

Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas

Micotoxinas



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Trigo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA MINIMIZAR A CONTAMINAÇÃO DE TRIGO POR MICOTOXINAS

*Casiane Salete Tibola
José Maurício Cunha Fernandes
Emerson Medeiros Del Ponte
Carlos Augusto Mallmann
Paulo Dilkin
Maria Imaculada P. M. Lima
Willingthon Pavan*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Trigo

Rodovia BR 285, km 294

Caixa Postal 451

Telefone: 54 3316-5800

Fax: 54 3316-5802

99001-970 Passo Fundo, RS

Home page: www.cnpt.embrapa.br

E-mail: cnpt.sac@embrapa.br

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Trigo

Comitê de Publicações

Presidente

Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi

Vice-Presidente: *João Carlos Haas*

Membros: *Douglas Lau, Flávio Martins*

Santana, Elene Yamazaki Lau, Joseani

Mesquita Antunes, Maria Regina Cunha

Martins, Leandro Vargas, Renato Serena

Fontaneli

Tratamento editorial

Vera Rosendo

Supervisão editorial

Dayana Fernanda Maldaner

Capa

Fátima Maria De Marchi

Fotos da capa

Casiane Salete Tibola

Normalização bibliográfica

Maria Regina Cunha Martins

1ª edição

1ª impressão (2013): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Trigo

Indicações técnicas para minimizar a contaminação de trigo por micotoxinas / Casiane Salete Tibola... [et al.] – Passo Fundo : Embrapa Trigo, 2013.

34 p.; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Trigo, ISSN 1676-4544 ; 11).

1. Trigo - Micotoxina. I. Tibola, Casiane Salete. II. Série.

CDD: 633.11

© Embrapa - 2013

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Caracterização da giberela do trigo.....	8
Sintomas da doença	8
Agente causal	9
Ciclo da doença	10
Epidemiologia.....	11
Estratégias de manejo de giberela	11
Critérios indicadores para uso de fungicidas.....	13
Micotoxinas no trigo.....	15
Legislação brasileira para micotoxinas em trigo.....	18
Amostragem para análise de micotoxinas.....	19
Como obter amostra representativa.....	21
Indicações para amostragem mecânica em lavouras comerciais	22
Indicações para amostragem em parcelas experimentais	22
Amostragem de parcelas colhidas mecanicamente.....	22
Amostragem de parcelas colhidas manualmente	22
Indicações para amostragem em meios de transporte	23

Indicações para amostragem no armazenamento	23
Armazenamento e moagem de amostras	24
Métodos para a quantificação de micotoxinas	24
Estratégias para manejo de micotoxinas na pós-colheita	29
Considerações finais	30
Referências	31

INDICAÇÕES TÉCNICAS PARA MINIMIZAR A CONTAMINAÇÃO DE TRIGO POR MICOTOXINAS

*Casiane Salete Tibola*¹

*José Mauricio Cunha Fernandes*²

*Emerson Medeiros Del Ponte*³

*Carlos Augusto Mallmann*⁴

*Paulo Dilkin*⁵

*Maria Imaculada P. M. Lima*⁶

*Willingthon Pavan*⁷

Resumo

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos toxigênicos que podem infectar e/ou colonizar os cereais e subprodutos, durante a produção e pós-colheita, constituindo-se um dos atuais desafios na produção de alimentos. No Sul do Brasil, que concentra 90% da produção de trigo, a ocorrência de chuvas a partir do espigamento e enchimento de grãos, favorecem a incidência de doenças fúngicas. A mais importante é a giberela do trigo causada por *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), que resulta em redução no rendimento de grãos e na contaminação por micotoxinas, levando à rejeição ou desvalorização do trigo no mercado. Este documento técnico sumariza informações sobre a doença giberela e as principais micotoxinas em trigo, com o foco em estratégias de manejo da doença na produção, procedimentos de amostragem e de quantificação de micotoxinas, visando minimizar o risco de contaminação do trigo e atender aos requisitos da legislação. A adoção de boas práticas para controle da giberela no campo, bem como a adoção de métodos adequados de amostragem e de detecção na pós-colheita, contribuem para minimizar o risco de exposição dos consumidores e o impacto destes contaminantes na saúde humana e animal.

¹ Eng. Agr.ª Dr.ª Pesquisadora da Embrapa Trigo – Área: Controle de qualidade, certificação e rastreabilidade.

² Eng. Agr.º PhD Pesquisador da Embrapa Trigo – Área: Fitopatologia, simulação e modelagem.

³ Eng. Agr.º Dr. Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Área: Fitopatologia

⁴ Méd. Veterinário Dr.º Professor da UFSM e Coordenador do LAMIC – Área: Micotoxicologia.

⁵ Méd. Veterinário Dr.º Professor da UFSM e Assessor Científico do LAMIC – Área: Micotoxicologia.

⁶ Eng. Agr.ª Dr.ª Pesquisadora da Embrapa Trigo – Área: Fitopatologia.

⁷ Bel. Ciências da Comp., Dr. Professor da Universidade de Passo Fundo – Área: Simulação e modelagem.

TECHNICAL MANAGEMENT TO MINIMIZE MYCOTOXINS CONTAMINATION IN WHEAT

Abstract

Mycotoxins are products of secondary metabolism of toxigenic fungi that could infect and/or colonize cereals and by-products during production and post-harvest, becoming one of the current challenges in food production. In Southern Brazil, which concentrates 90% of wheat production, the occurrence of rainfall during the flowering and grain filling periods, promotes the incidence of fungal diseases. Wheat scab caused by *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) is of great concern due to reduction in grain yield and mycotoxin contamination, leading to rejection or devaluation of wheat in the market. This technical document summarizes information about the scab and major mycotoxins in wheat, with a focus on field disease management, mycotoxins sampling and quantification procedures, in order to reduce the risk of wheat contamination and to meet the legislation requirements. The adoption of good field control practices, as well as, the use of appropriate methods of sampling and detection in post-harvest, can contribute to minimize the risk of consumer exposure and the impact of these contaminants on human and animal health.

INTRODUÇÃO

O trigo contribui com aproximadamente 30% da produção global de grãos destinada à elaboração de produtos alimentícios para humanos e animais e não alimentícios, como a geração de energia renovável.

O controle de qualidade para garantir alimentos seguros no momento do consumo humano ou animal, é questão prioritária em todas as cadeias produtivas. Para o trigo, a presença de contaminantes químicos como resíduos de agrotóxicos e micotoxinas é visualmente imperceptível no produto final e um dos atuais desafios na produção de alimentos com qualidade.

Micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos toxigênicos que infectam e/ou colonizam os grãos e seus subprodutos, especialmente os cereais no período de cultivo e/ou de armazenamento. No campo, fungos do gênero *Fusarium* estão associados à causa da doença conhecida como giberela em trigo, cevada e outros cereais. Já em grãos armazenados espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são os fungos toxigênicos de maior relevância. As micotoxinas são quimicamente estáveis e, raramente, sofrem degradação durante o armazenamento dos grãos e o processamento do alimento, mesmo a panificação sob altas temperaturas.

Com a intensificação do monitoramento da contaminação de grãos e subprodutos por micotoxinas e o maior conhecimento de seus efeitos maléficos, os limites máximos tolerados em normativas de vários países são cada vez mais restritivos. O impacto dessa medida, que pode resultar em prejuízos na cadeia produtiva, visa assegurar que os alimentos produzidos com a matéria prima não apresentem contaminantes acima dos níveis aceitáveis. Assim, torna-se necessária a adoção de práticas de manejo da cultura e controle da doença no campo, bem como na pós-colheita, que contribuam para minimizar o risco de contaminação. Para o monitoramento, torna-se necessário utilizar metodologias de baixo custo, rápida execução e confiáveis para a quantificação de micotoxinas que permita segregar adequadamente os lotes contaminados.

