

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**UMA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRESENÇA DE
MICOTOXINAS E MICRO-ORGANISMOS TOXIGÊNICOS EM
INSUMOS E EM CERVEJAS ARTESANAIS**

Murilo D`Abruzzo Paix

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Profº Drº Edson Rodrigues Filho

Bolsista CAPES

SÃO CARLOS

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Murilo D'Abruzzo Paix, realizada em 06/12/2019:

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Edson R. Filho'.

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'João B. Fernandes'.

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Livia Soman de Medeiros'.

Prof. Dra. Livia Soman de Medeiros
UNIFESP

Agradecimentos:

Agradeço a minha família, pelo apoio emocional e financeiro durante a realização do projeto;

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pela paciência, orientação e conhecimentos compartilhados;

À Dra. Bianca Ferreira, por fornecer um dos equipamentos utilizados durante o projeto.

Aos colegas de LaBioMMi, pela ajuda com os equipamentos e pelos bons tempos passados durante a realização dos experimentos.

Aos órgãos de fomento, principalmente a CAPES, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Aos amigos da República Acasalar, pela parceria e convivência.

Ao trabalhador brasileiro, cujo pagamento de impostos proporciona grande parte do financiamento desse trabalho.

Abreviaturas

°C – grau Celsius

µg/g – micrograma/ grama

µL – microlitos

µL/ min – microlitos/ minutos

µm – micrometros

3HP – 3-hidroxipiridina

a.C. – antes de Cristo

AF - A – *Aspergillus flavus* - arroz

AF – *Aspergillus flavus*

AF - C – *Aspergillus flavus* – cevada

AF - M – *Aspergillus flavus* – milho

AFB1 – Aflatoxina B1

AFB2 – Aflatoxina B2

AFG1 -Aflatoxina G1

AFG2 – Aflatoxina G2

APCI – Atmospheric-pressure chemical ionization

atm – atmosfera

CHC – ácido – α-ciano-4-hidroxiciamico

CID – Collision -induced dissociation

CO₂ – Dióxido de carbono

Da – Dalton

DON – Deoxinivalenol

ELISA – Enzyme – Lyked Immunosorbent Assay

ESI – Electrospray ionization

FAO – Food and Agricultural Organization of United Nations

FB1 – Fumonisina B1

FB2 – Fumonisina B2

FB3 – Fumonisina B3

FG-728 - A - *Fusarium graminearum* 728 - arroz

FG-728 - C - *Fusarium graminearum* 728 – cevada

FG-728 - *Fusarium graminearum* 728

FG-728 - M - *Fusarium graminearum* 728 – milho

FG-729 - C - *Fusarium graminearum* 729 – cevada

FG-729 - *Fusarium graminearum* 729

FG-729 - M - *Fusarium graminearum* 729 – milho

FG-730 - *Fusarium graminearum* 730

FG-732 - C - *Fusarium graminearum* 732 – cevada

FG-732 - *Fusarium graminearum* 732

FG-732 - M - *Fusarium graminearum* 732 – milho

FO – *Fusarium oxysporum*

FO-C - *Fusarium oxysporum* – cevada

FO-M - *Fusarium oxysporum* – milho

g – grama

HPLC – High performance liquid chromatography

IN – Instrução Normativa

Iso-Don – Iso-deoxinivalenol

kV – quilo volt

L – Litros

LaBioMMi 1396 – M - *LaBioMMi* 1396 – milho

LaBioMMi 1397 – C - *LaBioMMi* 1397 – cevada

LaBioMMi 1397 – M - *LaBioMMi* 1397 – milho

LaBioMMi 1398 – A - *LaBioMMi* 1398 – arroz

LaBioMMi 1398 – C - *LaBioMMi* 1398 – cevada

LaBioMMi 1398 – M - *LaBioMMi* 1398 – milho

m/z – Razão massa/ carga

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

mL- mililitros

mm – milímetros

MRM – Multiple reaction monitoring

MS – mass spectrometry

MSP – mass spectrometry proteomic

Nº- número

N₂ – Nitrogênio

ng/ g – nanograma/ grama

NIV – Nivalenol

nm – nanômetros

OTA – Ocratoxina

PKS – *policetídeo síntase*

Psi – per square inch

rpm -rotação por minuto

SPE – Solid phase extraction

TCA – ácido triacilcarboxílico

TLC – Thin Layer Chromatography

UPLC-PDA – Ultra performance liquid chromatography – photo diode array

UV – Ultravioleta

V - volt

v/v – volume/ volume

WHO – World Health Organization

ZEA – Zearalenona

Lista de Tabelas

Tabela 1– Comparação da classificação da cerveja quanto à proporção de malte de cevada, segundo a legislação brasileira (Decreto nº 2.314) e a legislação do Mercosul (IN-nº054).....	5
Tabela 2– Quantidade máxima de açúcares vegetais não provenientes de cereais, permitida em cervejas, segundo a legislação brasileira (Decreto nº 2.314) e a legislação do Mercosul (IN-054).....	5
Tabela 3 - Micotoxinas monitoradas por MRM.	30
Tabela 4- Proporção de cereais nas produções de cerveja.	35
Tabela 5- fumonisina B2.....	42
Tabela 6 - Zearalenona	45
Tabela 7 - Zearalenona	49
Tabela 8-Zearalanona	51
Tabela 9 - Zearalenol.	52
Tabela 10- Nivalenol.....	55
Tabela 11- Experimento de MRM para análise da Aflatoxina B1.	60
Tabela 12- Fungos isolados a partir da semente de cevada	64
Tabela 13- Resultado do Maldi-TOF, utilizando a ferramenta Biotyper.	66
Tabela 14- Resultado do Maldi-TOF, utilizando a ferramenta Biotyper.	69
Tabela 15- Resultado do Maldi-TOF, utilizando a ferramenta Biotyper.	72
Tabela 16- Resultado do Maldi-TOF, utilizando a ferramenta Biotyper.	76
Tabela 17 - Resultado do Maldi-TOF, utilizando a ferramenta Biotyper	80
Tabela 18- Resultado do Maldi-TOF, utilizando a ferramenta Biotyper.	84
Tabela 19- Resultado do Maldi-TOF, utilizando a ferramenta Biotyper	87
Tabela 20- Bactérias isoladas a partir da semente de malte.....	90
Tabela 21: Compostos encontrados na cerveja 100% Puro malte e com adição de adjunto de milho.	96
Tabela 22: Compostos encontrados na cerveja 100% Puro malte e com adição de adjunto de arroz.....	103

Lista de Figuras

Figura 1: Processo de fabricação de cerveja.....	3
Figura 2 - Biossíntese da Zearalenona.....	7
Figura 3: Estrutura da zearalenona e seus derivados.	8
Figura 4: Estrutura dos tricotecenos Deoxinivalenol e Nivalenol.	10
Figura 5: Rota Biosintética do Deoxinivalenol.	11
Figura 6: Estrutura das fumonisinas.	12
Figura 7: Estrutura das fumonisinas FB1, FB2 e FB3.	13
Figura 8: Estrutura das aflatoxinas.	15
Figura 9 - Rota biossintética das aflatoxinas.	16
Figura 10: Estrutura da Ocratoxina A.	17
Figura 11: Esquema de uma fonte de ionização por ESI (HO, et.al., 2003).	21
Figura 12: Representação da fonte de ionização por APCI (SOUZA, 2009).	22
Figura 13 - Esquema simplificado de um ion trap linear. adaptado de hager, 2002.	24
Figura 14 - Esquema simplificado de um MALDI-TOF.	25
Figura 15 - Rendimento extratos dos fungos e extrato do meio de cultivo.	38
Figura 16 - Rendimento extratos de fungo e extrato o meio de cultivo.....	39
Figura 17: Cromatograma Padrão com mix de 100 ppm, para os compostos Deoxinivalenol, Nivalenol, Iso-deoxinivalenol e Zearalenona.....	40
Figura 18: Cromatogramas para as amostras do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> em diferentes meios de cultivo.	41
Figura 19 - MRM das transições referentes ao FO-M.	42
Figura 20 - MRM das transições referentes ao FO-C.....	43
Figura 21 - Fragmentações da molécula fumonisina B2.	43
Figura 22: Cromatogramas Zearalenona.....	44
Figura 23 - MRM da zearalenona referente ao FG-728-M.	46
Figura 24 - MRM da zearalenona referente ao FG-728-C.....	46
Figura 25 - MRM da zearalenona referente ao FG-732-M.	47
Figura 26 - MRM da zearalenona referente ao FG-732-C.....	47
Figura 27 - fragmentações zearalenona.....	48
Figura 28 - MRM da zearalenona referente ao FG-729-M.	50
Figura 29 - MRM da zearalanona referente ao FG-728M.....	51
Figura 30 - MRM da zearalanona referente ao FG-732-M.	51
Figura 31 - fragmentações zearalanona.....	52

Figura 32 - MRM referente ao zearalenol produzido pelo fungo FG-728-C.....	53
Figura 33 - MRM referente ao zeralenol produzido pelo fungo FG-729-C.....	53
Figura 34 - MRM do zearalenol refrente ao fungo FG-732-C.	54
Figura 35 - fragmentações do alfa - zearalenol.	54
Figura 36 - MRM refrente ao nivalenol do fungo FG-728-M.	56
Figura 37 - MRM refrente ao nivalenol do fungo FG-728-A.....	56
Figura 38 - MRM referente ao nivalenol produzido pelo fungo FG-732-C.	57
Figura 39 - fragmentações nivalenol.	57
Figura 40: Cromatograma obtido do extrato de cultivo do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .	58
Figura 41: Espectro de UV da Aflatoxina B1 encontrada nas amostras de <i>Aspergillus Flavus</i> em arroz.....	59
Figura 42 - MRM referente a aflatoxina b1 produzida pelo fungo AF-M.	61
Figura 43 - MRM da referente a aflatoxina b1 produzida pelo fungo AF-A.....	61
Figura 44 - MRM referente a aflatoxina b1 produzida pelo fungo AF-C.	62
Figura 45 - Fragmentações da aflatoxina b1.	63
Figura 46 - <i>LABIOMMI 1396</i> , isolado a partir do trigo.	65
Figura 47 - Cromatograma do extrato fúngico do fungo <i>LaBioMMi 1396</i> cultivado em meio de milho.	67
Figura 48 - Espectro do ultravioleta no tempo de retenção 12,94 min..	67
Figura 49: <i>LaBioMMi 1397</i> , isolado a partir da cevada Munich II.	68
Figura 50 - Cromatograma do extrato do fungo <i>LaBioMMi 1397</i> , cultivo em meio de cevada e milho.	70
Figura 51 - Espectro no ultravioleta de alguns metabolitos produzidos pelo fungo <i>LaBioMMi 1397</i> , quando cultivados no substrato de milho e cevada.	70
Figura 52: <i>LaBioMMi 1398</i> , isolado a partir do cevada Munich II.	71
Figura 53 - Cromatograma do extrato do fungo <i>LaBioMMi 1398</i> nos meios de cevada, milho e arroz.....	73
Figura 54 - Espectros no ultravioleta para o extrato do fungo <i>Labiommi 1398</i> em arroz e milho.....	74
Figura 55 - Espectro no ultvioleta para o extrato do funfo <i>Labiommi 1398</i> em cevada.	74
Figura 56 – Fungo <i>labiommi 1399</i> isolado a partir da cevada Vienna.	75
Figura 57 – Cromatogramas do extrato do fungo <i>LABIOMMI 1399</i> nos meios de arroz, milho e cevada.	77

Figura 58 - Espectro no ultravioleta de alguns metabolitos do fungo <i>LaBioMMi</i> 1399 no meio de arroz.....	77
Figura 59 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO <i>LABIOMMI</i> 1399 NO MEIO DE cevada.	78
Figura 60 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO <i>LABIOMMI</i> 1399 NO MEIO DE milho.	78
Figura 61: <i>LaBioMMi</i> 1400, isolado a partir do malte Vienna.	79
Figura 62 - Cromatograma do extrato do fungo <i>LABIOMMI</i> 1400 nos meios de cevada e milho.	81
Figura 63 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO <i>LABIOMMI</i> 1400 NO MEIO DE CEVADA.....	81
Figura 64 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO <i>LABIOMMI</i> 1399 NO MEIO DE milho.	82
Figura 65: <i>LaBioMMi</i> 1401, isolado a partir do malte Vienna.	83
Figura 66 – Cromatogramas do extrato do fungo <i>LABIOMMI</i> 1401 nos meio de cevada e milho.	85
Figura 67 - espectro no ultravioleta de alguns metabolitos do fungo <i>labiommi</i> 1399 no meio de cevada e milho.....	85
Figura 68: <i>LaBioMMi</i> 1402, isolado a partir do malte Vienna.	86
Figura 69 - Dendograma obtido a partir dos MSP dos fungos isolados.....	88
Figura 70: Dendograma das Bactérias Isoladas.....	91
Figura 71 - Cromatograma cerveja 100% malte de cevada e com 15%, 30% e 45% de adição de milho.	92
Figura 72 - Cerveja 100% malte de cevada e com 15% e 30% de adição de arroz.	93
Figura 73 - MS/MS de alguns compostos encontrados na cerveja 100% malte de cevada e milho.	94
Figura 74 - MS/MS de alguns compostos encontrados na cerveja de arroz.....	95

RESUMO

UMA AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRESENÇA DE MICOTOXINAS E MICRO-ORGANISMOS TOXIGÊNICOS EM INSUMOS E EM CERVEJAS ARTESANAIS

Composta por basicamente água, lúpulo, cereais maltados e não-maltados e também leveduras, a cerveja é uma das bebidas fermentadas alcoólicas mais consumidas no mundo. Embora existam leis sobre riscos que comprometam a qualidade do produto, alguns patógenos como fungos podem contaminar a matéria-prima utilizada na produção de cerveja com metabólitos secundários. Como por exemplo, as micotoxinas que são compostos produzidas por fungos filamentosos, que em certas quantidades podem causar doenças em animais e seres humanos. Desta forma, estudamos alguns fungos da espécie do gênero *Fusarium* spp. e *Aspergillus flavus* para identificar quais micotoxinas poderiam produzir, quando cultivados *in vitro* sob condições favoráveis em insumos (cevada, milho e arroz) utilizados por microcervejarias para a produção de cervejas artesanais. Estes micro-organismos quando cultivados sob condições favoráveis, foi possível encontrar no seu extrato fúngico que, fungos do gênero *Fusarium* spp., produziram micotoxinas como a Zearalenona, α -Zearalenol e β -Zearalenol, Nivalenol, Fumonisina B1, já em relação ao extrato fúngico obtido a partir do cultivo do fungo da espécie *Aspergillus flavus*, foi possível observar a produção da micotoxina Aflatoxina B1. Foram produzidas em escala laboratorial seis cervejas artesanais utilizando os mesmos insumos anteriores sem a contaminação com os fungos em diferentes proporções de cevada, milho e arroz, no qual estas amostras quando submetidas a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, porém não foi encontrada nenhuma micotoxina. Além disso, foi feito um estudo sob quais fungos poderiam ser isolados em grãos de cevada utilizado por microcervejarias, onde foi possível isolar sete fungos. E com experimentos de microcultivo e MALDI-TOF, dois fungos podem pertencer ao gênero *Fusarium* sp. e ao gênero *Mucor* sp.. Diversas bactérias também foram encontradas ao fazer o isolamento dos micro-organismos, sendo estas também submetidas a experimentos utilizando MALDI-TOF, sendo que muitas delas possuem um perfil proteômico muito semelhante.

