

FUNGOS PRODUTORES DE DESOXINIVALENOL (DON) EM TRIGO E FRAÇÕES INDUSTRIAIS

MONICA T. K. HARA¹; BEATRIZ T. IAMANAKA²; CAMILA K. POSSARI²; GABRIELA MOITA²; MARTA H. TANIWAKI³

Nº 12239

RESUMO

O presente trabalho teve os seguintes objetivos: (i) identificar a micobiota do trigo; (ii) verificar os fungos produtores de desoxinivalenol (DON) e (iii) analisar a incidência desta toxina no trigo. Até o momento um total de 20 amostras de trigo, provenientes do Instituto Agronomico de Campinas (IAC), da Estação Experimental na cidade de Itapeva-SP foram analisadas. Destas amostras, 10 foram tratadas com piraclostrobina + epoxiconazol (Opera) no campo. A atividade de água das amostras não tratadas e tratadas variou de 0,570 a 0,721 e 0,601 a 0,645, respectivamente. As espécies de *Fusarium* spp. predominaram nas amostras não tratadas, a porcentagem de infecção variou de 0 a 76%. Nas amostras tratadas houve um decréscimo das espécies de *Fusarium* spp., a porcentagem de infecção variou de 0 a 44%, mas houve um aumento das espécies de *Alternaria* spp. e fungos dematiáceos comparando com as amostras não tratadas. A concentração de DON variou de 0,04 a 1,06 µg/g nas amostras não tratadas e de ND a 1,86 µg/g nas amostras tratadas. Pela média não foi verificada uma diferença aparente das amostras não tratadas com as tratadas na concentração de DON. Contudo pela mediana, pode-se notar claramente que houve uma redução na produção de DON no trigo tratado.

ABSTRACT

The present work had the following objectives: (i) to identify the wheat mycobiota; (ii) to verify fungi producin deoxynivalenol (DON) and (iii) to analyze the incidence of this toxin in wheat. Up to now, a total of 20 wheat samples, from the Campinas Agronomic Institute (IAC) experimental station in Itapeva-SP were analyzed. Out of these samples, 10 were treated with piraclostrobin + epoxiconazol (Opera) in the field. The water activity of non-treated and treated samples varied from 0.570 to 0.721 and 0.601 to 0.645, respectively. Species of *Fusarium* spp. predominated in non-treated samples, the percentage of infection varied from 0 to 76%. In treated samples a decrease of

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciência de Alimentos, ESALQ, Piracicaba-SP, monicahara@hotmail.com

² Colaborador: CCQA/ITAL, Campinas-SP.

³ Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

Fusarium species was observed and the percentage of infection varied from 0 to 44%. However an increase of *Alternaria* spp. and dematiaceous fungi was observed, compared to non-treated samples. The concentration of DON varied from 0.04 to 1.06 µg/g in non-treated samples and from ND to 1.86 µg/g in treated samples. From the average of DON concentration an apparent difference between non-treated and treated samples was not observed. However, from the median, a clear reduction of DON production in wheat can be noted.

INTRODUÇÃO

Desoxinivalenol (DON) é uma toxina produzida por *Fusarium graminearum* e possui vários efeitos dentre os quais: redução de consumo de alimentos, irritação na pele, diarreia, hemorragias múltiplas e efeitos imunossupressores. No Brasil, a Resolução - RDC No 7, de 18 de Fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011) dispõe sobre limites máximos tolerados para DON e serão aplicados de forma gradativa até 2016 a fim de que os setores possam se adequar. Segundo o informe da 5ª Reunião do comitê do CODEX sobre Contaminantes dos Alimentos (CCCF), existe a necessidade de se reunir mais dados sobre DON antes do Codex prosseguir com a elaboração de limites máximos para o mesmo (CODEX ALIMENTARIUS, 2011). Outro ponto considerado na reunião foi que estabelecer limites máximos para matérias-primas (trigo, milho e cevada) poderia criar uma restrição comercial sem necessidade pois o processo de moagem poderia reduzir consideravelmente a contaminação destes produtos por DON. Poucos estudos tem levado em conta a redução de DON durante o processamento, tendo como foco fatores que podem influenciar a sua degradação. Segundo BERGAMINI et al. (2010), dados publicados sobre tratamentos tais como moagem e panificação parecem ser conflitantes. Também é evidente que o comportamento de DON em estudos de laboratório, podem não refletir adequadamente o que ocorre em escala industrial (SCUDAMORE et al. 2009). Nestas condições um estudo detalhado sobre a presença de DON no trigo e os fungos produtores desta toxina poderá contribuir na elucidação do risco de consumir produtos a base de trigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 20 amostras de aproximadamente 200g, provenientes da estação experimental do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) na cidade de Itapeva-SP foi