No Brasil, recentemente foi implementada uma legislação específica para micotoxinas em grãos de diversos cereais, incluindo o trigo, a qual determina o limite máximo tolerável (LMT) em grãos e diversos subprodutos (ANVISA, 2011). Para trigo, a micotoxina deoxinivalenol (DON) é a que apresenta a maior relevância devido a sua ocorrência comum nas principais regiões produtoras, incluindo-se o Brasil.

Este documento técnico sumariza informações sobre o problema da contaminação com micotoxinas, associado à ocorrência da giberela, no contexto da produção nacional de trigo com foco na indicação de práticas de manejo da doença no campo e de métodos de amostragem, detecção e de quantificação de micotoxinas, visando atender a demanda da legislação e contribuir para a produção de alimentos seguros à base de trigo no Brasil.

CARACTERIZAÇÃO DA GIBERELA DO TRIGO

SINTOMAS DA DOENÇA

Os sintomas da giberela em trigo podem ser percebidos visualmente nas espigas 4 a 5 dias após a ocorrência de condições climáticas favoráveis. Os sintomas típicos são espiguetas despigmentadas, coloração esbranquiçada ou cor de palha, que contrastam com o verde normal de espiguetas saudáveis, e aristas retorcidas (Figura 1A e 1B). Em espiguetas atacadas, quando formados, os grãos são de tamanho reduzido, chochos e enrugados, por vezes com pigmentação rosada, característica do micélio do fungo (Figura 1C).

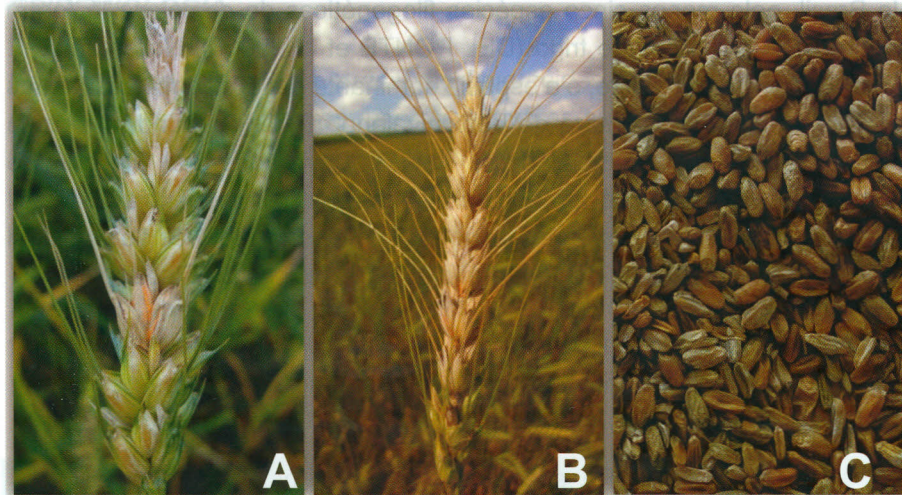


Figura 1. Sintomas e sinais de giberela em espigas e grãos de trigo. A= sinais do patógeno no terço inferior da espiga; B= espiga com 80% de severidade de giberela; C= grãos danificados por ocasião da ocorrência de giberela na espiga.

Fotos: Casiane Salete Tibola.

AGENTE CAUSAL

A giberela do trigo é causada pelo fungo *Fusarium graminearum*, também conhecida pelo nome da sua fase sexuada, *Gibberella zeae*. Estudos recentes sobre a filogenia de *F. graminearum* mostraram a existência de espécies filogeográficas, constituindo o complexo de espécies de *Fusarium graminearum*. Embora sem diferenças morfológicas, podem variar quanto às características de patogenicidade e potencial toxigênico (O'DONNELL et al., 2004). No segundo caso, o conhecimento do potencial toxigênico das populações regionais do patógeno é chave na definição das micotoxinas que devem ser alvo no monitoramento.

No Brasil, pelo menos cinco espécies filogenéticas do complexo já foram encontradas em grãos de trigo (DEL PONTE et al., 2013). No entanto, *F. graminearum sensu stricto*, é a espécie dominante em 90% dos isolamentos e, potencialmente, produtora de deoxinivalenol (DON), segundo métodos moleculares para a detecção de genes envolvidos na síntese de tricotecenos. Outras espécies encontradas em menor frequência no Brasil são *F. meridionale* e *F. cortaderiae*, potencialmente produtoras de nivalenol (NIV) (SCOZ et al., 2009; ASTOLFI et al., 2012; DEL PONTE et al., 2013).

CICLO DA DOENÇA

O fungo sobrevive no período da entressafra colonizando restos culturais em decomposição de várias plantas. Nesses, forma estruturas da fase sexual, os peritécios, que produzem ascósporos, o principal propágulo infectivo para as epidemias. Os ascósporos são formados, liberados e dispersos no ambiente atmosférico em função de fatores ambientais como temperatura, umidade relativa do ar e vento durante o cultivo. Em contato com as espigas em início de florescimento, especialmente os tecidos das anteras, os ascósporos germinam e o tubo germinativo penetra no hospedeiro sob condições de molhamento por, pelo menos, 30 horas consecutivas e temperatura do ar entre 15 e 30 °C. A partir daí ocorre a colonização com senescência prematura dos tecidos da espiga (Figura 1A e 1B). As infecções também podem ocorrer mais tardiamente, durante a fase de enchimento dos grãos, contribuindo assim para os níveis de micotoxinas em lotes de grãos aparentemente sadios. Perdas no rendimento ocorrem devido ao fato que os grãos colonizados pelo fungo são pequenos, enrugados e chochos (Figura 1C), especialmente quando infectados no início da floração. Onde há regulamentação para níveis máximos tolerados de micotoxinas, o lote é rejeitado ou desvalorizado, causando perda econômica direta ao produtor.

EPIDEMIOLOGIA

Epidemias de giberela no Brasil são favorecidas pela presença constante do inóculo ao longo do ano, uso de cultivares suscetíveis e condições de temperatura e umidade do ar normalmente favoráveis à doença no período da primavera. A giberela do trigo passou de doença secundária à de importância primária no Brasil, a partir da década de 1990, fato que tem sido associado a: 1. mudanças na constituição genética das cultivares; 2. intensificação do uso do plantio direto cuja palhada na superfície serve de fonte de inóculo para o patógeno; e, 3. maior frequência de anos com clima mais favorável à doença no período do florescimento da cultura, comparado às décadas anteriores (DEL PONTE et al., 2009).

Os fatores determinantes da ocorrência da giberela são as condições meteorológicas por ocasião do espigamento da cultura e o nível de resistência das cultivares.

ESTRATÉGIAS DE MANEJO DE GIBERELA

As estratégias de manejo da giberela incluem a adoção de práticas que podem ser enquadradas em controle genético, químico e cultural. Milhares de linhagens de trigo tem sido avaliadas quanto à sua reação à giberela, ao redor do mundo. No entanto, até o momento ainda não foram obtidos materiais comerciais que conferem resistência em níveis satisfatórios à doença e que dispense o uso de outras práticas. Entretanto, mesmo com resistência parcial é importante a adoção destas cultivares, pois contribuem para minimizar a perda de rendimento e o acúmulo de micotoxinas nos grãos (WISNIEWSKA & KOWALCZYK, 2005), além de diminuir a dependência de fungicidas.

O controle químico tem sua importância aumentada no manejo integrado da giberela, uma vez que diversos fungicidas tem sido avaliados e indicados

para o controle efetivo da doença em aplicações no período do florescimento pleno, seja com base em calendário ou sob condições de risco de ocorrência da doença. Atualmente, os produtos com maior eficiência média no controle se enquadram no grupo dos triazóis, tais como a misturas de dois triazóis (prothioconazole + tebuconazole) ou triazóis aplicados isoladamente, com destaque para metconazole, com maior eficiência na redução da micotoxina DON (PAUL et al., 2008). No Brasil, diversos estudos evidenciaram a eficiência de fungicidas dos grupos dos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas no controle da doença (redução da incidência e severidade), ao longo da última década, com valores médios de eficiência variando de 45 a 75% (PICININI & FERNANDES, 2001; PANISSON et al., 2002; CASA et al., 2007).