ABSTRACT

A QUALITATIVE EVALUATION OF THE PRESENCE OF MYCOTOXINS AND TOXYGEN MICROORGANISMS IN SUPPLIES AND CRAFT BEERS

Consisting primarily of water, hops, malted and non-malted cereals as well as yeast, beer is one of the most consumed alcoholic fermented beverages in the world. Although there are risk laws that compromise product quality, some pathogens such as fungi can contaminate the raw material used in beer production with secondary metabolites. For example, mycotoxins which are compounds produced by filamentous fungi, which in certain amounts can cause disease in animals and humans. Thus, we studied some fungi of the species of the genus *Fusarium* spp. and *Aspergillus flavus* to identify which mycotoxins could produce when grown in vitro under favorable input conditions (barley, maize and rice) used by microbreweries for the production of craft beers. These microorganisms when cultivated under favorable conditions, it was possible to find in their fungal extract that fungi of the genus *Fusarium* spp., Produced mycotoxins such as Zearalenone, α -Zearalenol and β -Zearalenol, Nivalenol, Fumonisin B1, in relation to the extract. obtained from the cultivation of the fungus *Aspergillus flavus*, it was possible to observe the production of mycotoxin Aflatoxin B1. Six craft beers were produced on a laboratory scale using the same previous inputs without contamination with the fungi in different proportions of barley, corn and rice, in which these samples when subjected to liquid chromatography coupled with mass spectrometry, but were not found. In addition, a study was carried out under which fungi could be isolated from barley grains used by microbreweries, where it was possible to isolate seven fungi. And with micro-cultivation and MALDI-TOF experiments, two fungi may belong to the genus *Fusarium* sp. and the genus *Mucor* sp.. Several bacteria were also found when isolating microorganisms, which were also submitted to experiments using MALDI-TOF, many of which have a very similar proteomic profile.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Cerveja.....	1
1.2 Produção de Cerveja.....	2
1.3 Legislação Brasileira.....	3
1.4 Microrganismos Endofíticos	5
1.5 Micotoxinas	6
1.6 Zearalenonas	6
1.7 Tricotecenos.....	9
1.8 Fumonisinias.....	12
1.9 Aflatoxinas	14
1.10 Ocratoxinas.....	17
1.11 Técnicas de Extração, Separação e Identificação de Micotoxinas.....	18
1.12 Técnicas de Ionização a Pressão Atmosférica (API): ESI e APCI	20
1.13 Analisadores de massas.....	23
1.14 MALDI-TOF.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos Gerais.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Isolados utilizados.....	27
3.2 Insumos utilizados	27
3.3 Reativação dos fungos	27
3.4 Cultivo dos microrganismos em diferentes meios.....	27
3.5 Extração dos metabólitos secundários dos microrganismos em diferentes meios	28
3.6 Métodos cromatográficos.....	29
3.7 Isolamento de fungos endofíticos a partir de grão germinado de cevada e trigo utilizado na produção de cerveja artesanal e identificação por micro-cultivo e Maldi – TOF.....	31
3.7.1 Cereais utilizados	31
3.7.2 Preparo do meio de cultura PDA.....	31
3.8 Esterilização, inoculação e isolamento	32

3.9	Análise por Maldi – TOF dos microrganismos isolados.....	32
3.10	Micro-cultivo dos fungos isolados.....	33
3.11	Metodologia utilizada para análise do extrato dos fungos isolados.....	33
3.12	Produção em escala laboratorial de cerveja artesanal puro malte e com insumos de milho e arroz.....	34
3.13	Preparação das Amostras de Cerveja	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Identificação das Substâncias de Interesse.....	38
4.2	Análises dos extratos em diferentes meios de cultivo dos fungos <i>Fusarium graminearum</i> 728, 729, 730, 732 e <i>Fusarium oxysporum</i>	40
4.3	Análises dos extratos em diferentes meios de cultivo do fungo <i>Aspergillus Flavus</i>	58
4.4	Resultado sobre o Isolamento de Microrganismos Endofíticos Presentes em Grão Germinado de Cevada Utilizando Técnica de Microcultivo e MALDI-TOF como Ferramenta de Análise.	64
4.4.1	Fungos Isolados.....	64
4.4.2	Bactérias Isoladas.....	89
4.5	Resultados das Cervejas Produzidas em Escala Laboratorial	92
5.	CONCLUSÕES	110
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cerveja

A origem histórica da cerveja não é conhecida, porém Sumérios e Egípcios começaram a produzir a cerca de 5000 a.C. e Babilônios consumiam cerca de 16 tipos de cerveja utilizando ingredientes como cevada, trigo e mel há 4000 a.C.. Segundo as leis do código de Hamurabi na Babilônia (datado em 1800 a. C.) declarava que a pena de morte deveria ser imposta a quem diluía cerveja e a comercializava (SANTOS, 2002). Composta por basicamente água, lúpulo, cevada e leveduras é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo.

O mercado brasileiro cresce a cada ano, sendo que no ano de 2014 o brasileiro consumiu cerca de 68,3 L de cerveja ao ano de 2014 (CERVBRASIL, 2014) e este setor representou cerca de 1,6% do PIB brasileiro, sendo o terceiro maior produtor mundial (BRASIL, 2017).

No meio de gigantes produtoras de cervejas em escalas industriais, uma pequena parcela deste setor vem ganhando importante destaque, as chamadas cervejas artesanais. As cervejas artesanais provenientes de microcervejarias tem ganhado muito espaço no setor nos últimos anos, pois de acordo com a Associação Brasileira de Bebidas (Abrabe) as microcervejarias se caracterizam pela produção em pequenas quantidades e em muitas vezes com um sabor diferenciado de sua bebida (SEBRAE, 2011), no qual pelo sabor e aroma diferenciado das cervejas industriais, tem levado muitos consumidores de cervejas a tomarem gosto por este tipo de bebida. Segundo a Associação Brasileira de Cervejas Artesanais (Abracerva), este setor representou cerca de 0,7% das vendas de cervejas artesanais do mercado cervejeiro no ano de 2016 (ABRACERVA, 2016).

Portanto, para a maioria desse público consumidor, é importante levar em consideração a qualidade da cerveja, quanto em sabor, textura, estabilidade e também em relação à saúde dos consumidores, principalmente quando se trata de micro-organismos patogênicos que podem causar doenças em seres humanos, como por exemplo as micotoxinas, encontrada em alimentos ou bebidas fermentadas. Embora encontrada em baixas quantidade, a exposição depende da quantidade de cerveja consumida durante um período prolongado de tempo, o que mostra uma crescente preocupação com o monitoramento destas toxinas em cervejas,

principalmente entre as artesanais, onde não existe de fato um controle de qualidade rigoroso em relação a esta molécula, bem como, em muitas vezes existe falta de conhecimento dos cervejeiros sobre essas toxinas.

1.2 Produção de Cerveja

O processo de fabricação de cerveja é relativamente simples, entretanto, algumas variáveis como temperatura, o tempo e as diferentes quantidades e tipos de matérias – primas empregadas podem gerar uma gama de cervejas com características próprias. A produção de cerveja consiste basicamente em três etapas: preparo do mosto, fermentação e maturação, como pode ser observado na FIGURA 1. Sendo que cada etapa possui características variáveis de acordo com o tipo de cerveja que se deseja produzir (STEFENON, 2012).

Antes da preparação do mosto, temos a etapa de moagem dos grãos - FIGURA 1 (A), no qual a cevada é quebrada deixando exposto o seu endosperma, rico em amido, no qual enzimas irão agir sobre ele no processo conhecido como “brassagem”. Com a adição de água e cozimento dos grãos, produz-se o mosto - FIGURA 1 (B), meio no qual as enzimas que estão presentes no endosperma do grão de cevada, irão atuar para converter o amido presentes nos grãos em açúcares fermentáveis. Após esta etapa, as cervejas passam por um processo de clarificação - FIGURA 1 (C), no qual o mosto é separado do bagaço de malte.

Antes da fermentação, temos o processo de fervura - FIGURA 1 (D), onde ocorre a esterilização, e também a inoculação de lúpulo, no qual ocorre o processo de isomerização dos alfa-ácidos em iso-alfa ácidos do lúpulo, tornando-os solúveis no mosto, o que confere amargor e sabor para cerveja.

Antes de inocular as leveduras utilizadas no processo de fermentação, a mistura obtida da fervura deve ser resfriada e separada de alguns resíduos sólidos obtidos a partir da lupulagem - FIGURA 1 (E). Só então as leveduras são adicionadas ao processo de fermentação - FIGURA 1 (F), no qual os açúcares do mosto serão transformados em gás carbônico (CO₂) e álcool. Os subprodutos da fermentação contribuirão na formação dos aromas (ésteres), característicos das cervejas e certos compostos indesejados serão eliminados pelo arraste do CO₂ ou consumidos pelas leveduras.

Na etapa de maturação - FIGURA 1 (G), é o momento onde os constituintes de aroma e sabor da cerveja se estabilizam. Durante a maturação, leveduras restantes na cerveja metabolizam certos compostos, amenizando ou até eliminando os “off -flavors”, bem como auxilia a remoção de outros compostos turvadores (polifenóis e proteínas). A próxima etapa consiste no envase da cerveja - FIGURA 1 (H), onde está será armazenada em garrafas ou barris e é onde receberá o dióxido de carbono (CO₂). Um fluxograma simplificado sobre o processo é mostrado na FIGURA 1 abaixo.

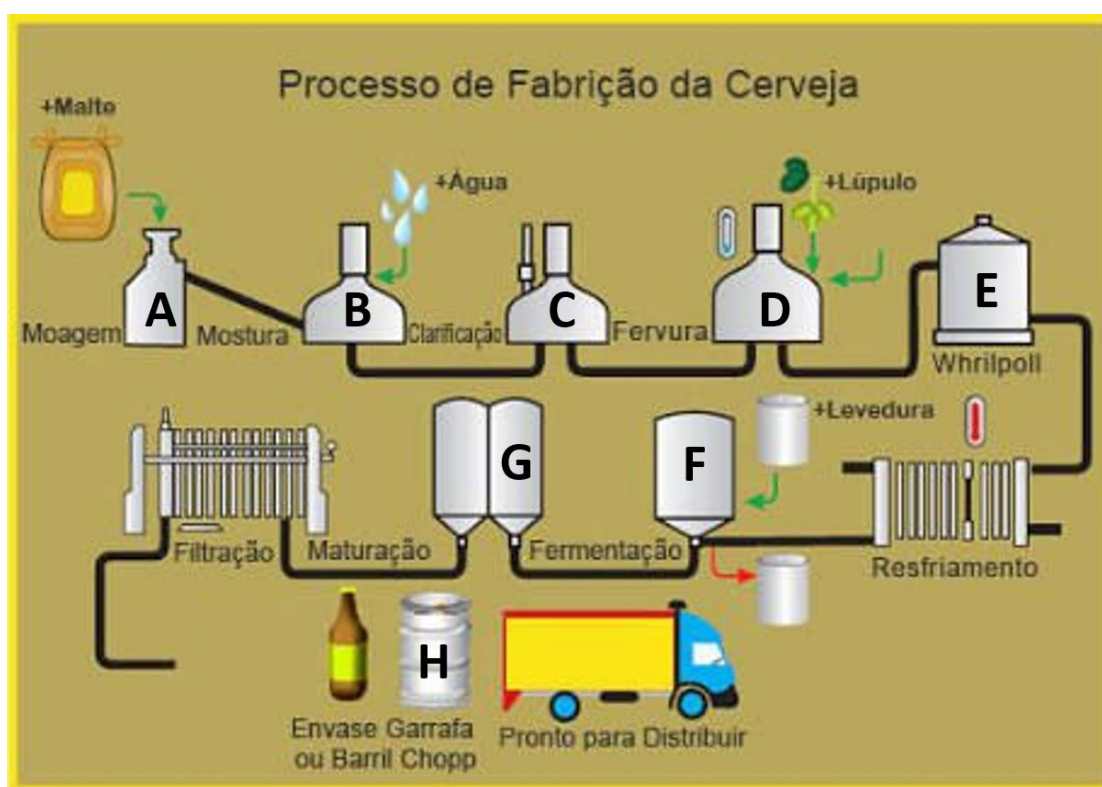


FIGURA 1: PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE CERVEJA

FONTE: (CERVEJARIA BISER&BEER)

1.3 Legislação Brasileira

Na maioria dos países, a substituição de cevada maltada, por outros adjuntos, ou seja, insumos utilizados na indústria para obtenção de açúcares não provenientes da cevada, como milho e arroz é permitido por lei, sendo que estes apresentam menores custos de produção em relação a cevada, sendo que o xarope de milho (adjunto líquido), se apresenta dentre todos, o com o preço mais competitivo e então um dos mais utilizados no processo de fabricação de cerveja.

A proporção utilizada de cada cereal na produção de cerveja depende de cada empresa, no entanto no Brasil o Decreto nº 2314 define cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcoólica de mosto cervejeiro oriundo de malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo. Parte do malte de cevada poderá ser substituída por adjuntos, isto é, cereais maltados ou não (arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo na forma integral, em flocos ou somente sua parte amilácea) e por carboidratos de origem vegetal transformados ou não. Na TABELA 1, mostra como são classificadas as cervejas em relação ao percentual de malte. A quantidade de carboidrato (açúcar) empregada na elaboração da bebida não pode ser superior a 15% na cerveja clara, 50% na cerveja escura e 10% na cerveja extra, em relação ao seu extrato primitivo, conforme TABELA 2 (BRASIL, 1997).

No ano de 2001, foi publicada a Instrução Normativa nº 054 (IN-054) que estabelece padrões de identidade e qualidade dos produtos de cervejaria e aplica-se a comercialização entre os países que compõem o Mercosul, além de importações extraterritorial. A IN-054 define cerveja como a bebida resultante da fermentação do mosto de malte de cevada ou seu extrato, submetido previamente a um processo de cocção, adicionado de lúpulo. A fermentação deve ocorrer mediante a presença de levedura cervejeira e uma parte do malte ou do seu extrato poderá ser substituída por adjuntos (BRASIL, 2001). Quando se tratarem de açúcares vegetais não provenientes de cereais, a quantidade empregada em relação ao extrato primitivo é limitada conforme o tipo de cerveja produzida (TABELA 1). A IN-054 também proíbe, entre outras práticas, a adição de qualquer tipo de álcool à cerveja, qualquer que seja sua procedência.

TABELA 1– COMPARAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DA CERVEJA QUANTO À PROPORÇÃO DE MALTE DE CEVADA, SEGUNDO A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA (DECRETO Nº 2.314) E A LEGISLAÇÃO DO MERCOSUL (IN-Nº054).

Decreto nº 2314	<p>Cerveja puro malte: 100% de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo como fonte de açúcares.</p> <p>Cerveja: malte de cevada maior ou igual a 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares.</p> <p>Cerveja com o nome do vegetal predominante: malte de cevada maior que 20% e menor que 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares.</p>
Instrução Normativa nº 054	<p>Cerveja 100% malte ou de puro malte: elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém exclusivamente de cevada maltada.</p> <p>Cerveja: elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo contém um mínimo de 55% em peso malte de cevada.</p>

TABELA 2– QUANTIDADE MÁXIMA DE AÇÚCARES VEGETAIS NÃO PROVENIENTES DE CEREAIS, PERMITIDA EM CERVEJAS, SEGUNDO A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA (DECRETO Nº 2.314) E A LEGISLAÇÃO DO MERCOSUL (IN-054).

	Decreto nº 2314	IN-054
Cervejas Claras	15 % (10% para cervejas extras)	10 %
Cervejas Escuras	50 %	25 % (50% para cervejas tipo Malzbier)

1.4 Microrganismos Endofíticos

Microrganismos endofíticos são considerados um grupo de microrganismos que se associam com tecidos internos de plantas terrestres e aquáticas, incluindo partes internas do caule, pecíolo, raízes e folhas, sem causar doenças visíveis as plantas (Gautam *et. al*, 2019).

Entre os microrganismos mais frequentemente encontrados são os fungos e bactérias, sendo que esta relação entre planta e hospedeiro, pode variar entre uma relação simbiótica a patogênica (Gautam *et. al*, 2019).

Microrganismos endofíticos, principalmente fungos endofíticos, são conhecidos pela produção de uma ampla gama de metabolitos secundários e embora estes fungos endofíticos muitas vezes se comportem de forma assintomática com

seus hospedeiros, eles são capazes de produzir efeitos benéficos, como a produção de metabólitos secundários que foram identificados como compostos anticancerígenos, inseticida, antidiabético, imunossupressor e biocontrole (Gautam *et. al*, 2019).

Entretanto, há muitas espécies de fungos patogênicos conseguem entrar nos tecidos das plantas, seja este no momento da germinação ou até mesmo em estágios mais avançados como o florescimento e então viver em estado de latência até que, em determinadas condições ambientais que favoreçam oportunamente o microrganismo, este então passa a se desenvolver em maneira prejudicial a planta, seja este pelo consumo de nutrientes vitais e/ ou desenvolvimento da planta, ou pelo acúmulo de fitoxinas (SOUZA, 2009).

A infestação de plantações por fungos é muito bem conhecida, principalmente quando se trata de cereais, sendo que muitas vezes sem o uso adequado de fungicidas e no mal armazenamento dos grãos após a colheita, podem ocorrer contaminações graves com micotoxinas, que podem ser carregadas durante todo o processo do commodities chegando ao seu destino final.

1.5 Micotoxinas

De acordo com BENNET *et. al.* (2003), micotoxinas são compostos de baixo peso molecular, produzidos no metabolismo secundário de fungos filamentosos. Onde condições ambientais adequadas favorecem a sua ocorrência e geram compostos de alta toxicidade, capazes de causar doenças graves em animais e seres humanos.

Diversas micotoxinas são conhecidas, mas algumas delas são mais comumente encontradas devido a sua preocupação em relação a saúde humana, agricultura e pecuária. Dentre as mais conhecidas estão as aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, fumonisinas e nivalenol/ deoxinivalenol (WHO, 2018). As estruturas e as algumas características destas moléculas estão mostradas nos tópicos abaixo.

1.6 Zearalenonas

ZEA, ou μ -lactona do ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-*trans*-1-undecinil) - β -resorcíclico, também conhecida como F-2 toxina é um metabólito secundário

produzido por fungos do espécies *Fusarium*, incluindo *Fusarium cerealis*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *Fusarium equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *F. roseum* e *F. tricinctum*, que apresenta atividades estrogênicas e anabólicas em animais (TURNER, 1983). A zearalenona é um derivado de policetídeos a partir de uma condensação sequencial múltipla de unidades de acetato pela *policetídea sintase* (PKS) (Gaffoor *et. al.*, 2006). A estrutura e a biossíntese da zearalenona e de alguns de seus derivados podem ser observados nas FIGURA 2 e 3 abaixo.