analisado. Destas amostras, 10 foram cultivadas sem a presença de qualquer tipo de agrotóxico e outras 10 amostras foram tratadas com piraclostrobina + epoxiconazol (Opera) sendo duas aplicações de 0,750 ml/ha no campo.

Plaqueamento do trigo

Os grãos de trigo foram desinfetados superficialmente com 0.4% de solução de hipoclorito de sódio por 2 minutos e plaqueados (50 unidades diferentes de cada amostra de trigo, sendo 10 unidades por placa) em meio de cultura ágar Dicloran Cloronfenicol Peptona (DCPA). As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de grãos infectados conforme a metodologia de PITT & HOCKING (2009).

Isolamento dos fungos

Os fungos crescidos foram inoculados em placas divididas ao meio contendo os meios ágar Batata Dextrose Agar (PDA) e ágar Dicloran Cloronfenicol Peptona (DCPA). O meio PDA fornece uma coloração diferente para os fungos facilitando a identificação, e o meio DCPA estimula a esporulação. As placas foram incubadas a 25°C por 10 dias conforme a metodologia de PITT & HOCKING (2009). Para identificação dos fungos isolados, foram feitas lâminas para análise em microscópico e outros meios para identificação.

Atividade de água

As amostras foram colocadas no medidor de atividade de água Aqualab, modelo 3T (Decagon,USA). A atividade de água das amostras de trigo foram medidas em triplicata a 25°C \pm 1°C.

Teste de produção de DON pelas cepas de *Fusarium* spp

As cepas identificadas como *Fusarium* spp. foram testadas quanto a produção de DON de acordo com a metodologia de THRANE (1986). As cepas foram crescidas no meio ágar extrato de levedura sacarose (YESA) a 25°C por 7 dias. Após o crescimento um pedaço de micélio do meio de cultura foi recortado, seguindo a técnica de ágar-plug e aplicada na placa de cromatografia de camada delgada (CCD). Foi aplicado também 5µl do padrão de DON na placa para comparação. As placas foram desenvolvidas no solvente Tolueno: Acetona: Metanol (TAM 5:3:2). Após o desenvolvimento e secagem das placas, foi aplicado um spray contendo uma solução

de 20% de Cloreto de Alumínio em 60% etanol:água. As placas for observadas a luz ultravioleta de 365 nm.

Análise de DON no trigo

A análise de DON no trigo foi realizada conforme o teste Strip Quantitativo DON-V da VICAM (VICAM, Watertown, MA, EUA). Todos os materiais utilizados para essa extração foi obtido no kit do equipamento. Foram pesados 5 gramas de grãos de trigo moído e transferir para um tubo de extração. Foram adicionados 20 ml de água destilada no tubo e agitado no vortex por 1 minuto, em velocidade máxima. O extrato foi filtrado e coletado num frasco limpo.

Uma alíquota de 200µl do extrato da amostra filtrada foi transferida para um frasco (reservatório) da tira de DON-V. Foram adicionados 200µl de solução diluente DON-V agitado no vortex. Em seguida, 100µl de solução foram transferidos por gotejamento vertical para a abertura circular da tira DON-V. Após 4 minutos, ocorreu a revelação do teste, a tira DON-V foi inserida no leitor, com abertura circular voltada ao aparelho. Os resultados apareciam no visor do aparelho podendo ser impressos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade de água do trigo

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores de atividade de água (a_w) das amostras de trigo. A atividade de água das amostras não tratadas e tratadas variou de 0,570 a 0,721 e 0,601 a 0,645, respectivamente. Este nível de a_w é segura para o armazenamento do trigo, pois as espécies de *Fusarium spp.* necessitam de uma a_w superior a 0.88 para desenvolver e produzir toxinas (PITT & HOCKING, 2009). Algumas espécies xerofílicas de *Eurotium spp.* podem se desenvolver em a_w inferior mas estas não são toxigênicas e não foram encontradas nestas amostras. De um modo geral o trigo estava bem armazenado e não mostrou sinais visíveis de deterioração.