Recentemente, Spolti et al. (2013), avaliaram a eficiência de metconazole isoladamente ou em misturas comerciais com piraclostrobina, com variação no número de aplicações e doses, no controle da doença, produtividade e níveis de micotoxinas. Em quatro ensaios de campo, os autores observaram que duas aplicações de fungicidas (na antese e 10 dias após) em cultivares suscetíveis, resultaram em controle mais eficiente da doença comparado a uma aplicação em cultivares moderadamente resistentes. No entanto, não houve consistência nos resultados de produtividade e redução das micotoxinas DON e NIV, o que pode estar relacionado à complexidade da interação de diversos fatores como o princípio ativo utilizado, o momento e número de aplicações, a tecnologia de aplicação, além da variabilidade da população local de *F. graminearum* e condições ambientais entre o florescimento e a colheita, as quais influenciam nos níveis de micotoxinas. Mais estudos de campo são necessários para se indicar a melhor estratégia de uso e o benefício das aplicações de fungicidas na prevenção da contaminação por micotoxinas.

Quanto à tecnologia de aplicação, estudos no Brasil têm mostrado que a qualidade da deposição do produto pode ser otimizada em função da escolha do melhor momento para a pulverização, quantidade de calda de fungicida que chega ao alvo (faces laterais das espigas), regulagem do pulverizador para gotas finas (150-250 μm) e muito finas (<150 μm) e, pelo direcionamento do jato de pulverização na perpendicular à lateral da

espiga, para frente e para trás em relação ao deslocamento, para obter maior cobertura e homogeneidade de aplicação do fungicida (BRUSTOLIN et al., 2011).

Quanto ao controle cultural, o manejo de resíduos e a rotação de culturas tem sido indicado em alguns países para reduzir os níveis de inóculo do patógeno. Porém, esta estratégia pode não ser efetiva nas condições de cultivo do sul do Brasil, pois há abundância de resíduos na região em função da manutenção de restos culturais em decomposição na superfície do solo, os quais constituem a fonte de um tipo inóculo (ascósporos) que tem alta capacidade de dispersão na atmosfera. Outra medida que pode contribuir no manejo da doença é o escalonamento da semeadura, uma vez que condições de ambiente favorável à doença podem ocorrer em períodos específicos, quando parte das lavouras não se encontra na fase suscetível, atuando dessa forma, como um mecanismo de escape à doença.

Dentre as estratégias disponíveis, para o manejo da giberela, indica-se: 1. seleção de cultivares com maior resistência à giberela; 2. escalonamento da semeadura; e 3. aplicações de fungicidas no florescimento pleno, sob condições de risco climático.

CRITÉRIOS INDICADORES PARA USO DE FUNGICIDAS

A aplicação de fungicidas segue basicamente dois critérios: 1. o preventivo, em que se planeja uma aplicação fixa no florescimento pleno ou duas aplicações, a segunda dez dias após a primeira; ou 2. com base em informações de risco de ocorrência da doença. No segundo caso, destacam-se os sistemas de alerta que utilizam informações meteorológicas para o cálculo do risco de doença e o momento mais indicado para aplicações de fungicidas. Além do alerta para indicar a necessidade e momento de aplicação de fungicidas, modelos matemáticos de predição da doença, quando acoplados à sistemas de informação geográfica, permitem mapear as regiões de risco de ocorrência de micotoxinas, auxiliando na segregação de lotes ainda antes da colheita.

Diversos modelos que predizem o risco da giberela ou de níveis de DON foram desenvolvidos no Brasil e nas principais regiões produtoras de trigo no mundo. Via de regra, os modelos utilizam informações meteorológicas como temperatura e umidade relativa do ar e chuva, além de variáveis agrônômicas como nível de resistência da cultivar e cultivo anterior na área (DEL PONTE et al., 2004; PRANDINI et al., 2009).

No Brasil, a plataforma SISALERT:TRIGO (<http://www.sisalert.com.br>) permite simular o risco de giberela para lavouras de trigo da Região Sul do Brasil a partir da informação da data de início de espigamento (Figura 2). A simulação é feita com dados meteorológicos observados em tempo real e também com o prognóstico do tempo para os próximos cinco dias. A simulação pode ser feita para um local específico, por meio da seleção, pelo usuário, do município em que se localiza a lavoura, ou também para o estado, pois é gerado um mapa de risco para a data de espigamento selecionada pelo usuário.

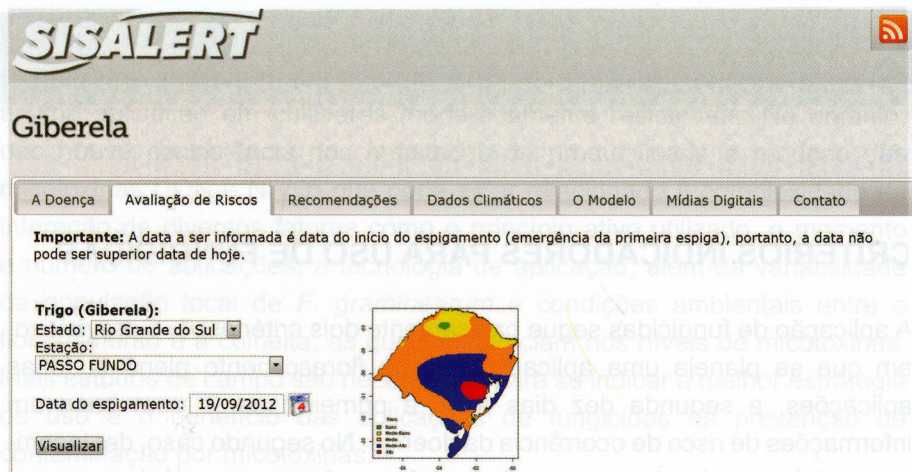


Figura 2. Tela do sistema SISALERT:TRIGO, mostrando a simulação de cinco categorias de risco para o estado do Rio Grande do Sul considerando 19 de setembro de 2012 como a data de início do espigamento da lavoura.

MICOTOXINAS NO TRIGO

Os relatos encontrados na literatura sobre micotoxinas em amostras comerciais de trigo produzido no Sul do Brasil, indicam que DON e ZEA são as micotoxinas monitoradas mais frequentemente e com concentração média, usualmente, inferior aos limites estabelecidos na legislação, porém com ampla variação entre lotes. As Figuras 3 e 4 apresentam os níveis de DON e ZEA, respectivamente, detectados em quatro safras consecutivas (2009 a 2012) em estudos de monitoramento conduzidos pela Embrapa Trigo, com amostras de grãos obtidas na região Sul do Brasil.

Em safras com severa epidemia de giberela, como ocorrido em 2009, os níveis de DON, excederam os limites máximos tolerados pela legislação, em 47, de 119 amostras analisadas. Nesse ano, o excesso de umidade do ar, bem como elevado número de dias com chuva e/ou encobertos (precipitação acumulada no período de 15 de setembro a 15 de outubro foi de 334 mm), determinaram uma condição ambiente de baixa luminosidade, que favoreceu o aparecimento de giberela no trigo (PASINATO & CUNHA, 2009).

A média de 1686 ppb de DON detectada em 81% de 545 amostras analisadas (Figura 3) foi semelhante aos relatos de outros estudos conduzidos na região sul do Brasil. Santos et al. (2013), avaliaram a concentração de DON em 113 amostras de trigo do Paraná, das safras 2008 e 2009, e relataram presença de DON em 66,4% das amostras analisadas, com média de 1894 ppb e nível máximo de 4732 ppb. Del Ponte et al. (2012), analisaram amostras de grãos comerciais de trigo de 2006 a 2008 e observaram valor médio de 540 ppb e máximo de 2700 ppb para DON, além do relato da presença simultânea de DON e NIV em 59 das 66 amostras avaliadas.