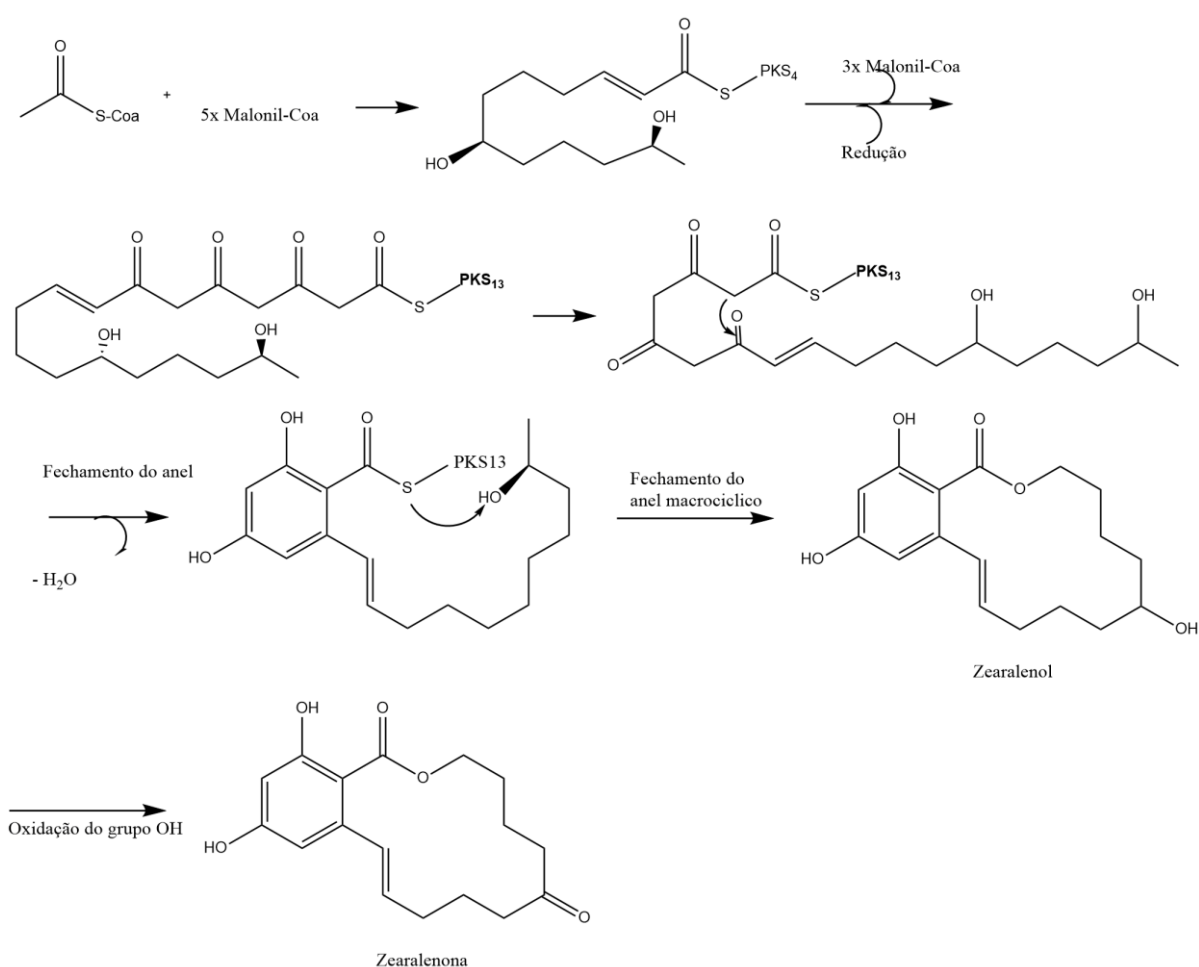


FIGURA 2 - BIOSÍNTESE DA ZEARALENONA.

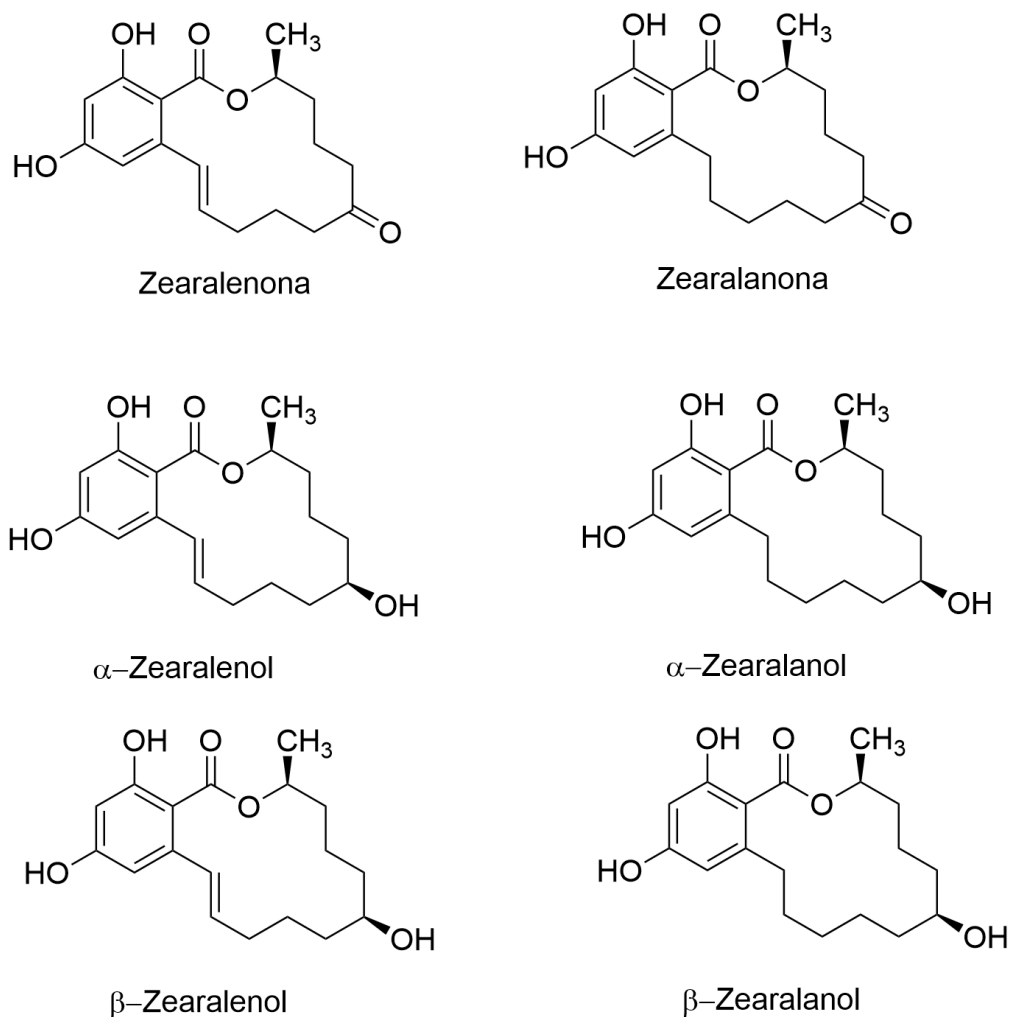


FIGURA 3: ESTRUTURA DA ZEARALENONA E SEUS DERIVADOS.

O milho, é um dos cereais com maiores riscos de contaminação, mas essa toxina já foi detectada em trigo, cevada, aveia, sorgo, arroz, centeio e soja (ZINEDINE, *et al.*, 2007). ZEA, é estruturalmente similar ao 17 β -estradiol, o que explica a sua habilidade de competir com receptores estrogênicos, causando problemas de infertilidade em camundongos, porcos, coelhos e animais domésticos (DE RUYCK *et al.*, 2015; ESCRIVA *et al.*, 2015; ZINEDINE *et al.*, 2007). A zearalenona, também pode estar ligada a Síndrome Hipoestrogênica em humanos (ZINEDINE *et al.*, 2007).

Estas toxinas são formadas principalmente antes das colheitas, mas sua síntese pode continuar durante condições de armazenamento não adequadas. Muitos desses cereais são utilizados pela indústria cervejeira como complemento para a produção de mosto, principalmente o milho e o arroz. A crescente preocupação com

cervejas de alta qualidade, principalmente com as artesanais tem levado a pesquisadores como RUBERT *et. al.* (2011), a desenvolver metodologias analíticas com equipamentos de alta resolução para determinar e quantificar moléculas de baixo peso molecular, como micotoxinas. Em seu estudo ele verificou a presença de zearalenona em cervejas irlandesas.

1.7 Tricotecenos

Outra classe de toxinas fúngicas produzidas pelo gênero *Fusarium*, são os Tricotecenos, nos quais são um grupo de metabólitos com um amplo espectro de ação tóxica. Existem diversos problemas relacionados com a ingestão destas substâncias por humanos e animais, em sua maioria relacionados a intoxicação alimentar, que têm sido relatados por diferentes organizações internacionais como o WHO (World Health Organization) e FAO (Food and Agricultural Organization of United Nations) (SWEENEY *et. al.*, 1998). Quimicamente, eles são sesquiterpenos tetracíclicos com um sistema policíclico básico 12,13-epoxitricotec-9-eno, subdivididos em 4 grupos, tipo A, tipo B, tipo C, tipo D, sendo os mais conhecidos os tricotecenos do tipo A e B os mais conhecidos e relatados na literatura.

Tricotecenos do tipo A, possuem em sua cadeia lateral no carbono 8 (C8) um hidrogênio ou um éter, incluindo moléculas como T-2 e seus metabólitos diacetilados HT-2 e DAS (anguidina). Já os do tipo B, possuem uma cetona no mesmo grupo lateral, incluindo moléculas como o Deoxinivalenol (Vomitoxina, DON) e Nivalenol, sendo o DON a micotoxina mais comumente encontrada em grãos mundialmente. Na FIGURA 4 podemos ver as estruturas das micotoxinas do tipo B Deoxinivalenol e Nivalenol, o que se observa que suas estruturas são muito similares, sendo que se diferenciam por apenas uma hidroxila.

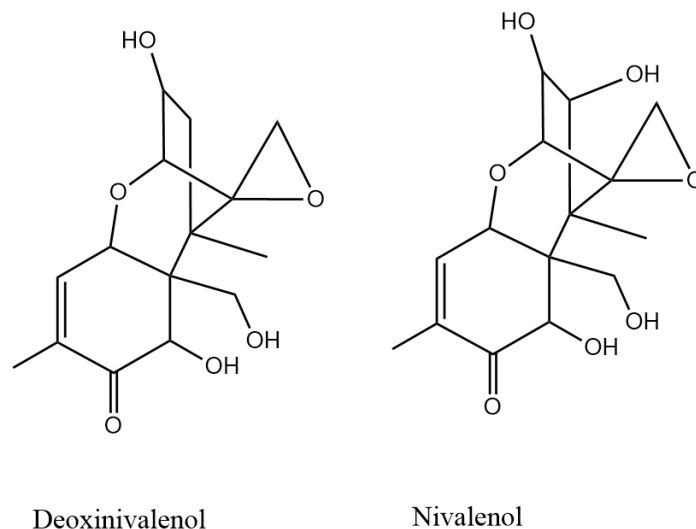


FIGURA 4: ESTRUTURA DOS TRICOTECENOS DEOXINIVALENOL E NIVALENOL.

Eles são biossintetizados via tricodieno (FIGURA 4), na rota nerolidol pirofosfato (DEWICK, 2004). A rota Biosintética do deoxinivalenol pode ser observada na FIGURA 5 abaixo.

Essas micotoxinas são detectadas no mundo inteiro, em alimentos e matérias-primas para a alimentação, principalmente quando se trata de grãos, sendo que encontradas antes ou após as colheitas. A contaminação do malte ou cerveja, por esses tricotecenos é possível se a cevada ou outros grãos (milho ou arroz), contendo esses compostos, são utilizados no processo de produção de cerveja (SUGA, *et. al.*, 2005). Em seu trabalho Suga e colaboradores chegaram a conclusões que ao analisar diferentes tipos de malte e 17 tipos de cervejas artesanais importadas da União Européia e Canadá, foi possível detectar HT-2 e Nivalenol nas amostras de cevada e nas amostras de cervejas foi detectado baixas concentrações de ng/g (0,5 -1,4 ng/g) DON, sendo um contaminante que ocorre frequentemente em cervejas artesanais.

Apesar do limite máximo tolerado pela ANVISA em grãos de cevada maltada ser de 750 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (ppb), não existe uma preocupação por parte de empresários e nem da população em geral por este tipo de contaminantes, principalmente quando se trata de cervejas artesanais, onde ainda não há no país leis que regulamentam essas moléculas neste tipo de bebida, levando as pessoas muitas vezes a estarem se contaminando sem ter o conhecimento sobre tal fato.

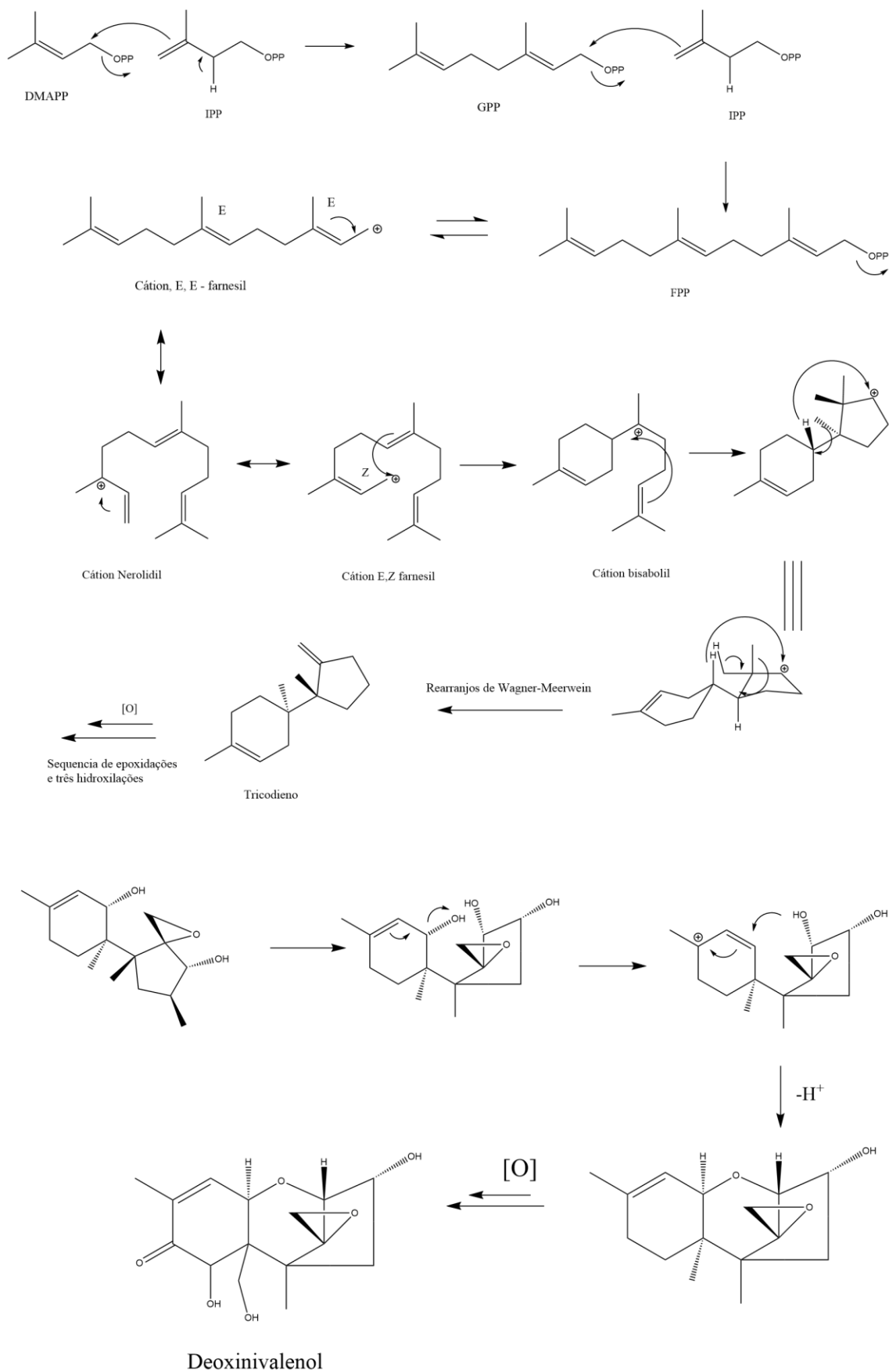


FIGURA 5: ROTA BIOSINTÉTICA DO DEOXINIVALENOL.

Fonte: Dewick, 2004

1.8 Fumonisin

As fumonisinas foram descobertas na África do Sul em 1988, a partir de culturas isolados de um fungo do gênero *Fusarium*, mais especialmente ao fungo da espécie *Fusarium verticillioides* e segundo SWEENEY *et. al.* (1998), as principais espécies produtoras são *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. napiforme*, *F. nygamai* e *F. oxysporum* e também algumas outras espécies como *Alternaria alternata sp. lycopersici* (SCHOTT, 2012). Sweeney e colaboradores (1999) dizem que a rota biossintética dessas micotoxinas seja através da condensação do aminoácido alanina a um precursor derivado do acetato.

