
AFB1 (ng.L ⁻¹)	0,383	0,27022	0,48665	0,44259	0,17638	0	0,9454	0,33841	0,45672	0,21981	0,95052	0,045085	0,86725	0,35072	0,24514	0,92318	0,53174	0,084136	0,66178	0,025481	0,28385
AFB2 (ng.L ⁻¹)	0,53138	0,10775	0,054257	0,46026	0,070202	0,032179	0	0,9545	0,87394	0,82317	0,13511	0,78751	0,52263	0,66796	0,42349	0,39632	0,11639	0,93033	0,29658	0,69487	0,90593
AFG2 (ng.L ⁻¹)	-0,30978	0,000327	-0,4267	0,019634	-6,06E-07	0,42774	-0,02681	0	0,90819	0,039538	0,31329	0,023388	0,056133	0,62332	0,89792	0,36003	0,28016	0,045284	0,039861	0,64481	0,71308
pH	0,50461	0,29262	0,46659	-0,35559	-0,09646	0,33919	-0,07446	0,05416	0	0,69877	0,91747	0,81409	0,7728	0,12211	0,39593	0,092994	0,36072	0,95816	0,42457	0,21263	0,54166
Cor	0,11879	-0,35256	0,2164	-0,60193	-0,5697	-0,53125	-0,10473	-0,7777	0,18036	0	0,21659	0,12225	0,19503	0,86121	0,43999	0,46069	0,50409	0,000766	0,49904	0,53688	0,91199
° Brix	0,38064	-0,44353	0,18159	0,002617	-0,50803	-0,02916	0,62291	-0,4481	0,04867	0,53437	0	0,87434	0,42624	0,86102	0,77707	0,58215	0,059678	0,20016	0,30298	0,54617	0,42878
Turbidez	-0,02816	0,027891	0,015364	-0,17439	0,15994	-0,76502	-0,12617	-0,82162	0,11018	0,63913	0,074223	0	0,30322	0,78607	0,62675	0,43501	0,86331	0,070067	0,21252	0,26034	0,45668
Extrato Seco (%)	0,15024	-0,18404	0,46328	0,017502	-0,04949	0,07844	-0,29369	-0,74212	0,13506	0,55593	0,36103	0,45647	0	0,39507	0,70301	0,78496	0,37927	0,25574	0,33273	0,50076	0,34991
Proteína (mg.L ⁻¹)	0,67108	0,56733	0,59367	0,39145	0,54777	0,41799	0,19954	-0,22774	0,63931	-0,08203	0,082143	0,12704	0,38401	0	0,14268	0,069558	0,10921	0,67271	0,59557	0,098076	0,56816
Açúcar Redutor (g.L ⁻¹)	0,83731	0,91007	0,71808	0,51989	0,58222	0,50734	0,36303	0,060241	0,38337	-0,35111	-0,13248	-0,22556	-0,17773	0,61372	0	0,13803	0,24188	0,22035	0,57286	0,5078	0,44253
Fenóis (g.L ⁻¹)	0,81203	0,57422	0,59206	-0,01133	0,21995	-0,0453	0,38308	-0,41072	0,6797	0,33639	0,25427	0,35469	0,12771	0,71737	0,61933	0	0,071083	0,66841	0,47395	0,69173	0,63602
Acidez total	0,87229	0,23911	0,67812	0,32196	0,036133	0,28757	0,64681	-0,47609	0,41019	0,30627	0,7353	0,080778	0,39593	0,65651	0,51034	0,71473	0	0,67044	0,16863	0,22878	0,69402
PO	-0,07016	-0,49745	-0,03147	-0,55562	-0,55138	-0,69327	-0,04108	-0,76459	0,02465	0,9559	0,5507	0,71649	0,49768	-0,19657	-0,53072	0,19925	0,19799	0	0,44822	0,3944	0,9419
Glutaciona (mg.L ⁻¹)	0,47551	0,23236	0,42161	0,5427	0,3305	-0,20341	0,46205	-0,77694	0,36225	0,30973	0,45667	0,53836	0,43229	0,24557	0,26034	0,32708	0,58396	0,34523	0	0,76526	0,50445
Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	0,39281	0,049734	0,36497	0,33194	0,0912	0,81513	0,18277	0,2141	0,53826	-0,28413	0,27794	-0,49354	0,30856	0,67222	0,30374	0,18472	0,52264	-0,38451	-0,13963	0	0,035863
Açúcares Não-Redutores (g.L ⁻¹)	-0,15626	-0,54083	-0,10638	-0,01044	-0,28759	0,4729	-0,0555	0,17152	0,28094	-0,05192	0,35919	-0,33922	0,41863	0,26342	-0,34929	-0,21966	0,1833	-0,03424	-0,30603	0,78665	0

Apêndice 9: Tabela de correlação do Grupo 4.