A micotoxina ZEA foi detectada em 31% das 396 amostras analisadas entre 2009-2012, com média de 317 ppb. Na safra 2009, ZEA foi detectada em 67% das amostras, com amplitude de 20 a 2960 ppb (Figura 4).

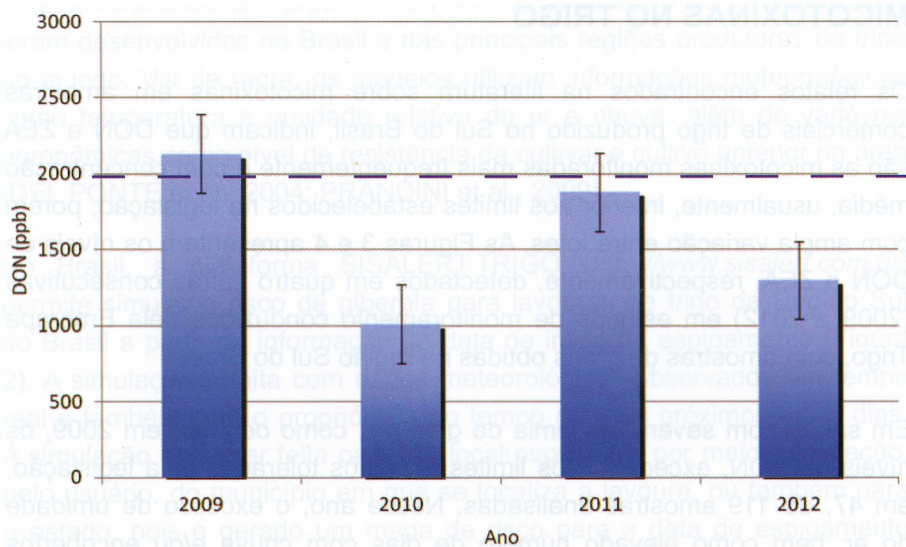


Figura 3. Concentração de deoxinivalenol (DON) em 545 amostras de trigo provenientes da região Sul do Brasil, no período 2009 a 2012. A linha tracejada representa o limite máximo tolerado (2012-2013), para trigo destinado à alimentação humana no Brasil.

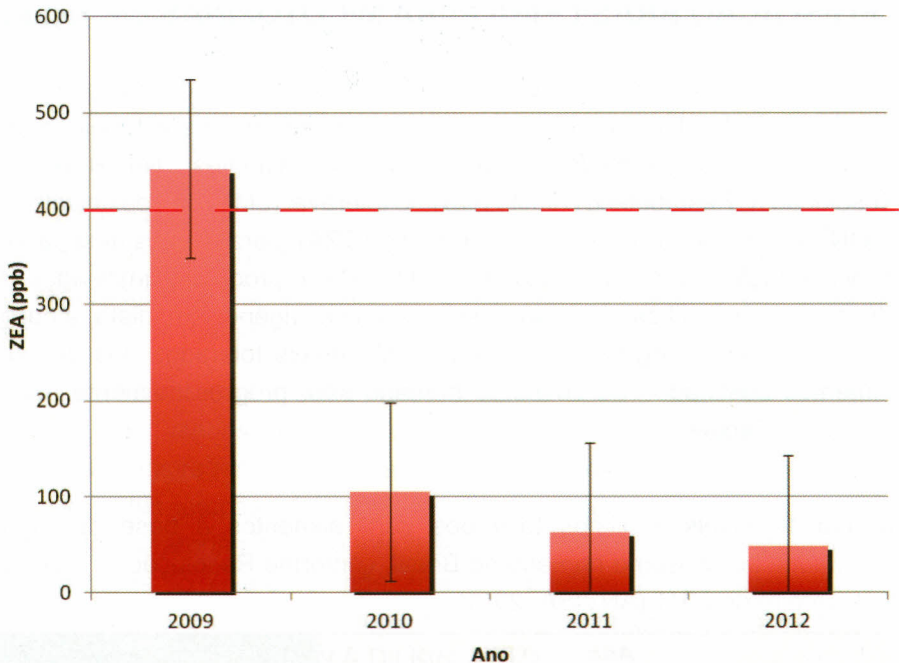


Figura 4. Concentração de zearalenona (ZEA) em 396 amostras de trigo provenientes da região Sul do Brasil, no período 2009 a 2012. A linha tracejada representa o limite máximo tolerado (2012-2013), para trigo destinado à alimentação humana no Brasil.

Na etapa de pós-colheita, a deterioração de grãos por fungos é favorecida pela alta umidade e temperatura na massa de grãos, armazenamento prolongado e grãos danificados. Estas condições favorecem também a proliferação de insetos-pragas, que além dos danos diretos nos grãos, são vetores de fungos que podem produzir micotoxinas. A ocratoxina A (OCRA) é uma das micotoxinas mais comuns na pós-colheita. Duarte et al. (2010), revisaram os efeitos de etapas de beneficiamento e de processamento de produtos derivados de cereais na distribuição e composição química de OCRA.

LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MICOTOXINAS EM TRIGO

Para proteger a saúde humana e animal dos efeitos tóxicos das micotoxinas, bem como defender interesses econômicos, muitos países estabeleceram níveis máximos permitidos para estes contaminantes. No Brasil, a Resolução n. 7 estabelece o limite máximo tolerável (LMT) de deoxivalenol (DON), zearalenona (ZEA) e ocratoxina A (OCRA), para cereais destinados à alimentação humana (ANVISA, 2011). Para produtos destinados à alimentação infantil os níveis são menores e com vigência imediata, a partir da publicação da legislação (Tabela 1). Os níveis tolerados nos demais alimentos destinados ao consumo humano são, progressivamente, mais restritivos (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis máximos tolerados para alimentos a base de trigo, destinados ao consumo humano no Brasil, conforme Resolução n. 7 de 18 de fevereiro de 2011 (ANVISA, 2011).

Ano		2011	2012	2014	2016
Micotoxina	Produto	LMT (ppb)	LMT (ppb)	LMT (ppb)	LMT (ppb)
Deoxivalenol	Alimentação infantil	200	-	-	-
Zearalenona		20	-	-	-
	Trigo em grãos	-	-	3000	-
Deoxivalenol	Trigo integral e farelo	-	2000	1500	1000
	Produtos derivados de trigo: farinha, massa, crackers, biscoitos e pão	-	1750	1250	750
	Trigo integral e farelo	-	400	400	200
Zearalenona	Produtos derivados de trigo: farinha, massa, crackers, biscoitos e pão	-	200	-	100
Ocratoxina A	Produtos derivados de cereais	-	10	-	-
Ocratoxina A	Cereais em grãos	-	-	20	-

(-) não determinado.

AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS

A distribuição heterogênea dos níveis de micotoxinas em lotes de cereais é um dos problemas enfrentados durante amostragem. De maneira geral, não há uma correlação consistente entre os níveis de grãos danificados por giberela e a concentração de micotoxinas. A inconsistência entre a presença de sintomas de giberela e a concentração de micotoxinas, dificulta a segregação prévia de lotes de grãos, gerando grande demanda por análises pelos métodos de detecção direta.

Para assegurar que a amostra destinada à análise seja representativa, devem ser usadas técnicas de amostragem apropriadas. De forma geral, a amostragem de cereais para análise de micotoxinas deve seguir as seguintes etapas: 1. várias amostras pequenas (incrementos) são coletadas aleatoriamente do lote e somadas para formar amostra coletiva; 2. a amostra coletiva é homogeneizada e reduzida (≥ 2000 gramas); e 3. a amostra coletiva reduzida é homogeneizada, retirando-se amostra final ou de laboratório (MALLMANN & DILKIN, 2007).