A estrutura química básica destas toxinas é caracterizada por uma cadeia carbônica aminopolihidroxiálquica di-esterificada com ácido propano-1,2, tricarboxílico (também chamado ácido tri-carbalílico – TCA) (SEO, *et. al.*, 1996, RHEEDER *et. al.*, 2002). A FIGURA 6 apresenta o esqueleto básico das fumonisinas (a), bem como a estrutura do TCA (b) e do grupo 3-hidroxipiridina (3HP) (c), também encontrado em algumas classes de fumonisinas. Estas estruturas apresentam muita similaridade as esfingosina, esqueleto precursor dos esfingolípídeos (MARIN. 2013).

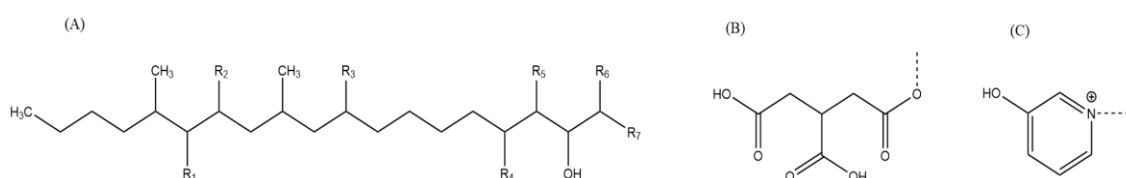


FIGURA 6: ESTRUTURA DAS FUMONISINAS.

As fumonisinas podem ser divididas em quatro principais grupos, identificados como A, B, C e P (SEO, *et. al.*, 1996, RHEEDER *et. al.*, 2002) com predominância da classe B. As fumonisinas FB1, FB2 e FB3 (FIGURA 7) são as mais encontradas como contaminantes naturais de produtos alimentícios e estas são causadoras de edemas pulmonares em porcos e podem apresentar efeitos hepatocarcinogênicos em animais e humanos (GELDERBLOM *et. al.*, 1988; RUMORA *et. al.*, 2002). Dentro deste grupo de fumonisinas, a FB1 recebe uma importância especial, por geralmente ser produzida em maior abundância (GELDERBLOM *et. al.*,

1992). Ela é mais comumente encontrada, não apenas no milho e alimentos à base dele, mas também na cerveja, arroz, sorgo, sementes de feijão, soja e aspargos.

A Fumonisin B2 e B3, são metabólitos estreitamente relacionados, que podem ocorrer em concentrações mais baixas que a FB1. As fumonisin são relativamente estáveis ao calor, sendo que uma pequena degradação pode ocorrer durante a fermentação (MARIN, 2013).

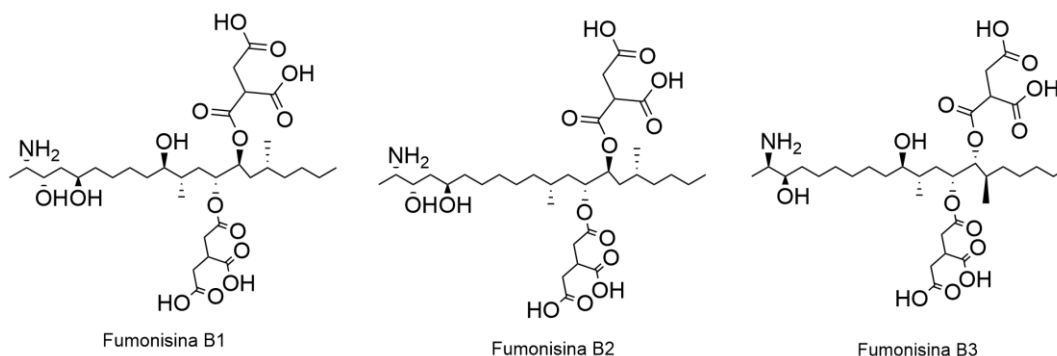


FIGURA 7: ESTRUTURA DAS FUMONISINAS FB1, FB2 E FB3.

Estas micotoxinas podem ser introduzidas em cervejas, a partir de materiais que são utilizados (cevada, malte, lúpulo, leveduras) ou a partir de insumos utilizados no processo de fabricação da cerveja. Geralmente, amido de milho ou xarope de milho são os insumos mais utilizados alternativamente na produção de cerveja (HLYWKA & BULLERMAN 1999).

PIACENTINI *et al.* (2015), estudaram a presença de DON e FB1 em cervejas artesanais da região Sul do Brasil, no qual a micotoxina FB1 foi encontrada em 15,09% das amostras. Um exemplo disso, é o amido de milho e o xarope de milho que estão entre os adjuntos alternativamente utilizado para produção de cerveja no Brasil, contribuindo para a presença destas micotoxinas em cerv

De acordo com esses números sobre a contaminação de cervejas, muitos estudos também documentaram os níveis de micotoxinas e seu padrão em grãos de cevada (CASTAÑARES *et al.*, 1998; MARÍN *et al.* 1999; OLIVEIRA, 2011; RUBERT *et al.* 2012). Este problema é fortemente influenciado por práticas agrícolas que, em combinação com as condições meteorológicas durante as fases críticas do crescimento das plantas, um número de fungos toxigênicos invadem a cultura em condições de campo (EDWARDS, 2004), produzindo estas micotoxinas.

1.9 Aflatoxinas

As aflatoxinas são um grupo de estruturas policíclicas no qual pertencem a classe dos compostos furanos coumarinas, derivadas de uma biossíntese de policetídeos, no qual inicialmente acetato e malonil-Coa são convertidos em um iniciador de hexanoíl CoA, que é então estendido por uma policetídeo sintase ao ácido norsolorinico, o primeiro precursor estável da biossíntese, como mostrado na FIGURA 9. Eles são produzidos primeiramente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii*, e *Aspergillus bombycis* e podem contaminar largamente grãos e seus derivados.

Aspergillus flavus é um patógeno mais comumente encontrado em culturas oleaginosas, como milho, amendoim, algodão e nozes. O fungo, está presente no solo como conídios ou escleródios e nos tecidos vegetais como micélios, é mais frequentemente encontrado em climas quentes.

As aflatoxinas são as micotoxinas mais importantes em relação à sua abundância, toxicidade e impacto humano (GNONLONFIN *et al.*, 2013). Existem quatro aflatoxinas principais B1, B2, G1 e G2 (FIGURA 8). O termo “2” no nome da aflatoxina indica que é um isômero, no qual falta uma ligação dupla, em comparação com a respectiva aflatoxina “1”. (DE RUYCK *et al.*, 2015). Os nomes das quatro principais aflatoxinas associadas à alimentos são com base na sua fluorescência azul “blue” (B) ou verde “green” (G) sob luz UV e sua relativa mobilidade cromatográfica (YU, 2012).

As aflatoxinas são toxinas termoestáveis com efeitos teratogênicos e mutagênicos. Eles são altamente carcinogênicos em humanos, e sua carcinogenicidade também pode ser vista em primatas, roedores, pássaros e peixes (KEW, 2013; YU, 2012). A aflatoxina B1 é o representante mais tóxico deste grupo e tem sido causalmente ligado ao carcinoma hepatocelular (DE RUYCK *et al.*, 2015; GNONLONFIN *et al.*, 2013; KEW, 2013; WU *et al.*, 2014a).

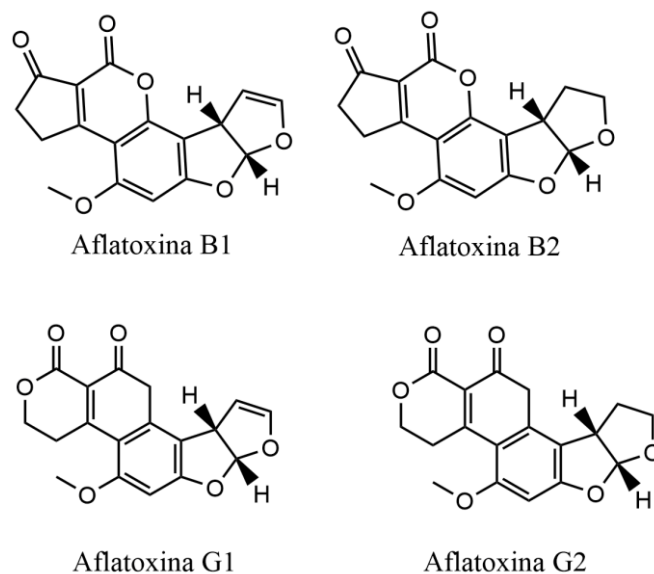


FIGURA 8: ESTRUTURA DAS AFLATOXINAS.

PIETRI *et. al.* (2010), estudaram a transferência de aflatoxinas e fumonisinas em matérias-primas (cevada, lúpulo, leveduras) utilizadas na produção de cerveja. A micotoxina aflatoxina B1 (AFB1) variou em concentrações detectadas nas matérias-primas sob a concentrações de 0,31 a 14,85 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo que 0,6 - 2,2% de AFB1 passou para a cerveja. Já BENESOVÁ *et. al.* (2012), também monitorou aflatoxinas em cervejas e concluíram que elas podem passar de matérias-primas naturalmente contaminadas ou de adjuntos utilizados no processo de fabricação para a cerveja. Em 2008 e 2011, um conjunto total de 216 amostras de materiais utilizados na fabricação de cerveja provenientes da União Europeia (UE) foram analisados. Os valores em cevada e malte não excederam o máximo permitido limite estabelecido pela União Europeia, porém estavam sob os limites de detecção.

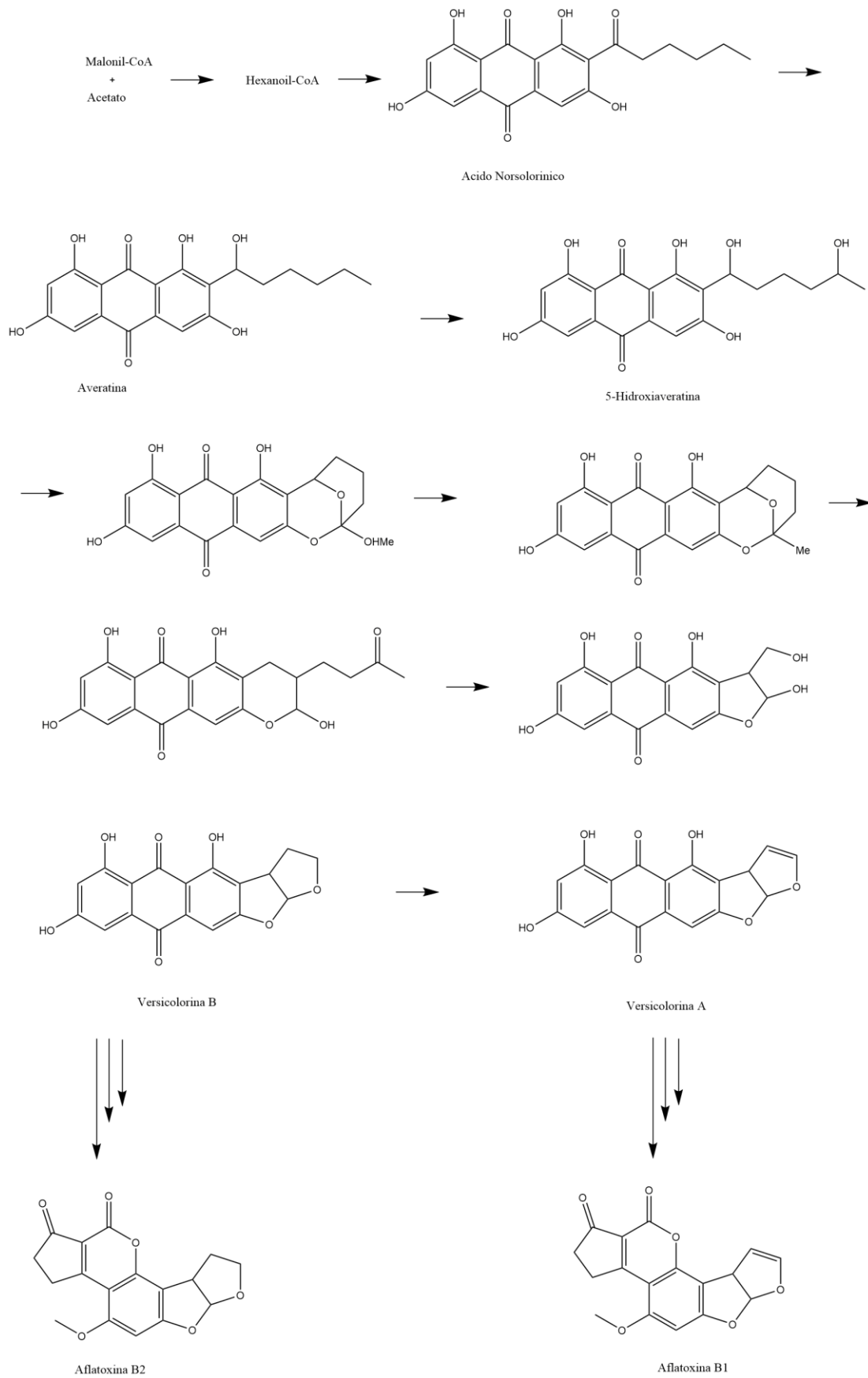


FIGURA 9 - ROTA BIOSSÍNTEICA DAS AFLATOXINAS.

1.10 Ocratoxinas

Outra importante micotoxina estudada são as ocratoxinas, que é um grupo patogênicos geralmente encontrados em áreas subtropicais, normalmente por espécies *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotinum*, *A. niger*, *A. carbonarius*) e em áreas frias por espécies *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. purpurascens*, *P. commune*). As suas características químicas provêm de derivados da 7-isocumarin ligado com um aminoácido L-β-fenilalanina (BĚLÁKOVÁ; BENEŠOVÁ & SVOBODA, 2011).

A Ocratoxina A (OTA) é a mais importante e generalizada micotoxina do grupo das ocratoxinas. VAN DER MERWE, STEYN, & FOURIE, 1965 isolaram pela primeira vez em laboratório através da espécie *A. ochraceus*.

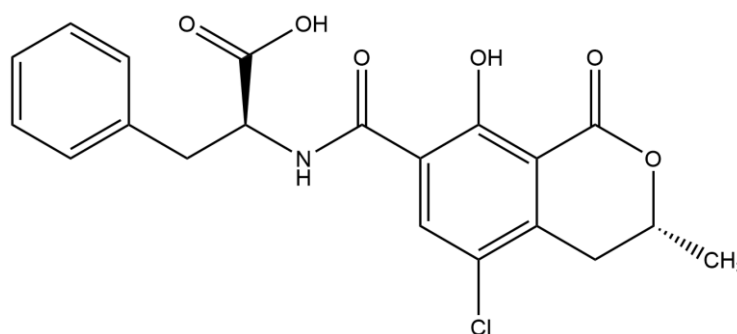


FIGURA 10: ESTRUTURA DA OCRATOXINA A.

Os principais efeitos toxicológicos da OTA são a nefrotoxicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e neurotoxicidade, sendo que seus efeitos foram confirmados por experimentalmente em animais e também pode ser encontrado em humanos (PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007). Estudos sobre os efeitos dos mecanismos da OTA sob organismos vivos têm mostrado que há uma inibição sob a síntese de proteínas, incluindo a peroxidação de lipídios, danos aos metabolismos de sacarídeos, cálcio e as funções mitocondriais (DIRHEIMER & CREPPY, 1991). As ocratoxinas, similarmente com outras micotoxinas são altamente resistentes ao calor (Bullerman & BIANCHINI, 2007); nem o congelamento pode eliminá-los de qualquer alimento.

A ocratoxina A ocorre em grande parte de mercadorias, ambos de origem animal, como vegetal, sendo encontrada em cereais, principalmente cevada, centeio, aveia, trigo, arroz e milho (KABAK, 2009; SUGITA-KONISHI *et al.*, 2006).

Uma vez que a OTA é amplamente encontrada em cereais, as cervejas feitas a partir desses cereais têm um potencial risco de contaminação de OTA. Alguns autores relataram a presença desta micotoxina no vinho e cerveja, a níveis baixos, mas variáveis (de menos de 0,1 µg/ L a mais de 1 µg/ L) (SCOTT, *et. al.*, 1996; LEE *et al.*, 2007). Em cervejas consumidas na Espanha, Legarda e Burdaspal (1998) encontraram OTA em 100 e 97,4% das cervejas nacionais e importadas, respectivamente. Em 2004, ARAGUÁS *et al.* detectaram OTA em 24 das 31 amostras de cerveja testada.

1.11 Técnicas de Extração, Separação e Identificação de Micotoxinas

Para a extração de micotoxinas, as etapas iniciais envolvem o cultivo da cepa fúngica em meios de cultura adequados, visando posterior extração com solventes e obtenção de extratos brutos. Porém quando se trata de cervejas e os insumos utilizadas na sua produção a amostragem e a preparação da amostra são etapas muito importantes no processo, pois se a amostra escolhida para análise não for representativa pode levar a resultados analítico não confiáveis. Geralmente ocorre uma distribuição muito desigual das micotoxinas em mercadorias que foram contaminadas naturalmente, portanto, seguir com uma forma adequada de coleta e homogeneidade da amostra, torna a matriz mais representativa (SEMPLE, 1991).