Tabela 1. Atividade de água (a_w) das amostras de trigo não tratadas.

Identificação das amostras	Média da atividade de água	Variação da atividade de água
IAC 24	0,703	0,700 – 0,705
IAC 370	0,717	0,712 – 0,721
IAC 373	0,706	0,705 – 0,708
IAC 375	0,648	0,646 -0,652
IAC 380	0,658	0,652 – 0,667
IAC 381	0,637	0,634 – 0,642
IAC 385	0,637	0,631 – 0,646
IAC 387	0,582	0,582 – 0,582
IAC 388	0,571	0,570 – 0,572
IAC 1005	0,575	0,574 – 0,576

Tabela 2. Atividade de água (a_w) das amostras de trigo tratadas.

Identificação das amostras	Média da atividade de água	Variação da atividade de água
IAC 24	0,638	0,625 – 0,645
IAC 370	0,614	0,608 – 0,623
IAC 373	0,606	0,601 – 0,613
IAC 380	0,629	0,615 – 0,642
IAC 381	0,631	0,617 – 0,642
IAC 385	0,653	0,636 – 0,668
IAC 387	0,655	0,646 – 0,663
IAC 375	0,659	0,654 – 0,664
IAC 388	0,638	0,631 – 0,644
IAC 1005	0,633	0,630 – 0,637

Micobiota do trigo

As Tabelas 3 e 4 apresentam a porcentagem de infecção dos fungos nas amostras de trigo não tratadas e tratadas, respectivamente. As espécies de *Fusarium* (sp.1 e sp.2) predominaram nas amostras não tratadas (Tabela 3), a porcentagem de infecção destas espécies variou de 0 a 76%. Nas amostras tratadas (Tabela 4) houve um decréscimo das espécies de *Fusarium* (sp.1 e sp.2), a porcentagem de infecção variou de 0 a 44%, mas houve um aumento das espécies de *Alternaria* e fungos dematiáceos comparando com as amostras não tratadas.

As espécies de *Fusarium* infectam o trigo durante o crescimento da planta e continuam após a colheita, passando pelas etapas de secagem e armazenamento. As espécies de *Fusarium* são normalmente conhecidas por terem um papel patogênico em plantas causando uma série de doenças tais como apodrecimento do caule e enfraquecimento da raiz. As espécies de *Alternaria* e *Curvularia* e fungos dematiáceos são comuns no trigo. Estes três gêneros são considerados fungos que infectam as plantas e os grãos ainda no campo quando a atividade de água está bem alta.

Tabela 3. Número e porcentagem de infecção dos fungos nas amostras de trigo não tratadas.

Código das amostras	<i>Fusarium</i> sp.1	<i>Fusarium</i> sp.2	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	Fungos dematiáceos	Outros fungos
IAC 24	38 (76%)	0	2 (4%)	5 (10%)	4 (8%)	6 (12%)
IAC 274	19 (38%)	19 (38%)	2 (4%)	2 (4%)	5 (10%)	3 (6%)
IAC 370	9 (18%)	36 (72%)	5	2	0	3
IAC 375	13 (26%)	13 (26%)	2 (4%)	0	8 (16%)	2 (4%)
IAC 380	9 (18%)	9 (18%)	0	1 (2%)	16 (32%)	2 (4%)
IAC 381	12 (24%)	13 (26%)	0	0	18 (36%)	3 (6%)
IAC 385	16 (32%)	16 (32%)	0	0	9 (18%)	3 (6%)
IAC 387	15 (30%)	16 (32%)	1 (2%)	1 (2%)	10 (20%)	2 (4%)
IAC 388	12 (24%)	13 (26%)	2 (4%)	1 (2%)	14 (28%)	5 (10%)
IAC 1005	15(30%)	16 (32)	1 (2%)	2 (4%)	8 (16%)	0

Tabela 4. Número e porcentagem de infecção de fungos nas amostras de trigo tratadas.