A União Européia emitiu documento orientador para amostragem de cereais para quantificar micotoxinas (EUROPEAN COMISSION, 2010), com finalidade de tornar mais práticas e factíveis exigências do Regulamento 401/2006 (EUROPEAN COMISSION, 2006). No Brasil, a amostragem de trigo é regulamentada pela Instrução normativa nº 38 (BRASIL, 2010), a qual especifica o número de pontos de amostragem e a quantidade de amostras que devem ser destinadas às análises laboratoriais. Entretanto, independente da situação, um plano amostral deve ser seguido respeitando-se padrões operacionais.

A coleta de amostras de cereais para análise de micotoxinas pode ser realizada por método manual ou automático. Os equipamentos recomendados para a coleta manual consistem de pás, conchas de bordos retangulares, caladores ou equipamentos pneumáticos compatíveis com o tamanho do lote e partículas do material amostrado. A amostragem automática, segundo Mallmann e Dilkin (2007), é mais prática e eficiente e, consiste em movimentar os grãos através de rosca transportadora. Os

incrementos (grãos) são coletados através de perfurações efetuadas nas tubulações.

De acordo com Whitaker (2003), o erro analítico associado à amostragem pode ser reduzido pela diminuição da granulometria média da amostra, através da moagem e aumento do tamanho da amostra, quando soma-se número maior de incrementos. Mallmann et al. (2013), avaliaram a eficiência de métodos de amostragem manual e automático para análise de fumonisinas em 11 lotes de milho. A amostragem manual foi realizada na massa de grãos inteiros, utilizando calador graneleiro com 10 câmaras coletoras; enquanto a automática, denominada Amostragem Automática em Fluxo Contínuo (AAFC), foi realizada na massa de grãos moídos, através de perfurações efetuadas na rosca transportadora. Na AAFC, obtiveram-se resultados inferiores ($P < 0,01$) de variância (22,6 ppb) e do coeficiente de variação total (6,37%), quando comparados com a variância (68,5 ppb) e coeficiente de variação total do plano de amostragem manual em grãos inteiros (8,94%). Portanto, a AAFC foi mais eficiente na determinação de fumonisinas em milho.

Independente do método de coleta empregado, o volume de amostra deve representar todo o lote. A homogeneização também é indispensável, podendo ser realizada em misturador em “Y” ou quarteador. Na falta destes equipamentos, utilizar sistema de redução de amostras em cruz. Após a coleta, o material deve ser embalado, lacrado e mantido em condições que permitam manutenção de suas características até a chegada no laboratório de análise.

Considerando a relevância da etapa de amostragem no monitoramento de micotoxinas foram resumidas, a seguir, as indicações descritas em várias metodologias. As indicações específicas para amostragem de trigo, em cada etapa da produção e pós-colheita, foram compiladas a partir dos seguintes documentos: Testing... (1999), Manual... (2001), Pichler (2008), Brasil (2010), European Commission (2010), Guidelines... (2010) e Sampling... (2010). No quadro ‘como obter amostra representativa’ foram descritas informações de caráter geral. Na sequência, as indicações estão organizadas por: amostragem mecânica em lavouras comerciais;

amostragem em parcelas experimentais: mecânica e manual; amostragem em meios de transporte; e amostragem no armazenamento.

COMO OBTER AMOSTRA REPRESENTATIVA

- utilizar equipamentos adequados, como sonda ou calador para grãos estacionários; amostrador mecânico desviador, amostrador tipo “pelicano” ou amostragem automática (AAFC) para grãos em movimento;
- utilizar padrões e procedimentos de amostragem projetados para coletar amostras de todas as áreas (pontos) do lote, para obter representatividade na amostra final.
- retirar impurezas que possam interferir nos resultados;
- utilizar separador de grãos (quarteador) ou "Y";
- ter o tamanho apropriado para representar todo o lote, sendo de no mínimo 1000 g. Como recomendação geral, a amostra deve ser obtida de acordo com a fórmula:

$$\sqrt{20 \times T(\text{toneladas})}$$

Exemplo: para um lote de 100 toneladas, coletar 45 kg de grãos (amostra coletiva).

- ser devidamente identificada e rotulada na embalagem; e
- manusear de modo a manter a representatividade, armazenadas em local fresco e seco, encaminhadas em sacos de papel de revestimento duplo ou triplo ou sacos de tecido que permitam trocas gasosas; evitar o acondicionamento de amostras em sacos plásticos, que podem promover o crescimento de fungos, em condições de alta umidade e temperatura do ar.

INDICAÇÕES PARA AMOSTRAGEM MECÂNICA EM LAVOURAS COMERCIAIS

1. Obter uma amostra representativa, combinando 2000 a 2500 g de grãos, coletadas em vários pontos (mínimo 4) no lote de grãos.
2. Limpar a amostra para remover impurezas e materiais estranhos. No caso de determinar o impacto de manejos adotados na produção no acúmulo de micotoxinas, a amostragem deverá ser efetuada antes da limpeza, utilizando integralmente os grãos colhidos.
3. Obter aproximadamente 200 g de amostra utilizando um separador de grãos.
4. Enviar as amostras ao laboratório de análises.

INDICAÇÕES PARA AMOSTRAGEM EM PARCELAS EXPERIMENTAIS

AMOSTRAGEM DE PARCELAS COLHIDAS MECANICAMENTE

1. Colher a parcela, adotando baixo fluxo de ar da colhedora para reter o grão mais leve, potencialmente danificado por giberela;
2. Obter amostra de 200 g, utilizando separador de sementes;
3. Limpar a amostra manualmente ou com equipamento de limpeza de grãos;
4. Enviar as amostras a laboratório de análises.

AMOSTRAGEM DE PARCELAS COLHIDAS MANUALMENTE

1. Escolher porção da linha de semeadura homogênea (sem falhas no estande);
2. Coletar todas as espigas em aproximadamente 2,00 m, na sequência da linha de semeadura;

3. Selecionar 100 espigas de maior tamanho e uniformes;
4. Trilhar as espigas em conjunto em trilhadeira elétrica estacionária ou manualmente. A entrada de ar na máquina deve ser reduzida, visando retenção total de grãos;
5. Enviar as amostras a laboratório de análises.

Quando a sub-amostragem é realizada em lotes maiores, recomenda-se obtenção de amostra representativa, utilizando separador de grãos.

INDICAÇÕES PARA AMOSTRAGEM EM MEIOS DE TRANSPORTE

1. Coletar amostras em pontos uniformemente distribuídos, em todas as profundidades da carga, no mínimo 2000g, respeitando a fórmula: respeitando a formula:

$$\sqrt{20 \times T(\text{toneladas})}$$

2. Até 15 toneladas amostrar cinco pontos; de 15 a 30 toneladas, amostrar oito pontos; e a partir de 30 toneladas amostrar 11 pontos;
3. Enviar as amostras a laboratório de análises.

INDICAÇÕES PARA AMOSTRAGEM NO ARMAZENAMENTO

1. Coletar amostras em equipamentos de movimentação de grãos (carga, descarga ou transilagem) em tamanho que respeite a formula:

$$\sqrt{20 \times T(\text{toneladas})}$$

2. Esta amostra parcial deve ser homogeneizada e quarteada, antes de compor a amostra a ser analisada.
3. Enviar as amostras a laboratório de análises.

ARMAZENAMENTO E MOAGEM DE AMOSTRAS

As amostras recebidas no laboratório devem ser protocoladas e analisadas com rapidez. Em caso de armazenamento, utilizar câmara fria sob temperatura menor que 10°C e atividade de água (Aw) abaixo de 0,7. Antes da análise, acondicionar as amostras sob temperatura ambiente durante um a dois dias.

Triturar a amostra de modo que 95% das partículas passem por peneira de 20 mesh (diâmetro inferior a 1,0 mm); homogeneizar e analisar a amostra com a metodologia selecionada.

Na moagem, deve ser evitada contaminação cruzada de amostras, através da limpeza do moinho.

MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS

A legislação brasileira para micotoxinas determinou os níveis máximos toleráveis para DON, ZEA e OCRA em cereais e subprodutos (ANVISA, 2011). Consequentemente, para atender às exigências da legislação, proteger os consumidores de exposição ao risco, e estabelecer amplos programas de monitoramento e de boas práticas, milhares de amostras de trigo deverão ser analisadas, demandando assim por métodos rápidos, confiáveis e sensíveis para a quantificação de micotoxinas (LATTANZIO et al., 2009).

Os métodos disponíveis para análises de micotoxinas variam de qualitativos, que consistem em determinar a presença/ausência de determinada micotoxina (realizado na lavoura), aos métodos analíticos altamente precisos, capazes de quantificar níveis extremamente baixos de diferentes micotoxinas (GUIDELINES..., 2010). A maioria dos métodos preconiza em comum: amostragem, homogeneização, extração e purificação.

A separação e detecção de compostos de interesse geralmente é realizada através de técnicas imunoenzimáticas ou cromatográficas, seguidas

de métodos de detecção. Técnicas imunoenzimáticas baseiam-se na interação anticorpos e antígenos. O tipo mais comum é ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) que permite detecção por comparação visual de cores a métodos mais complexos, como espectrofotometria, amperometria e voltametria de pulso diferencial. Organizações como a AOAC International - Association of Analytical Communities e GIPSA - Grain Inspection, Packers & Stockyards Administration, executam validações de kits imunoenzimáticos para análise rápida de micotoxinas, a fim de verificar o desempenho e a reprodutibilidade dos testes (MENEELY et al. 2011; PERFORMANCE...,2013).

Anticorpos são altamente específicos. Entretanto, em compostos análogos, como micotoxinas, podem ocorrer reações cruzadas. Meneely et al. (2011), revisaram os principais métodos para análise de micotoxinas em alimentos, enfatizando que um dos requerimentos fundamentais em testes imunológicos é a especificidade do anticorpo, prevenindo a reação cruzada com outros constituintes da amostra. O método ELISA apresentou taxa de recuperação média de 73% a 104%, demonstrando sua eficiência e precisão para analisar deoxinivalenol, zearalenona, fumonisina (FUM) e toxina T-2 (T-2), em amostras de cereais (milho, trigo, cevada e aveia) (PLEADIN et al., 2013).

Wang et al. (2013), conduziram ensaio para detecção de ZEA e FUM B1 em amostras de milho, trigo e rações, utilizando método imunocromatográfico, e relataram níveis de detecção de 6 e 50 ng/ml, respectivamente. De acordo com os autores, as tiras imunocromatográficas permitiram adequada correlação entre métodos cromatográficos e kits comerciais ELISA, conferindo agilidade e economia na quantificação de micotoxinas em cereais. As tiras imunológicas quantificam micotoxinas através de leitora de reflectância. Este método é robusto, podendo ser utilizado na detecção de proteínas expressas por modificações genéticas em culturas de sementes/grãos, micotoxinas e patógenos. Tiras imunológicas também foram utilizadas para detecção de ocratoxina A em milho e trigo permitindo boa correlação com métodos cromatográficos (ANFOSSI et al., 2011). Enquanto métodos imunoenzimáticos necessitam anticorpos específicos para cada micotoxina, técnicas cromatográficas são capazes de separar ampla gama de analitos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) possui alta precisão e reprodutibilidade, mesmo com amostras com baixas concentrações de micotoxinas. Interferências nos resultados podem ser reduzidas a um mínimo, em comparação com outros métodos, em consequência da separação cromatográfica realizada antes da detecção. Devido à fluorescência de compostos como aflatoxinas e fumonisinas, a utilização de detectores de fluorescência associados à HPLC, tornou-se mais comum. Grande avanço na detecção de micotoxinas foi obtido com a associação da cromatografia líquida à detecção por espectrometria de massas (LC-MS) (CONTRERAS-MEDINA et al., 2013). Métodos envolvendo LC-MS foram pouco utilizados até a segunda metade dos anos 90, quando avanços na fonte de ionização e na interface entre zonas de pressão atmosférica e de vácuo aumentaram sua robustez, praticidade, seletividade, exatidão e compatibilidade com diferentes compostos em ampla faixa de polaridade. O potencial da LC-MS voltou a crescer com o surgimento da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS).

Os métodos cromatográficos envolvem procedimentos demorados e caros, demandam estrutura e pessoal treinado, fatores que limitam sua utilização em análises de rotina de grande volume de amostras (XU et al., 2010). Porém, tecnologias mais recentes, empregando LC-MS/MS, podem analisar 48 micotoxinas, especialmente as que se confundem com o deoxinivalenol como 3-Ac-DON e 15-Ac-DON, responsáveis por desvios nos resultados de outros métodos. Estes desvios são relevantes na implementação da legislação, por apresentarem resultados divergentes dos obtidos por laboratórios oficiais que utilizam métodos de referência, acreditados pela ISO 17.025, todas baseadas em HPLC. Assim, a LC-MS/MS tornou-se o instrumento analítico emergente e promissor na determinação de micotoxinas e seus metabólitos. Esta técnica multitoxinas inclui vantagens como menor limite de detecção, capacidade de gerar informações estruturais dos analitos, mínima exigência de tratamento da amostra e a possibilidade de cobrir ampla variedade de analitos de diferentes polaridades (BERTHILLER et al., 2007). Os métodos analíticos multitoxinas são preferencialmente recomendáveis, devido à ocorrência natural de diferentes micotoxinas na mesma matriz. A maior especificidade e sensibilidade da LC-MS/MS propicia o desenvolvimento de métodos que dispensam procedimentos de isolamento (clean-up) e/ou pré-

concentração, além de diminuir a necessidade de separação cromatográfica entre compostos.

Avanços na separação de compostos via cromatografia líquida bidimensional (LC-LC) e cromatografia rápida (UHPLC), levam a obtenção de resultados mais rápidos e seguros, projetando a LC-MS/MS como técnica preferencial para análises micotoxicológicas. Contudo, o futuro poderá estar no uso de técnicas não-invasivas como espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS – Near Infrared Spectroscopy) que não necessitam de preparo de amostra, possibilitam análises remotas e menos onerosas (MALLMANN et al., 2008).

Métodos baseados em espectroscopia (Infravermelho próximo - NIR) têm sido popularizados, especialmente devido a não-destrutividade, rapidez, preparação mínima da amostra e baixo custo (WILLIAMS, 2007). Estes métodos envolvem o estudo da correlação dos espectros da amostra com a concentração do componente de interesse, tal como determinado por método padrão de referência (ROSS; BETTGE, 2009). Recentemente, Pojić e Mastilović (2013), revisaram aplicações do NIRS para determinar a composição química de trigo, reportando informações aplicáveis do melhoramento genético à comercialização. Para micotoxinas em trigo, estudos estão sendo conduzidos para determinar os comprimentos de onda nos quais estes contaminantes respondem à energia irradiada (CONTRERAS-MEDINA et al., 2013). Todavia, a faixa de concentração relativamente baixa para micotoxinas limita a análise quantitativa via NIRS, inicialmente desenvolvida para quantificar compostos com maiores níveis de concentração. Maior exatidão de modelos de calibração pode ser obtida aumentando a faixa e distribuição de níveis/concentrações de DON no conjunto de amostras de calibração (DE GIROLAMO et al., 2009).

A determinação de níveis de DON através de NIRS, que analisa cada grão individualmente, demonstrou maior correlação com incidência e severidade de giberela, quando comparado com a determinação visual, usualmente utilizada em programas de melhoramento (PEIRIS et al., 2010). Beyer et al. (2010), relataram coeficiente de determinação de 0,84 para a relação entre conteúdo de DON obtido por dados de espectroscopia submetidos à regressão Partial least squares (PLS) e resultados de DON medidos

pelo método cromatográfico. De Girolamo et al. (2009), relataram que o equipamento FT-NIR é adequado para determinar DON em amostras de trigo (comum e durum), em níveis menores que os limites máximos estabelecidos pela legislação da Comissão Europeia em trigo não processado (1250 e 1750 ppb, respectivamente).