A definição do solvente de extração depende de várias coisas, como características físicas e químicas do analito, custo, segurança do solvente e bem como também da solubilidade de interferentes no qual o solvente de extração também irá estar atuando e etapas de processamento subsequentes da extração. O solvente ideal é aquele no qual remova a micotoxina de interessa da matriz, porém as complexidades das matrizes em que se trabalha, leva ao uso de mistura de solventes, sendo que comumente os mais utilizados são uma mistura de metanol/ água e acetonitrila/ água, não descartando também o uso de solventes como etanol, acetona, acetato de etila e clorofórmio (ZHANG, 2018).

Micotoxinas possuem uma diversidade de grupos de compostos químicos, que se torna difícil encontrar um procedimento específico no qual se remova apenas a micotoxinas de interesse da amostra sem carregar interferentes. Dessa forma, muitos procedimentos desenvolvidos nos últimos anos, visam eliminar a presença de interferentes no extrato de uma amostra, deixando a micotoxina de interesse ou um grupo dela presente no extrato.

Nos últimos anos, vários métodos de “*clean-up*” foram publicados tratando da análise de amostras de cerveja. Seguindo a etapa de extração, esses métodos geralmente incluem uma etapa de limpeza como a imunoafinidade, no qual são materiais que tem sido muito utilizado nos últimos anos, devido a boa recuperação e a especificidade adquirida no uso de anticorpos monoclonais ou policlonais. A desvantagem está no alto custo do material, pois se usa apenas uma vez o cartucho devido a desnaturação dos anticorpos. Outro método utilizado seguindo também a extração em fase sólida (SPE) são os cartuchos Mycosep[®], no qual são compostos de vários absorventes selecionados para a recuperação de uma micotoxina em individual, onde estes absorventes estão em uma coluna no qual removem toda matriz, deixando o composto de interesse em solução na parte superior da coluna. É um método rápido, portátil sem necessidade de etapas adicionais de lavagem, no entanto as colunas são projetadas para um único tipo de micotoxina, sendo inviável o seu uso na análise de múltiplas micotoxinas (PIACENTINI *et al.*, 2017; TAMURA, UYAMA E MOCHIZUKI, 2011; TURNER *et al.*, 2009). O uso de cartuchos SPE com fase reversa C-18 e solventes polares e não-polares, combinados com técnicas de espectrometria de massas, mostra-se bastante eficiente na análise de micotoxinas pois acaba abrangendo uma gama maior de micotoxinas na análise e a espectrometria de massas oferece bons resultados na detecção destes compostos (TURNER *et al.*, 2009). Estes procedimentos de limpeza são específicos para um grupo certo de toxinas e alguns anos atrás o uso dá técnica por QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and safe), atraiu muito a atenção de pesquisadores devido ao seu sucesso na análise de cereais e seus derivados, no qual está técnica permite eliminar compostos interferentes da amostra, além de permitir a análise de múltiplas micotoxinas (SUN *et al.*, 2016).

O uso destas técnicas de extração demandam tempo e as toxinas que são obtidas, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos para uma análise rápida e eficaz, que envolva em geral a elaboração de protocolos incluindo extração

em fase sólida (SPE) e posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas (MS), em conjunto. A análise pela detecção por fluorescência também tem sido empregada na análise de aflatoxinas e ocratoxinas devido a presença de grupos cromóforos presentes nestas moléculas. Porém micotoxinas como as fumonisinas não é viável o uso desta técnica devido estas moléculas não possuem grupos cromóforos. Algumas técnicas como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e também a TLC (Thin layer chromatography) no qual são técnicas permitem a detecção e, em alguns casos, a identificação de quantidades mínimas destas substâncias (TURNER *et al.*, 2009). Assim, as análises por espectrometria de massas (MS) recebem grande destaque, sendo que a imensa maioria destas análises envolvem também o acoplamento com algum tipo de técnica de separação como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas - GC-MS (COONEY *et al.*, 2000; JELEN *et al.*, 2008; KRISHNAMURTHY *et al.*, 1996, 1987; PLATTNER, *et al.*, 1991; RYU, *et al.*, 1996; SHEPHARD, *et al.*, 2008), assim como a eletroforese capilar - CE-MS (MASHEGO MLAWULE *et al.*, 2006; RITTGEN *et al.*, 2008) e uma das mais utilizadas nestes estudos a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas - HPLC-MS (FABERI *et al.*, 2005; MOL *et al.*, 2008; PIATTNER *et al.*, 1995; PLATTNER *et al.*, 1999; Rosenberg *et al.*, 1998; SENYUVA *et al.*, 2008; SONGSERMSAKUL *et al.*, 2008). Estes métodos são utilizados principalmente para a quantificação destas toxinas. Um grande número de trabalhos realizados com espectrometria de massas atualmente deve-se ao desenvolvimento de interfaces para cromatografia líquida, como APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) e ESI (Electrospray Ionization). Na sequência, segue uma discussão um pouco mais detalhada sobre estas duas técnicas de ionização a pressão atmosférica.

1.12 Técnicas de Ionização a Pressão Atmosférica (API): ESI e APCI

FEN *et al.* (1984, 1985), foi o primeiro a publicar dados utilizando a técnica "Electrospray Ionisation" - ESI. O processo da técnica de ionização utiliza energia elétrica no qual irá auxiliar na transferência de íons da solução na fase gasosa antes de serem submetidos a análise por espectrometria de massas, sendo que estes íons em solução ganham em parâmetros de sensibilidade quando utilizados a espectrometria de massas chamada de ESI-MS. Compostos neutros também podem

ser convertidos em compostos iônicos na solução ou pela protonação na fase gasosa, sendo também analisados por ESI-MS (HO *et. al.*, 2003).

O processo de formação destas moléculas ionizadas ocorre da seguinte maneira, primeiramente ocorre uma dispersão de um spray fino de gotículas de carga (1), seguidas por evaporação do solvente (2) e então a saída de íons das gotículas altamente carregadas (3), como observado na FIGURA 11(HO *et. al.*, 2003).

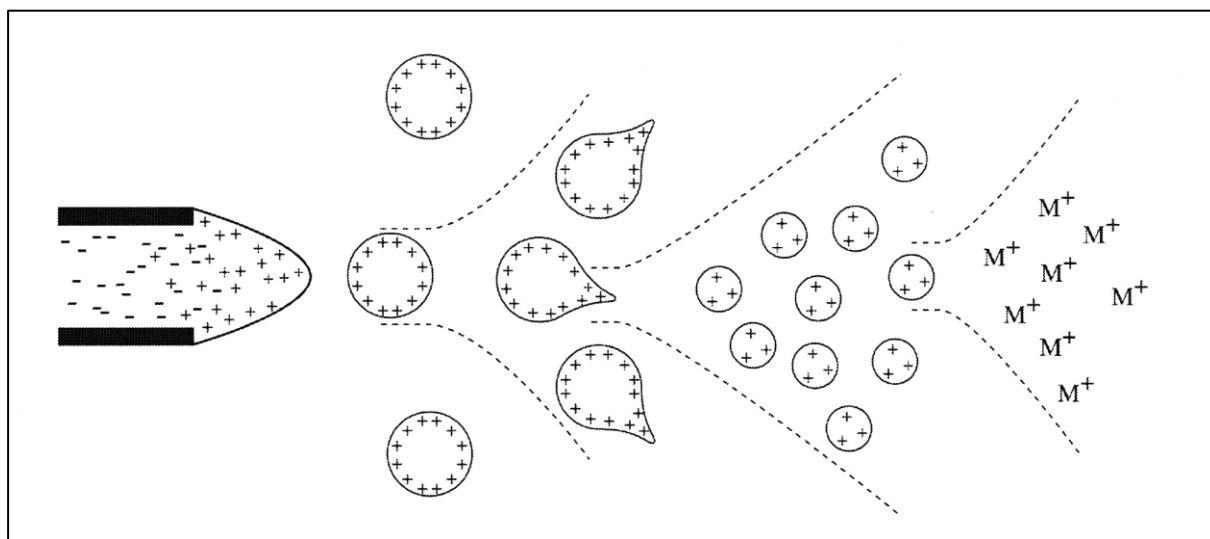


FIGURA 11: ESQUEMA DE UMA FONTE DE IONIZAÇÃO POR ESI (HO, ET.AL., 2003).

Na fonte ESI, um fluxo contínuo de solução de amostra é passado através de um capilar de aço inoxidável ou quartzo-sílica tubo, que é mantido em alta tensão (por exemplo, 2,5 - 6,0 kV). Então é formada uma névoa de gotas altamente carregadas com a mesma polaridade que a tensão capilar. Um gás de nebulização, geralmente nitrogênio, é aplicado a amostra da solução eluida, formando um aerossol (HO *et. al.*, 2003).

Aplicando-se um potencial inverso ao das gotículas carregadas no primeiro cone de entrada da fonte de ionização, é possível atrair os íons com carga oposta e repelir os de mesma carga, possibilitando a entrada somente dos primeiros para dentro do sistema de vácuo. Este movimento é auxiliado por um fluxo de gás nebulizante (geralmente nitrogênio-N₂), que também contribui para a evaporação da camada de solvatação das gotículas – e a conseqüente diminuição do tamanho destas – gerando um aumento da repulsão entre as cargas das gotículas. Este processo é conhecido como Explosão Coulômbica (SOUZA, 2009).

Os íons gerados são atraídos por um cone skimmer de amostragem e então são acelerados para o analisador de massas para uma posterior análise da massa molecular e medição da intensidade dos íons (HO *et. al.*, 2003).

Outra fonte muito utilizada é a APCI, que embora também promova ionização à pressão atmosférica, é mais indicada para compostos de média polaridade. Isso deve-se ao fato que neste tipo de fonte, uma alta voltagem não é aplicada no probe e os processos de nebulização e ionização ocorre de modo independente (NIXDORF, 1999; TSUCHIYA, 1998). A amostra em solução ao ser analisada é inserida com vazão variando de 20 a 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ e elui do probe (temperatura entre 300 e 550°C) com o auxílio do fluxo do gás nebulizante, formando um aerossol de solvente que evapora rapidamente. Uma agulha carregada (corona) então aplica uma alta voltagem (2 - 4kV) que ioniza as moléculas do solvente. A colisão das moléculas do solvente ionizadas com as moléculas do analito, promove a transferência de cargas e conseqüente a ionização, gerando formas das moléculas protonadas ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e ions adutos como $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ se sais de amônio são adicionados ao solvente, moléculas desprotonadas são formadas pela abstração do ion oxigênio O_2^- ($[\text{M}-\text{H}]^-$) ou ou pela formação de adutos com ânions como acetato ou cloreto presente na amostra ou solvente. A FIGURA 12 mostra uma representação esquemática desta fonte (BRUINS *et. al.*, 2019; SOUZA, 2009).

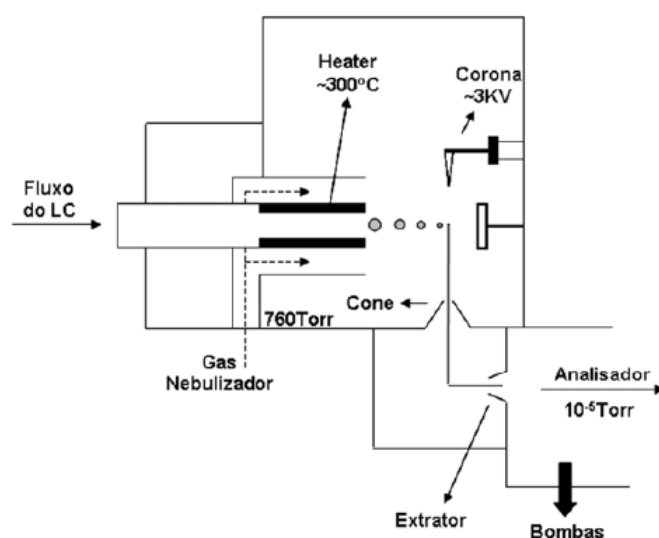


FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO DA FONTE DE IONIZAÇÃO POR APCI (SOUZA, 2009).

O uso destas técnicas de ionização em conjunto, permite que uma grande variedade de compostos orgânicos possa ser analisada, no qual possuem excelentes interfaces para o uso da espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (SOUZA, 2009).

1.13 Analisadores de massas

Nos últimos anos a utilização de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas se tornou uma das técnicas mais utilizadas nos estudos de micotoxinas, sendo que os analitos em muitos casos são compatíveis com as condições aplicadas durante a separação e detecção. Quando comparadas com técnicas convencionais como o UV e fluorescência, embora as vezes seja uma técnica muito utilizada na análise de aflatoxinas, a espectrometria de massas oferece maior sensibilidade e seletividade nas análises, a confirmação da identidade molecular do analito e também permite o uso de substância isotopicamente marcadas que podem ser utilizados como padrões internos; além de investigar a estrutura de outros metabólitos, conjugados de açúcares e omitir etapas de derivatização e limpezas demoradas aumentos os erros. Embora se tenha uma diminuição na preparação da amostra relativamente os métodos possuem baixa precisão e exatidão devido aos componentes das matrizes coeluírem, influenciando na intensidade do sinal do analito (KRSKA, 2008).

Existem muitos analisadores de massas no mercado, porém neste trabalho será falado do analisador no qual foi utilizado que é um equipamento tipo *tandem*. O espectrômetro de massas FIGURA 13 utilizado neste trabalho consiste de um primeiro quadrupolo chamado de Q1, no qual o analito de interesse (íon precursor) tem a sua massa selecionada, então é colidido por um gás de colisão (geralmente argônio), sendo que esta etapa ocorre no segundo quadrupolo chamado célula de colisão Q2. Este processo é conhecido como CID, do inglês *collision-induced dissociation* – dissociação induzida por colisão. Os íons resultantes de filhos podem ser monitorados por um terceiro quadrupolo Q3 (neste caso seria um espectrômetro de massas com um sistema *tandem* quadrupolo) ou como no utilizado no trabalho o Q3 é um espectrômetro de massas do tipo *Linear Ion-Trap* (KRSKA, 2008).

O espectrômetro de massas do tipo *Linear Ion Trap*, utiliza um conjunto de hastes de um quadrupolo para confinar os íons radialmente e um eletrodo de ponta

estático para confinar os íons axialmente. A vantagem é que a forma linear pode ser usada como um filtro seletivo, ou uma armadilha criando um poço potencial para os íons ao longo do eixo dos eletrodos. Dentre as vantagens, estão aumento da capacidade de armazenamento de íons, tempos de escaneamento mais rápidos e simplicidade de construção (Douglas, et. al., 2005; MARCH, 2000).

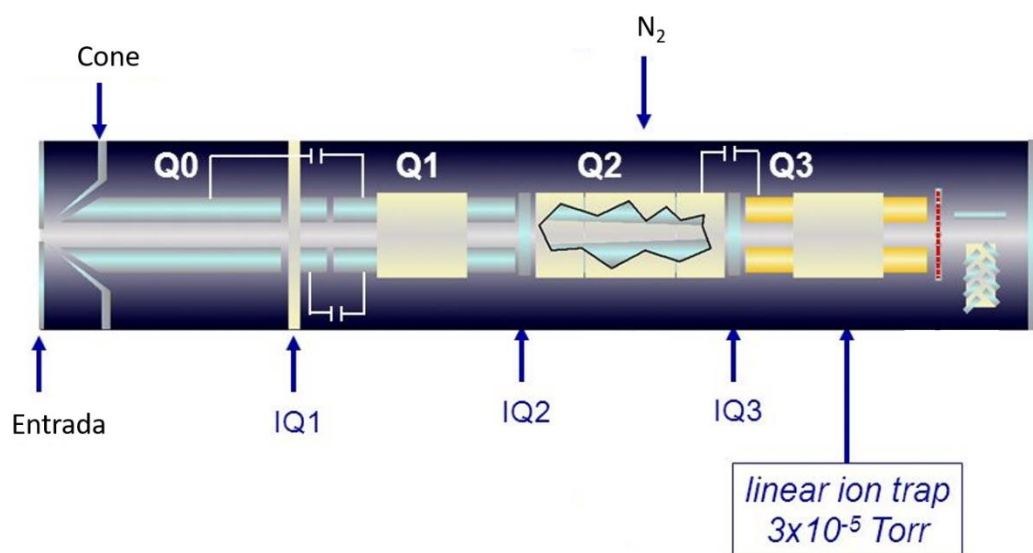


FIGURA 13 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM ION TRAP LINEAR. ADAPTADO DE HAGER, 2002.

1.14 MALDI-TOF

O termo MALDI-TOF é derivado da língua inglesa e significa *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization time-of-flight mass spectrometry*, ou seja, dessorção/ ionização por laser assistido – espectrometria de massas de tempo de voo, no qual tem avançado muito na identificação, diferenciação e classificação de microorganismos devido as suas ferramentas serem fáceis e rápidas de aplicar (CHALUPOVÁ, et. al., 2013).