	Toxina T-2 (µg.L ⁻¹)	ZEA (µg.L ⁻¹)	OTA (ng.L ⁻¹)	AFB1 (ng.L ⁻¹)	AFB2 (ng.L ⁻¹)	AFG2 (ng.L ⁻¹)	pH	Cor	° Brix	Turbidez	Extrato Seco (%)	Proteína (mg.L ⁻¹)	Açúcar Redutor (g.L ⁻¹)	Fenóis (g.L ⁻¹)	Acidez total	PO	Glutaciona (mg.L ⁻¹)	Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	Açúcares Não-Redutores (g.L ⁻¹)
Toxina T-2 (µg.L ⁻¹)	0	0,9994	0,38347	0,81861	0,9663	0,80382	0,45784	0,42541	0,99165	0,05979	0,11388	0,42067	0,3982	0,079677	0,31459	0,88821	0,58671	0,43464	0,70326
ZEA (µg.L ⁻¹)	0,000474	0	0,11084	0,18823	0,68504	0,10357	0,55714	0,67316	0,012308	0,39778	0,47749	0,28901	0,55851	0,62564	0,78025	0,52775	0,26714	0,25251	0,45234
OTA (ng.L ⁻¹)	0,50685	-0,79124	0	0,43487	0,99943	0,5409	0,9531	0,6726	0,060799	0,90194	0,92548	0,89461	0,43256	0,64241	0,60234	0,79805	0,89942	0,069487	0,28257
AFB1 (ng.L ⁻¹)	0,14295	-0,69987	0,46071	0	0,076337	0,03674	0,74839	0,076466	0,37312	0,62585	0,93571	0,10169	0,10186	0,48858	0,28768	0,028149	0,12454	0,8962	0,70912
AFB2 (ng.L ⁻¹)	-0,02647	-0,25	0,000447	0,83801	0	0,23037	0,36102	0,058013	0,91343	0,68882	0,69397	0,11729	0,10329	0,34112	0,079298	0,002655	0,26736	0,43958	0,16698
AFG2 (ng.L ⁻¹)	-0,1547	-0,80068	0,36914	0,90117	0,65487	0	0,7153	0,33128	0,29044	0,29516	0,54718	0,048227	0,42872	0,28882	0,26873	0,15882	0,013768	0,80901	0,95017
pH	0,4405	0,35545	-0,03684	0,19893	0,52745	-0,22553	0	0,26781	0,59602	0,3835	0,058617	0,93503	0,17792	0,7597	0,76815	0,41341	0,58243	0,46601	0,21761
Cor	0,4691	-0,25965	0,2601	0,83782	0,86548	0,55523	0,61677	0	0,89515	0,76463	0,32593	0,41325	0,021403	0,89882	0,4427	0,028868	0,45356	0,82117	0,40924
° Brix	0,006559	-0,95258	0,86115	0,51631	0,068041	0,59444	-0,32299	0,082444	0	0,46203	0,49733	0,47187	0,65479	0,76186	0,98837	0,75783	0,5401	0,17838	0,33918
Turbidez	-0,86271	-0,49386	-0,07709	0,29834	0,24693	0,58984	-0,50682	-0,18593	0,43684	0	0,063444	0,12564	0,76882	0,029055	0,22235	0,73576	0,22654	0,80999	0,91348
Extrato Seco (%)	0,78736	0,42339	0,058563	0,050514	0,24276	-0,36384	0,86454	0,56029	-0,40626	-	0	0,50277	0,29863	0,27121	0,71212	0,68524	0,42531	0,81501	0,55545
Proteína (mg.L ⁻¹)	0,47333	0,59584	-0,08287	-0,80315	-0,78303	-0,88127	0,051053	-0,47996	-0,42827	-	0,40159	0	0,46483	0,052984	0,041757	0,12018	0,051502	0,69764	0,52187
Açúcar Redutor (g.L ⁻¹)	0,49349	-0,35431	0,46276	0,80293	0,80104	0,46616	0,71131	0,93128	0,27462	0,77259	0,58647	-0,4344	0	0,95779	0,54236	0,063467	0,66526	0,97583	0,50721
Fenóis (g.L ⁻¹)	0,83323	0,29852	0,28475	-0,4138	-0,54598	-0,59602	0,18988	-0,07955	-0,18815	-	0,61338	0,87348	-0,03316	0	0,036792	0,42594	0,19117	0,40878	0,43939
Acidez total	0,57109	0,17347	0,31776	-0,59714	-0,83377	-0,61586	-0,18312	-0,45379	-0,00914	-	0,22809	0,89226	-0,36791	0,90107	0	0,14065	0,19131	0,23354	0,15462
PO	0,087911	-0,38028	0,15928	0,91738	0,98299	0,733	0,47981	0,91597	0,19138	0,20907	0,24983	-0,77939	0,85706	-0,46863	-0,75435	0	0,22645	0,63498	0,29203
Glutaciona (mg.L ⁻¹)	-0,33073	-0,61744	0,079081	0,77396	0,61722	0,94888	-0,33429	0,44425	0,36982	0,65887	-0,4692	-0,87588	0,26608	-0,69665	-0,6965	0,65896	0	0,9418	0,81834
Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	0,46092	-0,63215	0,84801	0,081617	-0,45655	0,15057	-0,43337	-0,14092	0,71079	-	-0,14581	0,23979	-0,01898	0,48396	0,65159	-0,29084	-0,04572	0	0,024444
Açúcares Não-Redutores (g.L ⁻¹)	0,23525	-0,44532	0,60215	-0,23051	-0,72365	-0,03915	-0,66824	-0,48355	0,5478	-0,068	-0,35687	0,38528	-0,39779	0,45672	0,73787	-0,59289	-0,14317	0,92486	0