Inovações na área de espectroscopia incluem o desenvolvimento de equipamentos NIR com imagens hiperespectrais. Este conjunto de imagens espectrais e espaciais confere imagens tridimensionais, permitindo determinar parâmetros físicos e químicos em diferentes produtos. O equipamento NIRS hiperespectral apresentou resultados promissores na detecção de substâncias como palha, grãos danificados, plástico, grãos de outras espécies e demais impurezas (PIERNA et al., 2012). Com a utilização de câmara espectral portátil (400-1000nm) foi possível quantificar, com exatidão, os sintomas de giberela, em condições de campo, diretamente na espiga de trigo (BAURIEGEL et al., 2011). Estudos com resultados promissores foram conduzidos com o objetivo de validar a eficácia do NIR visível e hiperespectral na diferenciação de grãos de trigo saudáveis daqueles danificados por giberela (DELWICHE et al., 2011).

A associação de métodos rápidos com métodos de referência é altamente benéfica para a quantificação de micotoxinas na cadeia produtiva do trigo e de outros cereais. Métodos quantitativos rápidos podem viabilizar análise de grande volume de amostras (triagem), de forma econômica, contribuindo para orientar a logística e a segregação de lotes. No entanto, para fins legais ou em situações onde são requeridos resultados precisos, deve-se optar por técnicas capazes de quantificar diferentes níveis de micotoxinas com acurácia. Nesse sentido, é necessário que os laboratórios de ensaios, que realizam tais análises, disponham de controle de qualidade para demonstrar credibilidade nos resultados obtidos.

ESTRATÉGIAS PARA MANEJO DE MICOTOXINAS NA PÓS-COLHEITA

Para a prevenir a contaminação dos grãos e subprodutos por micotoxinas, na pós-colheita, é fundamental: adotar o manejo integrado de pragas (MIP); promover a rápida e eficiente secagem dos grãos no recebimento na unidade armazenadora; e estabelecer monitoramento sistemático, através de métodos eficazes e rápidos, que permitam orientar o manejo e logística dos lotes no recebimento na unidade armazenadora.

Os insetos-praga são importantes contaminantes de grãos, devido a sua relação direta com a proliferação de fungos e a produção de micotoxinas. Por outro lado, a presença de fragmentos de insetos, nos produtos finais, causa expressivos prejuízos para a cadeia produtiva, gerando perdas econômicas e a falta de credibilidade dos consumidores.

Na etapa de pós-colheita, os procedimentos de limpeza, aeração, descascamento superficial (debranning) e moagem influenciam a distribuição de micotoxinas, nas diferentes frações do trigo. O efeito destas etapas de beneficiamento e de processamento são muito variáveis, entretanto há uma tendência de minimizar as concentração de micotoxinas na farinha branca e concentrar no farelo de trigo.

Cheli et al. (2013), revisaram os efeitos de procedimentos de moagem na distribuição de micotoxinas nas frações de trigo, destacando que no caso de DON, comumente, o processo de moagem possibilita a redução de 50 a 70% da concentração na farinha branca. Por outro lado, no caso de farelo destinado a alimentação de animais, pode aumentar 150-340% os níveis de micotoxinas.

No caso de rações para animais, uma estratégia para reduzir a exposição dos animais às micotoxinas é a diminuição da sua biodisponibilidade pela inclusão de agentes ligantes de micotoxinas ou adsorventes. Esses aditivos para ração são a abordagem mais comumente utilizada para prevenir micotoxicoses em animais, reduzindo a absorção e a distribuição das micotoxinas. A principal vantagem dos adsorventes é a facilidade para adicionar à alimentação animal. Vários grupos de substâncias foram testados e utilizados para este fim, como silicatos de alumínio e, em particular, argila e minerais zeolíticos, são os grupos mais aplicados. Mallmann et al. (2006), conduziram trabalho para avaliar a eficiência de adsorventes disponíveis no mercado brasileiro, a partir de avaliações *in vitro* e *in vivo* em animais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para viabilizar a produção de alimentos seguros para os consumidores, quanto aos níveis de micotoxinas, é fundamental estabelecer um programa que tenha como base as boas práticas de manejo da giberela, o monitoramento de níveis de contaminantes através de amostragem e metodologia para quantificação adequadas, visando minimizar o risco de contaminação do trigo e atender a legislação vigente.

A segregação de lotes de trigo com base em resultados de análises quanto a presença de micotoxinas nos lotes de trigo, é um importante balizador gerando critérios claros para a comercialização e minimizando as perdas na etapa de pós colheita. Primeiro, pela segregação de produtos de acordo com sua qualidade e inocuidade otimizando a utilização da estrutura física para recebimento, secagem e armazenagem; e segundo, pela redução na devolução de cargas que não atendam ao padrão de diferentes mercados na comercialização, minimizando perdas e o alto custo de transporte e de logística.

É imperativo utilizar a melhor estratégia de controle para prevenir os riscos de contaminações, que atualmente constituem uma das principais barreiras na comercialização de alimentos. À medida que os governos determinam regulamentações mais rígidas para os níveis de micotoxinas nos alimentos e rações, torna-se necessário a adoção de estratégias de monitoramento e de manejo de giberela e de micotoxinas em trigo, segregando os lotes altamente contaminados, garantindo a comercialização de produtos de acordo com as especificações da legislação.

REFERÊNCIAS

- ANFOSSI, L.; D'ARCO, G.; BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; GIRAUDI, G. A lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A: Development of a single system for maize, wheat and durum wheat. **Food Control**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 1965-1970, 2011.
- ANVISA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Brasília, DF, 2011.
- ASTOLFI, P.; REYNOSO, M. M.; RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S. N.; ALVES, T. C. A.; TESSMANN, D. J.; DEL PONTE, E. M. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 61, n. 2, p. 289-295, 2012.
- BAURIEGEL, E.; GIEBEL, A.; GEYER, M.; SCHMIDT, U.; HERPPICH, W. B. Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyper-spectral imaging. **Computers and Electronics in Agriculture**, New York, v. 75, n. 2, p. 304-312, 2011.
- BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 33-37, 2007.
- BEYER, M.; POGODA, F.; RONELLENFITSCH, F. K.; HOFFMANN, L.; UDELHOVEN, T. Estimating deoxynivalenol contents of wheat samples containing different levels of *Fusarium*-damaged kernels by diffuse reflectance spectrometry and partial least square regression. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 370-374, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 38, de 30 de novembro de 2010. Regulamento Técnico do Trigo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1 mar. 2010. Seção 1.
- BRUSTOLIN, R.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Tecnologia de aplicação de fungicidas. In: SEMINÁRIO SOBRE GIBERELA EM CEREAIS DE INVERNO, 2011, Passo Fundo. **Coletânea de trabalhos...** Passo Fundo: Berthier, 2011. p. 253-264.
- CASA, R. T.; BOGO, A.; MOREIRA, E. Época de aplicação e desempenho de fungicidas no controle da giberela em trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1558-1563, 2007.
- CHELI, F.; PINOTTI, L.; ROSSI, L.; DELL'ORTO, V. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. **LWT - Food Science and Technology**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813002041>> Acesso em: 10 jun. 2013.
- CONTRERAS-MEDINA, L. M.; ESPINOSA-CALDERON, A.; DUARTE-GALVAN, C.; FERNANDEZ-JARAMILLO, A. A.; MUÑOZ-HUERTA, R. F.; MILLAN-ALMARAZ, J. R.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G.; TORRES-PACHECO, I. Characteristics of mycotoxin analysis tools for tomorrow. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M. (Ed.). **Aflatoxins - recent advances and future prospects**. [S. l.]: InTech, 2013. Chap. 14, p. 289-313. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/characteristics-of-mycotoxin-analysis-tools-for-tomorrow>> Acesso em: 4 abr. 2013.
- DE GIROLAMO, A.; LIPPOLIS, V.; NORDKVIST, E.; VISCONTI, A. Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR)