A técnica de ionização funciona da seguinte maneira FIGURA 13: (1) Amostras dos microorganismos são flexionados em uma placa metálica em um *spotted* que são então recobertos por uma matriz normalmente derivados do ácido-ciânico. (2) A matriz absorve uma luz ultravioleta (laser de nitrogênio, comprimento de onda 337 nm) e a converte em energia térmica. Uma pequena parte da matriz (até 100 nm da superfície externa superior do analito) aquece rapidamente (em vários nano

segundos) e é vaporizada, juntamente com a amostra (SHIMADZU, 2020; CHALUPOVÁ, et. al., 2013)

Íons carregados de vários tamanhos são gerando uma diferença de potencial V_0 entre a amostra e a matriz no qual atrai os íons na direção mostrada (3). A velocidade dos íons atraídos v é determinada pela lei de conservação de energia. Como a diferença de potencial V_0 é constante em relação a todos os íons, os íons com menor valor de m/z (íons mais leves) e os íons mais carregados se movem mais rapidamente pelo espaço de deriva até atingir o detector (4). Conseqüentemente, o tempo de vôo do íon difere de acordo com o valor da razão massa / carga (m/z) do íon, obtendo então um espectro de massas da amostra (5). O método de espectrometria de massa que explora esse fenômeno é chamado de espectrometria de massa de tempo de voo (SHIMADZU, 2020).

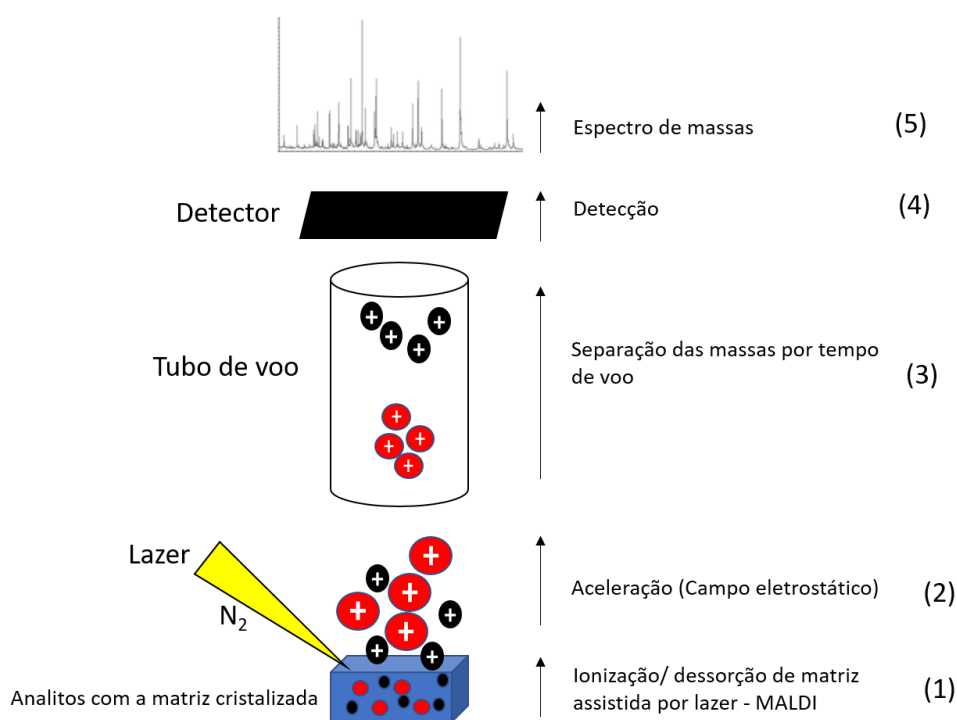


FIGURA 14 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM MALDI-TOF.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do estudo em geral é avaliar a quais tipos de micotoxinas são produzidas por fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* e *Aspergillus flavus* em experimentos *in vitro* com insumos (grãos de cevada, milho e arroz) mais comumente utilizados na produção de cervejas artesanais, além da identificação de das micotoxinas deoxinivalenol; nivalenol; Iso-deoxinivalenol; HT-2; T2; zearalenona; zearalanona; α -zearalenol; β -zearalenol; aflatoxinas B1, B2, G1 e G2; fumonisinas FB1, FB2, FB3 e a ocratoxina em cervejas artesanais produzidas em escala laboratorial utilizando diferentes proporções dos insumos cevada, milho e arroz na produção das cervejas.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Identificar as micotoxinas propostas, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas;
- ii. Isolamento e identificação de microrganismos (Fungos e Bactérias) presentes em grãos de cevada, utilizada nas cervejas artesanais produzidas no LaBioMMi, por técnicas de micro-cultivo e MALDI-TOF;
- iii. Estudo de um perfil químico para cervejas artesanais quando estas são produzidas utilizando diferentes proporções dos insumos cevada, milho e arroz.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Micro-molecular de Micro-organismos – LaBioMMi, localizado no Departamento de Química - DQ da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

3.1 Isolados utilizados

Os fungos *Fusarium oxysporum*; *Fusarium graminearum* 728, *Fusarium graminearum* 729, *Fusarium graminearum* 730, *Fusarium graminearum* 732; *Aspergillus flavus*, LaBioMMi 1396, LaBioMMi 1397, LaBioMMi 1398, LaBioMMi 1399, LaBioMMi 1400, LaBioMMi 1401, LaBioMMi 1402, foram adquiridos da micoteca do LaBioMMi – DQ- UFSCar.

3.2 Insumos utilizados

Os cereais utilizados foram milho comprado em uma agropecuária na região central da cidade de São Carlos, o arroz em flocos, foi adquirido no Mercado Municipal da cidade de São Carlos e o malte de cevada utilizado é o tipo Pilsen proveniente da produtora de malte alemão BINDEWALD®, a levedura de baixa fermentação utilizada no processo fermentativo é a SAFLAGER™ W34/70 da empresa francesa FERMENTIS®, ambos foram doados pela empresa ROHBRAU® de Piracicaba – SP.

3.3 Reativação dos fungos

Para a reativação dos fungos foram utilizadas placas com meio de “Potato dextrose ágar, PDA” onde esporos dos fungos, armazenados em glicerol e água a -20°C, eram colocados nas placas. Foram feitas três reativações dos fungos, ou seja, cada fungo foi ativado em três placas diferentes, após o seu crescimento.

3.4 Cultivo dos microrganismos em diferentes meios

Foram preparados três diferentes meios em estado sólido de milho, arroz e grão germinado de cevada para cada fungo, além de um controle para cada tipo de meio que foi utilizado.

Foram utilizados no total 63 Erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionado 18,0 g de cada cereal, no qual estes foram triturados em um moinho de facas. A cada Erlenmeyer foi adicionado 15,0 mL de água ultra purificada e deixado em repouso por 5 horas.

Todas as amostras foram levadas à autoclave a 121°C; 1,2 atm.; por 20 minutos. Após o término de 3 dias as amostras foram levadas ao Fluxo Laminar para inoculação da suspensão de esporos obtidos dos microrganismos.

Foram inoculados 500 µL de suspensão de esporos dos fungos em cada Erlenmeyer, menos no controle, todas as amostras contendo as cepas dos fungos e o controle foram deixados por 15 dias a temperatura ambiente sendo agitados manualmente no período de 24, 48 e 72 após a inoculação.

3.5 Extração dos metabólitos secundários dos microrganismos em diferentes meios

Para a extração dos metabólitos secundários foram feitos os seguintes passos:

Adicionou-se uma solução de 85,0 mL de etanol e 1,8 g de NaCl à biomassa fúngica-cereal, e deixou agitando por 10 min em banho de ultrassom, filtrando a solução com papel de Filtro nº4; esta etapa foi repetida por mais 2 vezes. Retirou-se então uma alíquota de 40,0 mL da solução final a qual foi transferida para um tubo falcon e centrifugada a 5000 rpm por 5min.

Retirou-se alíquotas de 2,0; 5,0 e 10,0 mL, que foram adicionadas a potinhos de vidro e secas no Dry Block, com temperatura (40 °C) e fluxo de ar. Após seco, adicionou aos tubos de ensaio 5,0 mL de Acetato de Etila, então as amostras foram colocadas no ultrassom por 5 min.

Retirou-se uma alíquota de 4,0 ml e esta foi seca novamente, a amostra foi solubilizada em metanol e reconstituída no vial em 1,0 ml de metanol.

As amostras foram analisadas pelo sistema UPLC-PDA (WATERS®) e em um espectrômetro de massas 3200 qTRAP (SCIEX).

3.6 Métodos cromatográficos

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos no UPLC-PDA® para análises dos metabólitos secundários presentes nas amostras que continham o extrato fúngico quando estes cultivados nos insumos de cevada, milho e arroz; voltado para a identificação de algumas micotoxinas de interesse: DON, Iso-DON, NIV, ZEA e AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2.

No caso dos Tricotecenos e da Zearalenona, o método cromatográfico se desenvolveu a partir de padrões disponíveis no LaBiommi. O método analítico envolveu o uso de uma coluna ACQUITY UPLC® CSH™ C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm), empregando uma corrida gradiente onde a porcentagem de água/ acetonitrila se inicia nas proporções (90:10), aumentando o gradiente do solvente orgânico para (65:35) por 2,5 minutos, aos 5,0 minutos o gradiente atinge a proporção (30:70), chegando em 8,0 minutos na proporção (0:100), estabilizando por 2,5 minutos, retornando as condições iniciais em 0,5 minutos. O fluxo empregado foi de 0,45 ml/min e para cada análise foi injetado 5,0 µL de amostra.

Para a análise das Aflatoxinas foi utilizado um outro método, porém utilizando a mesma coluna ACQUITY UPLC® CSH™ C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm), empregando uma corrida gradiente onde a porcentagem de água/ acetonitrila se inicia nas proporções (90:10) chegando a (0:100) em 8,0 minutos, se mantendo por 2,5 minutos, retornando as condições iniciais em 0,5 minutos. O fluxo empregado foi de 0,5 ml/min e para cada análise foi injetado 5,0 µL de amostra.

As amostras de cervejas produzidas no LaBioMMi e os extratos fúngicos também foram submetidas a uma análise por espectrometria de massas utilizando um LC-MS/MS (3200-qTRAP, SCIEX®). Utilizou-se uma coluna PHENOMENEX Luna 5 µL Phenyl – Hexyl (150 x 4.6 mm, 5 micra) no qual também foi empregado uma corrida gradiente em que a porcentagem de água/ acetonitrila se inicia em (85:15) e chega a (0:100) em 18,0 min., se mantendo nesta proporção por mais 2,0 min. e voltando as condições iniciais em 1,0 min.. A fonte de ionização do espectrômetro de massas utilizada foi a Electrospray ionization (ESI), no qual foi operado em modo positivo e negativo, com MRM (Multiple Reaction Monitoring) TABELA 3. Os parâmetros de operação do massas foram: gás de cortina, 20psi; gás de colisão (CID), médio; temperatura do capilar, 500 °C; voltagem do “ion spray”, ± 4000 V; gás da fonte de

ions 1 (GS1), 50psi; gás da fonte de ions 2 (GS2), 50psi; temperatura de interface, “on”; o nitrogênio foi usado como gás de cortina, colisão, aquecimento e nebulizador.

TABELA 3 - MICOTOXINAS MONITORADAS POR MRM.

Micotoxinas	Modo	Ion Precursor	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
Deoxynivalenol	ESI (+)	[M + H] ⁺	297.1	249.2
			297.1	203.1
			297.1	175.1
Nivalenol	ESI (-)	[M-H] ⁻	311.1	281.1
			311.1	191.1
			311.1	233.2
Iso-deoxynivalenol	ESI (+)	[M + H] ⁺	297.2	249.2
			297.2	231.1
			297.2	161.1
HT-2	ESI (+)	[M + H] ⁺	425.0	263.0
			425.0	215.0
T2	ESI (+)	[M + H] ⁺	467.0	215.0
			467.0	185.0
Zearalenona	ESI (+)	[M + H] ⁺	319.1	301.2
			319.1	231.3
			319.1	189.2
Zearalanona	ESI (+)	[M + H] ⁺	321.1	189.0
			321.1	303.0
Zearalenol	ESI (+)	[M + H] ⁺	321.1	285.0
			321.1	303.1
Fumonisina B1	ESI (+)	[M + H] ⁺	722.0	334.5
			722.0	352.0
Fumonisina B2	ESI (+)	[M + H] ⁺	706.1	336.1
			706.1	318.1
Fumonisina B3	ESI (+)	[M + H] ⁺	706.0	336.0
			706.0	354.0
Ocratoxina	ESI (+)	[M + H] ⁺	404.0	239.0
			404.0	358.0
Aflatoxina B1	ESI (+)	[M + H] ⁺	313.1	243.1
			313.1	285.1
			313.1	257.1
Aflatoxina B2	ESI (+)	[M + H] ⁺	315.0	287.0
			315.0	259.0
Aflatoxina G1	ESI (+)	[M + H] ⁺	329.0	243.0
			329.0	215.0
Aflatoxina G2	ESI (+)	[M + H] ⁺	331.1	245.1
			331.1	217.0

3.7 Isolamento de fungos endofíticos a partir de grão germinado de cevada e trigo utilizado na produção de cerveja artesanal e identificação por micro-cultivo e Maldi – TOF.

3.7.1 Cereais utilizados

Foram utilizados ao total cinco tipos diferentes de malte em relação ao modo de torrefação (Pilsen, Munich I, Munich II, Vienna, Pale Ale), além de um malte obtido a partir de trigo.

3.7.2 Preparo do meio de cultura PDA

Para a preparação do meio de cultura para fungos, foi utilizado o meio “Potato dextrose agar” (PDA).

Para a preparação das placas de Petri para isolamento foram pesados 19,5 g de meio PDA, que foi solubilizado em 500 mL de água ultra purificada. O pH foi medido estando de acordo com as instruções do fabricante $5,6 \pm 0,2$.

Todo material (meio produzido e placas de Petri) foram levados à autoclave a 121°C; 1,2 atm por 15 min..

Após esfriado, foi adicionado ao meio uma substância antibacteriana de Sulfato de Streptomicina (Sigma-Aldrich) 100,0 µg/ml e então o meio foi vertido nas placas até que este estivesse por toda superfície, sendo que toda esta etapa foi realizada dentro fluxo laminar. Esperou-se três dias para ver indícios de contaminação externa para iniciar o isolamento dos microrganismos endofíticos dos grãos.

Como algumas bactérias também cresceram no experimento mesmo utilizando antibiótico, foi preparado um meio de cultura Mueller Hinton, para que as bactérias isoladas crescessem sem nenhuma contaminação a também afim de evitar contaminação cruzada na sua identificação. Para a preparação do meio de cultura foram utilizados 21,0 g de meio e este dissolvido em 1,0 L de água deionizada. Ele foi aquecido até a completa dissolução e esterilizado em autoclave a 121°C e 1,2 atm por 15 minutos. Esperou-se três dias para ver indícios de contaminação externa para iniciar o isolamento e crescimento.

3.8 Esterilização, inoculação e isolamento

A esterilização foi adaptada de BECCARI *et. al* (2016), onde aproximadamente 10,0 g de grãos foram externamente desinfetados por 2,0 min., utilizando uma solução composta por Etanol 70%, Água Deionizada esterilizada em autoclave e uma solução de Hipoclorito de Sódio, então os grãos foram lavados com Água Deionizada por 1,0 min.. Então seis grãos de cada tipo de malte foram dispostos homogeneamente sobre as placas de petri de modo que não ficassem juntos. Durante 20 dias de incubação em uma estufa a 25°C foi feita uma análise visual sobre o crescimento dos microrganismos, sendo que estes quando identificados visualmente eram transferidos para placas de petri com meio PDA no caso de fungos e meio Ágar Mueller – Hinton para bactérias.

3.9 Análise por Maldi – TOF dos microrganismos isolados.

O preparo de amostra para análise dos fungos endofíticos foi baseado no protocolo utilizado para a construção da biblioteca de microrganismos do Laboratório de Bioquímica Micro-molecular de Micro-organismos (LaBioMMi). Este protocolo, consiste em friccionar o material microbiano diretamente na placa de MALDI. Em seguida, cada microrganismo foi friccionado em doze *spots* do *sample target* (placa de aço ground steel MTP 384 Bruker Daltonics®) com auxílio de uma haste de madeira esterilizada. Quando todo o material fúngico está na placa, foram adicionados a cada *spot* uma solução contendo 1,0 µL da solução da matrix ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) na concentração de 20 mg.mL⁻¹ em solução de acetonitrila/ água com 1% de ácido tri-fluoracético (50/50, v/v). Após secar a temperatura ambiente, os espectros foram adquiridos em um espectrômetro de massas Bruker Autoflex speed (Bruker Daltonics, GmbH) equipado com o laser Smartbean II (355 nm) e controlado pelo *software* FlexControl (versão 3.3, Bruker Daltonics, GmbH). Os espectros foram adquiridos em modo linear positivo de aquisição de íon, à frequência máxima do laser (1000 Hz). A intensidade do laser foi ajustada de acordo com o padrão de calibração e os espectros foram adquiridos aleatoriamente em diferentes posições no *spot* por meio de movimento aleatório no modo automático de aquisição do *software* FlexControl. Uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 CHB, com 24 horas de incubação a 37 °C em meio Mueller Hinton ágar,

foi utilizada como padrão externo para calibração do instrumento, utilizando os íons m/z 4365,3; 5096,8; 5381,4; 6255,4 e 7274,5 Da. Foram adquiridos um total de 48 espectros para cada um dos microrganismos isolados.

Os dados adquiridos foram analisados por três softwares disponíveis. Primeiramente foi feita uma análise visual, utilizando o *software* FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, GmbH), no qual a reprodutibilidade, razão S/N, intensidade, e resolução foram analisadas com um maior acompanhamento. Os dados então foram processados automaticamente utilizando o *software* MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, GmbH), e finalmente comparados com a biblioteca Bruker Taxonomy e com a biblioteca interna do LaBioMMi.