Código das amostras	<i>Fusarium</i> sp.1	<i>Fusarium</i> sp.2	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	Fungos dematiáceos	Outros fungos
IAC 24t	8 (16%)	1 (2%)	23 (46%)	0	14 (28%)	2 (4%)
IAC 370t	18 (36%)	0	18 (36%)	4 (8%)	6 (12%)	3 (6%)
IAC 373t	19 (38%)	0	14 (28%)	0	14 (28%)	4 (8%)
IAC 375t	3 (6%)	18 (36%)	20 (40%)	3 (6%)	4 (8%)	4 (8%)
IAC 380t	3 (6%)	10 (20%)	18 (36%)	10 (20%)	5 (10%)	2 (4%)
IAC 381t	2 (4%)	22 (44%)	9 (18%)	0	15 (30%)	2 (4%)
IAC 385t	2 (4%)	5 (10%)	28 (56%)	0	12 (24%)	2 (4%)
IAC 387t	13 (26%)	6 (12%)	17 (34%)	3 (6%)	8 (16%)	2 (4%)
IAC 388t	6 (12%)	10 (20%)	7 (14%)	0	22 (44%)	5 (10%)
IAC 1005t	11 (22%)	10 (20%)	15 (30%)	0	10 (20%)	4 (8%)

Produção de DON pelas cepas de *Fusarium* spp e presença de DON no trigo

Nenhuma das cepas testadas de *Fusarium* spp. produziram DON no meio de cultura quando testadas no meio YESA, extraído com a técnica do agar plug.

Os resultados de DON nas amostras de trigo tratadas e não tratadas estão apresentados na Tabelas 5.

Tabela 5. Concentração de desoxinivalenol (DON) nas amostras de trigo não tratadas e tratadas.

Identificação das amostras não tratadas	Concentração de DON (µg/g)
IAC 24	0,05
IAC 370	1,06
IAC 373	0,03
IAC 375	0,35
IAC 380	0,12
IAC 381	0,26
IAC 385	0,33
IAC 387	0,19
IAC 388	0,04
IAC 1005	0,53
Média	0,269
Mediana	0,225
Identificação das amostras tratadas	
IAC 24	ND
IAC 370	0,12
IAC 373	0,10
IAC 375	0,01
IAC 380	ND
IAC 381	0,01
IAC 385	1,02
IAC 387	0,15
IAC 388	ND
IAC 1005	1,86
Média	0,297
Mediana	0,055

A concentração de DON variou de 0,04 a 1,06 µg/g nas amostras não tratadas e de ND a 1,86 µg/g nas amostras tratadas. Pela média não foi verificada uma diferença aparente das amostras não tratadas com as tratadas na concentração de DON. Contudo pela mediana, pode-se notar claramente que houve uma redução na produção de DON no trigo tratado. O controle de espécies de *Fusarium* é necessário devido à produção de micotoxinas como o DON, que se consumidos em grandes quantidades, são prejudiciais à saúde.

CONCLUSÃO

As espécies de *Fusarium* foram predominantes nas amostras de trigo não tratado, enquanto que as espécies de *Alternaria* e fungos dematiaceos foram predominantes nas amostras de trigo tratadas com piraclostrobina + epoxiconazol (Opera). Houve uma redução na produção de DON nas amostras tratadas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- BERGAMINI, E.; CATELLANIA, D.; DALL'ASTAB, C.; GALAVERNAB, G.; DOSSENAB, A.; MARCHELLIB, R.; SUMAN, M. Fate of *Fusarium* mycotoxins in the cereal product supply chain: the deoxynivalenol (DON) case within industrial bread-making technology. **Food Additives and Contaminants**, London, v.27, p. 677–687, 2010.
- BRASIL. RESOLUÇÃO - RDC Nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011. **Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**.
- CODEX ALIMENTARIUS. COMMITTEE ON CONTAMINANTS IN FOODS. Report of the fifth session of the Codex. The Hague, The Netherlands, 21 – 25 March 2011.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd ed. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York. 2009. 519p.
- SCUDAMORE, K.A.; HAZEL, C.M.; PATEL, S.; SCRIVEN, F. Deoxynivalenol and other *Fusarium* mycotoxins in bread, cake and biscuits produced from UK-grown wheat under commercial and pilot scale conditions. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 26, p.1191–1198, 2009.
- THRANE, U. Detection of toxigenic *Fusarium* isolates by thin layer chromatography. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, vol. 3, p. 93-96, 1986.