- spectroscopy. **Food Additives & Contaminants**, Part A, Abingdon, v. 26, n. 6, p. 907-917, 2009.
- DEL PONTE, E. M.; TESSMANN, D. J.; SPOLTI, P.; KUHNEM, P. R.; SILVA, C. N. Species identification, genetic diversity and phenotypic variation studies on the *Fusarium graminearum* complex populations from Brazil. In: ALCONADA, T. M.; CHULZE, S. N. **Fusarium head blight in Latin America**. Springer, 2013. No prelo.
- DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, London, v. 132, n. 2, p. 1087-1091, 2012.
- DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PAVAN, W.; BAETHGEN, W. E. A model-based assessment of the impacts of climate variability on *Fusarium* head blight seasonal risk in Southern Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 11/12, p. 675-681, 2009.
- DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R.; BERGSTROM, G. C. Giberela do trigo: aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 6, p. 587-605, 2004.
- DELWICHE, S.; KIM, M.; DONG, Y. *Fusarium* damage assessment in wheat kernels by Vis/NIR hyperspectral imaging. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, New York, v. 5, n. 2, p. 63-71, 2011.
- DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, Philadelphia, v. 27, p. 187-198, 2010.
- EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) 401/2006. Official Journal of the European Union, L 70, 12, 2006.
- EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document for the sampling of cereals for mycotoxins final version**. 2010. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>> Acesso em: 05 mar. 2013.
- GUIDELINES to minimise risk of *Fusarium* mycotoxins in cereals. 2 ed. [Stoneleigh]: HGCA, 2010. 8 p. Disponível em: <http://www.hgca.com/document.aspx?fn=load&media_id=6174&publicationId=3848>. Acesso em: 4 mar. 2013.
- LATTANZIO, V. M. T.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 758-768, 2009.
- MALLMANN, A. O.; MARCHIORO, A.; OLIVEIRA, M. S.; MINETTO, L.; WOVST, L. R. Da S.; RAUBER, R. H.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Dois planos de amostragem para análise de fumonisinas em milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 3, mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000300029>>. Acesso em: 4 mar. 2013.
- MALLMANN, C. A.; VASCONCELOS, T. G.; TYSKA, D.; MARTINS, A. C. **Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas**. 2010. 11 p. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/AMENA.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2013.
- MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micototoxicoses em suínos**. Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti Editora, 2007. 232p.

- MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. **Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas**. 2006. 20 p. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_criterios.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2013.
- MANUAL Sampling of Wheat and Other Whole: AACC international method 64-70A. In: APPROVED methods of the American Association of Cereal Chemists. 10 ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 2001.
- MENEELY, J. P.; RICCI, F.; EGMOND, H. P. V.; ELLIOTT, C. T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 192-203, 2011.
- O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; GEISER, D. M.; KISTLER, H. C.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 6, p. 600-623, 2004.
- PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Efeito da época, do número de aplicações e de doses de fungicida no controle da giberela em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 5, p. 489-494, 2002.
- PASINATO, A.; CUNHA, G. R. da. **Informações meteorológicas de Passo Fundo, RS: setembro de 2009. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009**. 5 p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 266). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co266.htm>. Acesso em: 05 jul. 2013.
- PAUL, P. A.; LIPPS, P. E.; HERSHAM, D. E.; MCMULLEN, M. P.; DRAPER, M. A.; MADDEN, L. V. Efficacy of triazole-based fungicides for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol control in wheat: A multivariate meta-analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 98, n. 9, p. 999-1011, 2008.
- PEIRIS, K. H. S.; PUMPHREY, M. O.; DONG, Y.; MAGHIRANG, E. B.; BERZONSKY, W.; DOWELL, F. E. Near-infrared spectroscopic method for identification of fusarium head blight damage and prediction of deoxynivalenol in single wheat kernels. **Cereal Chemistry Journal**, St. Paul, v. 87, n. 6, p. 511-517, 2010.
- PERFORMANCE verified mycotoxin test kits – effective 3/01/2013. Washington: GIPSA, 2013. 6 p. Disponível em: <http://www.gipsa.usda.gov/fgis/tech-servsup/metheq/GIPSA_Approved_Mycotoxin_Rapid_Test_Kits.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2013.
- PICHLER, E. Amostragem para micotoxinas - nos importamos o suficiente? 2008. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-micotoxinas/artigos/amostragem-micotoxinas-nos-importamos-t97/p0.htm>>. Acesso em: 07 mar. 2013.
- PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. **Efeito da época de pulverização com fungicidas sobre o controle de *Gibberella zeae* em trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 8 p. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico, 20).
- PIERNA, J. A. F.; VERMEULEN, P.; AMAND, O.; TOSSENS, A.; DARDENNE, P.; BAETEN, V. NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable substances in food and feed. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 117, p. 233-239, Aug. 2012.

- PLEADIN, J.; VAHČIĆ, N.; PERŠI, N.; ŠEVELJ, D.; MARKOV, K.; FRECE, J. Fusarium mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. **Food Control**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 49-54, July 2013.
- POJIĆ, M. M.; MASTILOVIĆ, J. S. Near infrared spectroscopy-advanced analytical tool in wheat breeding, trade, and processing. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 2, p. 330-352, 2013.
- PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; BATTILANI, P.; PIVA, G. Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 927-931, 2009.
- ROSS, A. S.; BETTGE, A. D. Passing the test on wheat end-use quality. In: CARVER, B. F. (Ed.). **Wheat science and trade**. Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2009. p. 455-493.
- SAMPLING grain for deoxynivalenol (DON) analysis: a researchers guide. Lexington: SCABUSA, 2010. 4 p. Disponível em: <http://scabusa.org/pdfs/ptt/researchers_grain-sampling-protocols.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2013.
- SANTOS, J. S. dos.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y. S.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; MIRANDA, M. Z. de.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Parana State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, London, v. 138, n. 1, p. 90-95, 2013.
- SCOZ, L. B.; ASTOLFI, P.; REARTES, D. S.; SCHMALE III, D. G.; MORAES, M. G.; DEL PONTE, E. M. Trichothecene mycotoxin genotypes of Fusarium graminearum sensu stricto and Fusarium meridionale in wheat from southern Brazil. **Plant Pathology**, London, v. 58, n. 2, p. 344-351, 2009.
- SPOLTI, P.; GUERRA, D. S.; BADIALE-FURLONG, E.; DEL PONTE, E. M. Single and sequential applications of metconazole alone or in mixture with pyraclostrobin to improve Fusarium head blight control and wheat yield in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 38, n. 2, p. 85-96, 2013.
- TESTING trucklots of barley and wheat for deoxynivalenol (DON). Washington: GIPSA, 1999. 17 p. Disponível em: <http://www.gipsa.usda.gov/fgis/insp_weigh/inspwgh/don.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2013.
- WANG, Y.-K.; SHI, Y.-B.; ZOU, Q.; SUN, J.-H.; CHEN, Z.-F.; WANG, H.; LI, S. Q.; YAN, Y.-X. Development of a rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B1 in corn, wheat and feedstuff samples. **Food Control**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 180-188, May 2013.
- WHITAKER, T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 233-237, 2003.
- WILLIAMS, P. Grains and seeds. In: OZAKI, Y.; MCCLURE, W. F.; CHRISTY, A. A. (Ed.). **Near-infrared spectroscopy in food science and technology**. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2007. p. 281-304.
- WISNIEWSKA, H.; KOWALCZYK, K. Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to Fusarium culmorum and powdery mildew. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 46, n. 1, p. 35-40, 2005.
- XU, Y.; HUANG, Z.-B.; HE, Q.-H.; DENG, S.-Z.; LI, L.-S.; LI, Y.-P. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of deoxynivalenol in wheat and maize. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 2, p. 834-839, 2010.