3.10 Micro-cultivo dos fungos isolados

Em uma placa de petri com meio de cultura PDA, foi inoculado uma cepa de cada fungo já isolado e repicado uma vez, então foi sobreposta uma lamínula de vidro esterilizada em autoclave e etanol 70%. Após observar o crescimento (7 dias), a lamínula foi retirada e levada para a análise no microscópio eletrônico.

3.11 Metodologia utilizada para análise do extrato dos fungos isolados

A metodologia de cultivo dos fungos nos meios de arroz, milho e cevada e a posterior obtenção do extrato fúngico foram as mesmas empregadas nos itens 3. e 3.5, respectivamente.

Foi utilizado para análise um HPLC com detecção UV, SHIMADZU®, onde utilizou-se uma coluna Luna Phenyl hexyl 5 μm (150x 4.6 mm), a vazão foi de 0,8 mL/ min e o volume de amostra injetado foi de 20 μL . As condições de eluição foram feitas no modo gradiente onde a corrida começou com uma proporção de água acetoneitrila (85:15), chegando em 45 min com a proporção de água/ acetoneitrila (0:100), se mantendo por 10 min.. No tempo de corrida de 51min., a proporção de água/ acetoneitrila (80: 20) se mantendo por mais 9 min..

3.12 Produção em escala laboratorial de cerveja artesanal puro malte e com insumos de milho e arroz.

Nesta etapa do projeto foram produzidas as cervejas artesanais para a possível identificação de micotoxinas. Cada cerveja artesanal possuía um tempo de duração de produção de 15 dias, que são divididos em: 1 dia de produção do mosto, 7 dias de fermentação e 7 dias de maturação. Foram desenvolvidas ao total 9 produções de cerveja.

Na primeira etapa de início de produção da cerveja, os grãos de cevada foram moídos para deixar o seu amido contido no seu interior exposto. Um moedor específico de 3 rolos foi utilizado pois ele foi capaz de quebrar a casca do grão sem destruí-lo.

Quando insumos, que não tem seu amido previamente gelatinizado, como milho e arroz utilizados na produção de cerveja é necessário que seja realizada parte da cocção dos adjuntos em uma tina separada da tina de sacarificação do mosto. Nessa etapa deve-se ocorrer o cozimento dos insumos adicionando 10% da sua massa em malte de cevada até a temperatura de gelatinização do amido do adjunto utilizado (arroz 82 °C e milho 78 °C) durante 30 min, em seguida ele deve ser fervido por mais 30 min e, posteriormente, esse adjunto deve ser adicionado à tina de sacarificação do mosto.

Na primeira do processo, a etapa de brasagem, os insumos utilizados foram, água, malte de cevada, lúpulo e os cereais não maltados, nesse caso milho e flocos de arroz. A água utilizada na produção é a água mineral de poço artesiano doada pela empresa Refrigerantes São Carlos® de São Carlos - SP, o malte de cevada utilizado é o tipo Pilsen proveniente da produtora de malte alemão Bindewald®, a levedura de baixa fermentação utilizada no processo fermentativo é a SafLager™ W34/70 da empresa francesa Fermentis®, ambos foram doados pela empresa Rohbrau® de Piracicaba – SP. Todos os insumos são estocados no laboratório de RMN em condições adequadas de temperatura e humidade, pois o projeto de cerveja foi desenvolvido em conjunto com o aluno de mestrado Rafael Esteves, orientado do Prof. Dr. Gilberto Ferreira.

As cervejas produzidas durante o projeto possuíram a proporção de malte de cevada e adjuntos conforme descrito na TABELA 4, a seguir.

TABELA 4- PROPORÇÃO DE CEREAIS NAS PRODUÇÕES DE CERVEJA.

Produção	Malte de Cevada	Flocos de arroz	Milho
1	100	0	0
2	85	0	15
3	70	0	30
4	55	0	45
5	85	15	0
6	70	30	0
7	55	45	0
8	80	10	10
9	60	20	20

Na etapa de sacarificação do mosto utilizamos duas temperaturas para a cocção malte, sendo 45 °C e 67 °C, ambos durante 30 minutos. Por último a temperatura foi elevada para 78 °C para garantir a desnaturação das enzimas e finalizar o processo de sacarificação do amido. Após a finalização deste processo, damos início ao processo de clarificação.

Esse procedimento de sacarificação consiste em passar água a 80 °C na massa de malte para extrair os açúcares residuais e aumentar o rendimento do processo. Após esse procedimento, conhecido como lavagem do malte, a água de lavagem e o primeiro mosto são misturados e é iniciado o processo de fervura.

O procedimento de fervura do mosto possui uma duração total de 60 min a partir do momento em que o mosto entra em ebulição. E neste momento também onde ocorre a adição do lúpulo. São utilizados 8 g de lúpulo por produção e este é adicionado em duas partes iguais: nos tempos zero e cinquenta minutos de fervura. O lúpulo utilizado na produção será do tipo *Hallertauer Tradition* com 5,7% de alfa ácidos.

Quando o processo de fervura foi finalizado, iniciou-se o *whirlpool* e posteriormente a refrigeração do mosto. Após toda a decantação, o mosto foi separado dos resíduos provenientes do lúpulo, resfriado e enviado para o fermentador. Na produção em escala laboratorial, a etapa de resfriamento foi realizada utilizando-se banho de gelo.

O mosto foi resfriado para aproximadamente 10 °C e 2,5 L dele foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 3 L previamente esterilizado e em seguida adicionadas 1,44 g de levedura ao mosto, que é cuidadosamente homogeneizado. O Erlenmeyer tem a sua abertura fechadas com plástico filme de pvc e é levado para a geladeira com controlador de temperatura ajustado para 12 °C, durante 7 dias.

Nestes 7 primeiros dias, temos a etapa de fermentação onde uma parte dos açúcares são transformados em álcool pelas leveduras. Após esta etapa, a cerveja fica em seu período de maturação por mais 7 dias a uma temperatura controlada de 5°C.

A coleta de amostra foi feita transferindo 50 mL da cerveja para um tubo Falcon® que foi centrifugado à 10 mil RPM com temperatura controlada à 5°C, retira-

se o sobrenadante e o dividindo em tubos Eppendorf® de 15 mL que foram nomeados e alocados no freezer do laboratório para posterior análise.

3.13 Preparação das Amostras de Cerveja

Todas as cervejas produzidas seguiram o seguinte procedimento de extração adaptado de RUBERT *et. al* (2011a). Aproximadamente 10,0 mL de cerveja foi de-gaseificada por 25,0 min. em um banho de ultrassom. O condicionamento do cartucho de extração SPE (do inglês, solid phase extraction) foi feito 5,0 mL de acetonitrila/ metanol (50:50 v/v) e 5,0 mL de água ultra purificada. Foi adicionado então ao cartucho 10,0 mL de cerveja e em seguida este foi lavado com 5,0 mL de água ultra purificada. Os cartuchos foram secos com auxílio de uma bomba de vácuo por 30,0 min.. A eluição das substâncias presentes na cerveja foi realizada com uma solução de 4,0 mL de acetonitrila/ metanol (50:50, v/v), em seguida, o extrato foi transferido para um tubo de ensaio de 15,0 mL, no qual toda solução foi evaporada com auxílio do dry-block á 35°C e fluxo de ar. A amostra foi reconstituída com metanol/ água (50:50, v/v), filtrada por filtro de nylon 0,20 µm, evaporada e reconstituída novamente com 1,0 mL da solução metanol/água (50:50, v/v) no vial. As análises foram realizadas por HPLC-MS/MS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das Substâncias de Interesse

No início do trabalho foram cultivados os fungos *Fusarium oxysporum* (FO), *Fusarium graminearum* 728 (FG-728), *Fusarium graminearum* 729 (FG-729), *Fusarium graminearum* 730 (FG-730) e *Fusarium graminearum* 732 (FG-730) e *Aspergillus flavus* (AF), para observar os metabólitos secundários produzidos por estes e como principal objetivo verificar quais micotoxinas poderiam ser encontradas frente a diferentes fontes de insumos (malte de cevada, milho e arroz) na qual são utilizadas comumente na produção de cerveja.

Após o processo de extração dos compostos produzidos pelos fungos, foram obtidas as seguintes massas de extratos para os diferentes microrganismos, como pode ser observado nos gráficos abaixo:

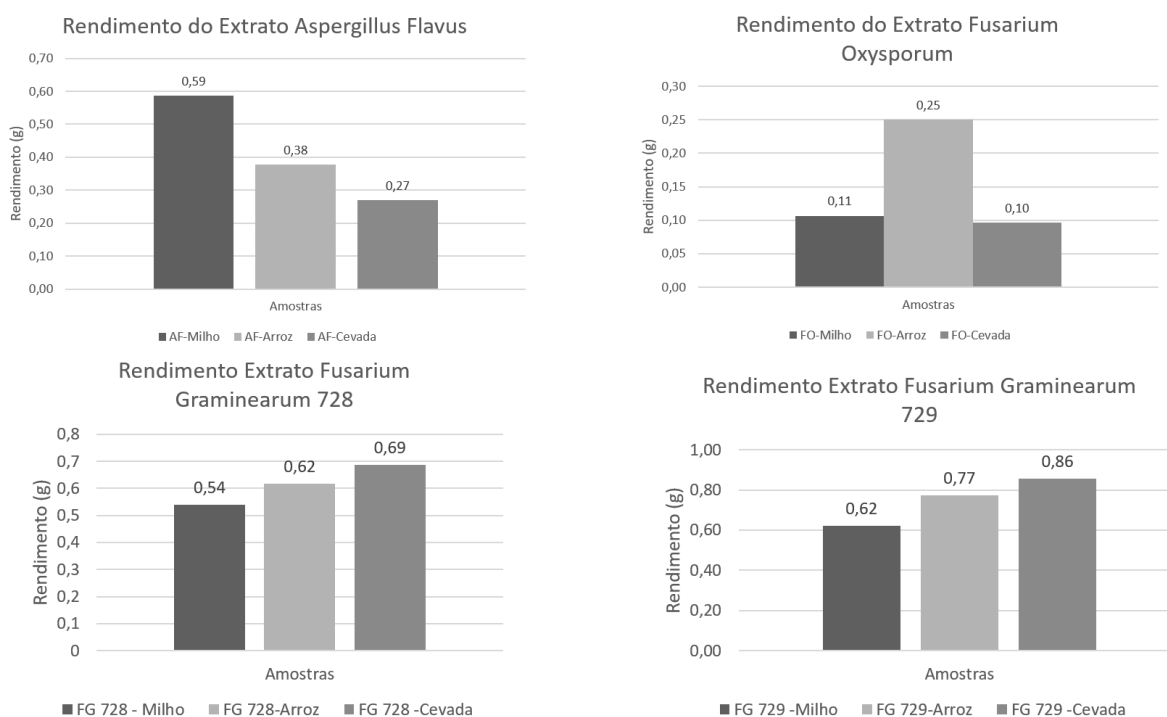


FIGURA 15 - RENDIMENTO EXTRATOS DOS FUNGOS E EXTRATO DO MEIO DE CULTIVO.

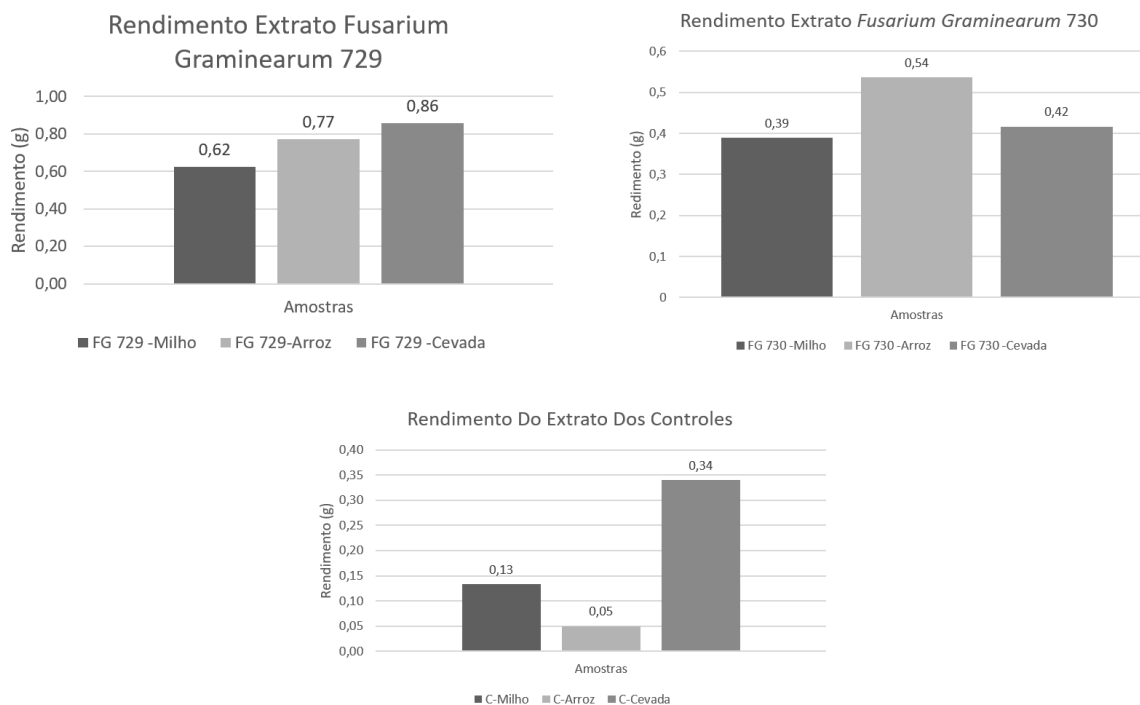


FIGURA 16 - RENDIMENTO EXTRATOS DE FUNGO E EXTRATO O MEIO DE CULTIVO.

Como pode ser observado na FIGURA 14, o maior rendimento do extrato obtido pelo cultivo do fungo *Aspergillus Flavus*, foi utilizando como substrato o cereal de milho, seguido do cereal de arroz e do grão de cevada maltada. Em relação ao fungo *Fusarium Oxysporum*, o substrato de arroz foi o que obteve um melhor rendimento, seguido do de milho e arroz, sendo que estes possuem uma diferença muito próxima. Quando comparadas as quatro cepas de *Fusarium Graminearum*, temos que o extrato obtido para os microrganismos *Fusarium Graminearum* 728 e 729 cultivados em cevada maltada foram os maiores, seguidos das cepas que foram cultivadas em arroz e milho. As outras duas cepas de *Fusarium Graminearum* 730 e 732 FIGURA 15, mostraram-se produzir um maior rendimento de extração para o substrato de arroz, seguido do substrato de cevada e milho, que também mostram resultados muito próximos. Isso mostra que o Fungo *Aspergillus Flavus* se desenvolveu melhor sob as fontes de nutrientes provenientes do substrato de milho e as cepas de *Fusarium Oxysporum*, *Fusarium Graminearum* 730 e 732, sob substrato de arroz. Já as outras duas cepas de *Fusarium Gramineraum* 728 e 729 mostrou-se um maior rendimento sob as condições da cevada maltada.

Quando comparados com os extratos obtidos a partir dos controles observa-se que todos os extratos dos fungos (com exceção dos extratos de cevada e

milho para o fungo *Fusarium oxysporum* e o extrato de cevada para o fungo *Aspergillus flavus*) obtiveram um rendimento acima do extrato dos cereais, mostrando uma extrema habilidade desses microrganismos se desenvolverem nestes tipos de insumos, quando possuem condições ambientais favoráveis.

Além disso, esse estudo de crescimento dos microrganismos sob diferentes meios de cultivo em estado sólido foi para verificar qualitativamente se estes conseguiam sob as condições de cultivo, produzir as suas micotoxinas. Portanto, para determinar as micotoxinas produzidas por estes microrganismos foram utilizados dois métodos cromatográficos, um para as amostras que continham os extratos dos fungos das cepas de *Fusarium sp.* e outra para as amostras dos extratos de *Aspergillus flavus*.

4.2 Análises dos extratos em diferentes meios de cultivo dos fungos *Fusarium graminearum* 728, 729, 730, 732 e *Fusarium oxysporum*.

Inicialmente foram feitas as análises das amostras com o fungo *Fusarium oxysporum*, cultivados em diferentes meios, para verificar se estes produziam as micotoxinas de interesse. Por meio das análises por UPLC-PDA e utilizando padrões das micotoxinas Deoxinivalenol, Nivalenol, Iso-deoxinivalenol e Zearalenona, observando os tempos de retenção dos padrões, e os espectros no ultravioleta destas moléculas não foi possível observar a produção destas pelo fungo, como pode ser visto pelas FIGURAS 16 e 17.

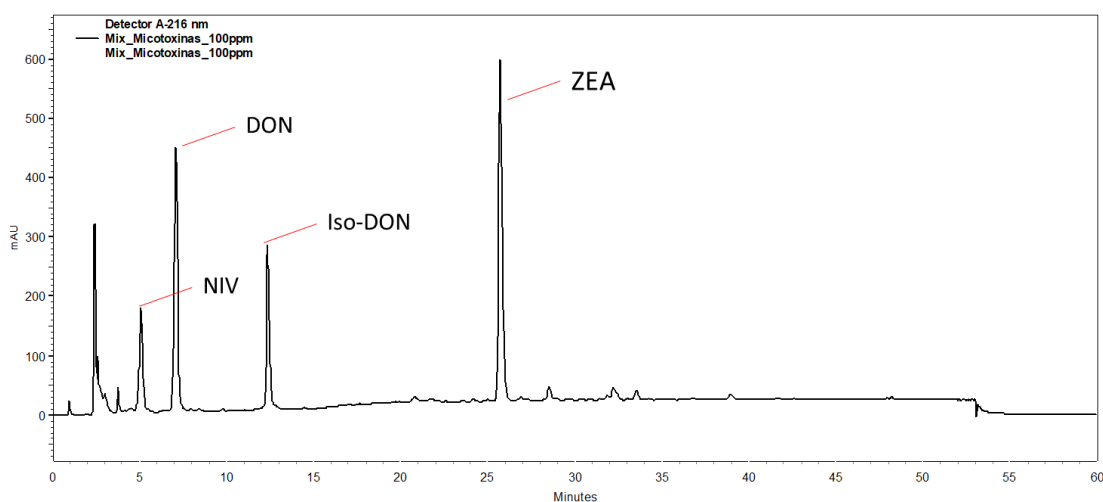


FIGURA 17: CROMATOGRAMA PADRÃO COM MIX DE 100 PPM, PARA OS COMPOSTOS DEOXINIVALENOL, NIVALENOL, ISO-DEOXINIVALENOL E ZEARELENONA.

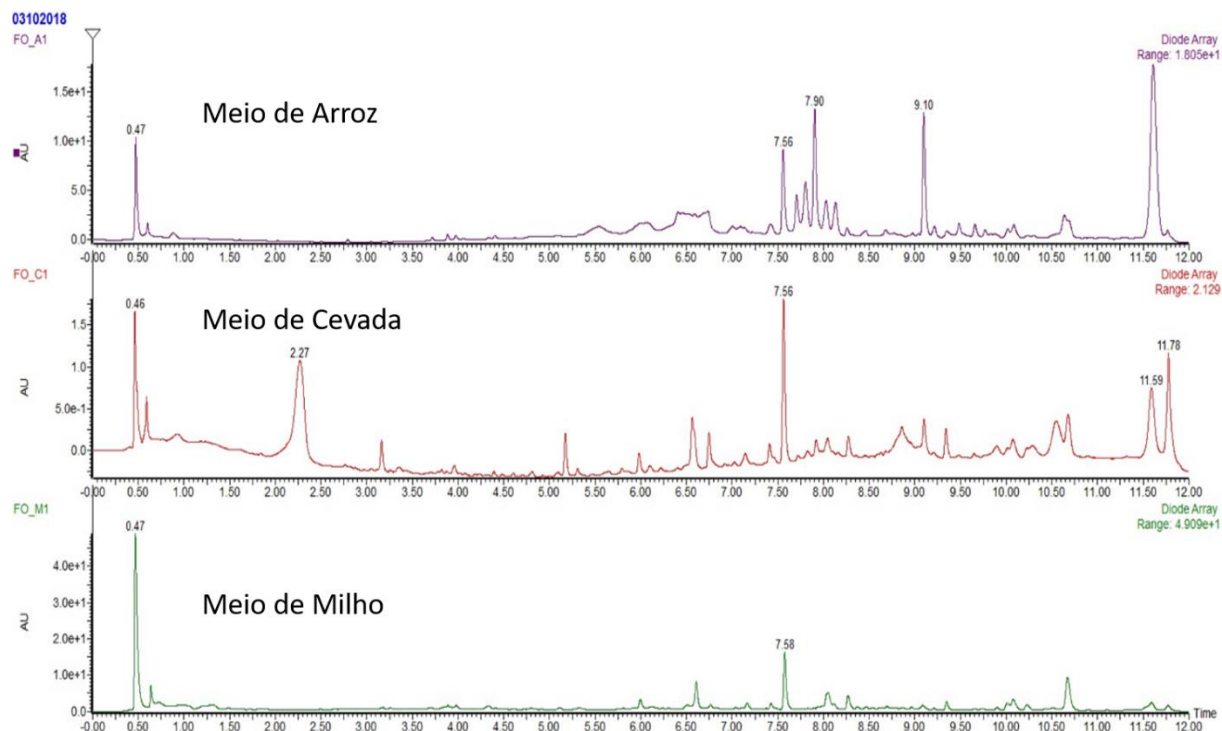


FIGURA 18: CROMATOGRAMAS PARA AS AMOSTRAS DO FUNGO *FUSARIUM OXYSPORUM* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.

A não identificação destas moléculas nos extratos em que o fungo *Fusarium oxysporum* foi cultivado pode ter sido devido a forma estrutural destas moléculas pois não apresenta bons grupos cromóforos, o que não leva a ocorrer uma excitação não eficiente na identificação destas moléculas por UPLC-PDA.

Porém quando estas amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, foi possível identificar utilizando a uma outra micotoxina, produzida por alguns fungos do gênero *Fusarium*, denominada Fumonisina B2, nas amostras de milho e cevada, como pode ser observado na tabela abaixo. Como as análises foram feitas no modo de aquisição por MRM do inglês “Multiple Reaction Monitoring”, abaixo encontrasse as FIGURAS 19 e 20 respectivamente referentes aos cromatogramas das transições da TABELA 5.

TABELA 5- FUMONISINA B2

Amostra	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção
FO-M	706.1/ 336.1	12,57	706.1/ 318.1	12,56
FO-C	706.1/ 336.1	12,57	706.1/ 318.1	12,58

Legenda: (FO-M) *Fusarium oxysporum* – Milho

(FO-C) *Fusarium oxysporum* – Cevada

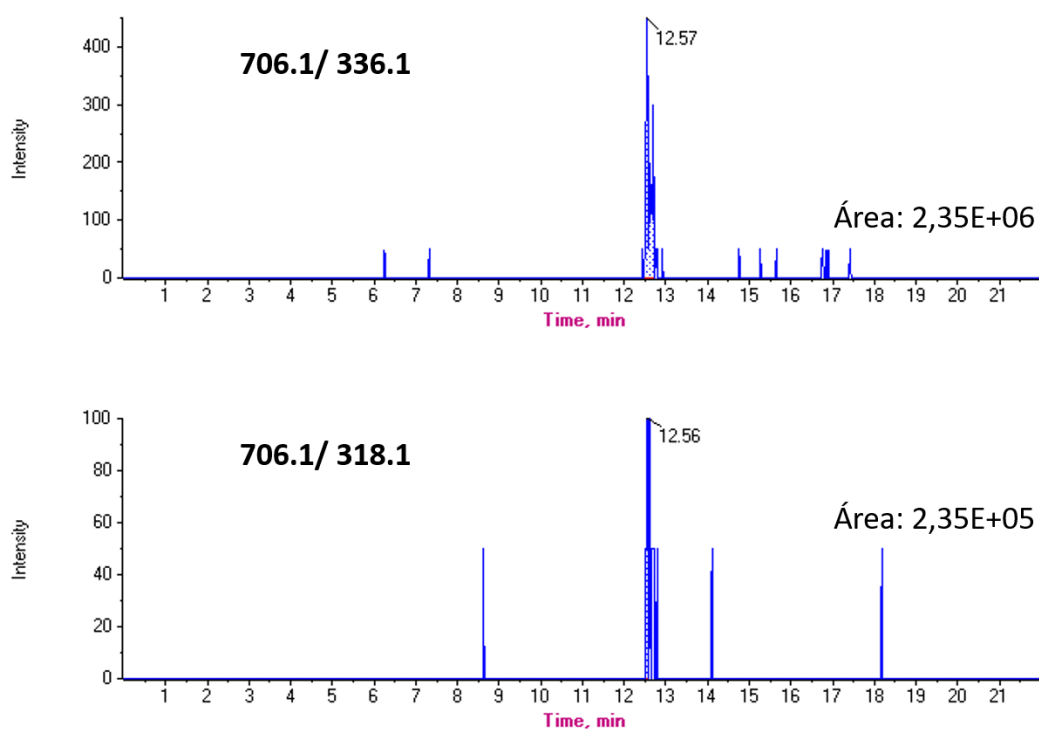


FIGURA 19 - MRM DAS TRANSIÇÕES REFERENTES AO FO-M.

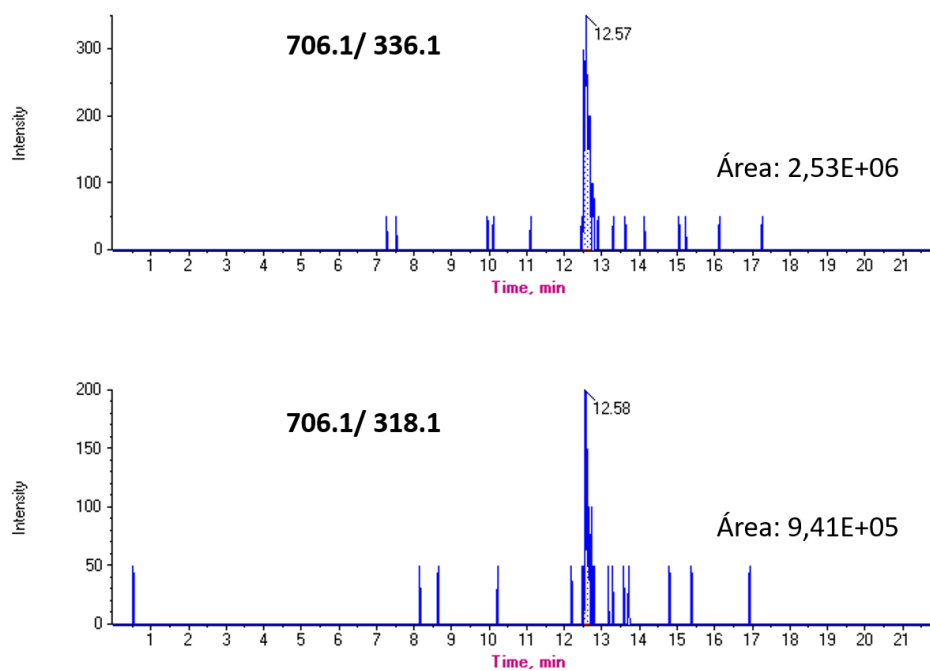


FIGURA 20 - MRM DAS TRANSIÇÕES REFERENTES AO FO-C.

As fragmentações responsáveis pelas transições, são mostradas abaixo pela FIGURA 18.

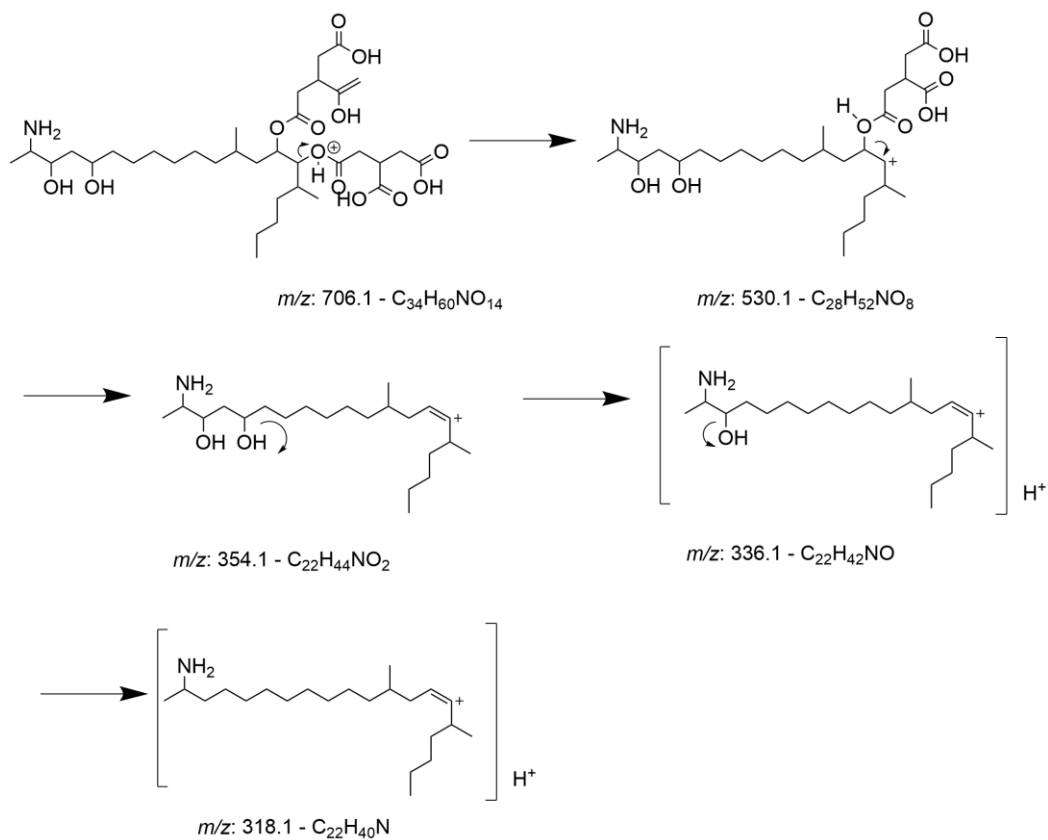


FIGURA 21 - FRAGMENTAÇÕES DA MOLÉCULA FUMONISINA B2.

Em relação aos outros microrganismo *Fusarium graminearum* 728, foi possível observar a produção de Zearalenona, pela técnica de detecção UV na amostra de onde o fungo *Fusarium graminearum* 728, cresceu sob a influência do meio de milho, como pode ser observado na FIGURA 23, onde é possível comparar o tempo de retenção do padrão em torno de 25,9 min. com o cromatograma da amostra onde o fungo *Fusarium geminearum* 728 cresceu. Quando as amostras foram analisadas por espectrometria de massas foi possível observar a produção da molécula de zearalenona nas amostras onde o fungo cresceu sob a influência do meio de cevada. Já o fungo *Fusarium graminearum* 732, foi observada a produção desta micotoxina nos substratos de milho e cevada, como observado na FIGURA 23, 24, 25, 26 além da TABELA 6. Apesar de se ter em muitas literaturas a produção desta micotoxinas nestes tipos de insumos, fica evidenciado que em condições apropriadas o fungo se desenvolve e produz este tipo de moléculas quando contaminam estes tipos de cereais.

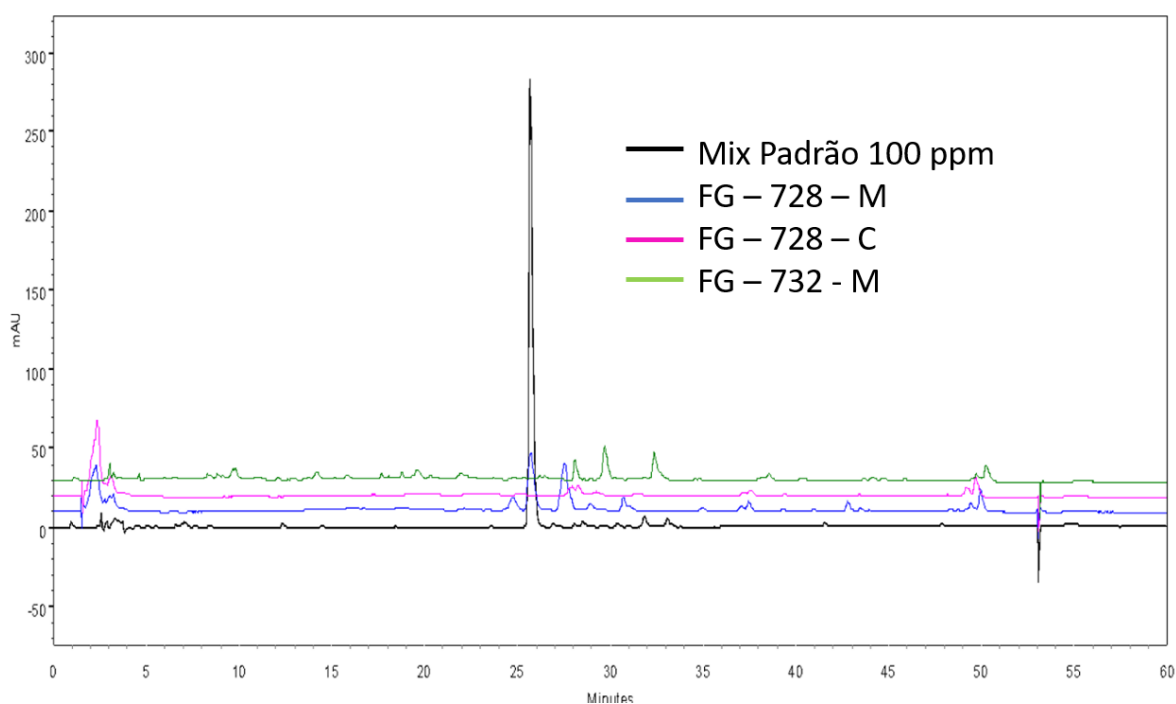


FIGURA 22: CROMATOGRAMAS ZEARALENONA.

Legenda: (FG – 728 - M) *Fusarium graminearum* 728 – Milho

(FG – 728 -C) *Fusarium graminearum* 728 - Cevada

(FG – 732 - M) *Fusarium graminearum* 732 – Milho

TABELA 6 - ZEARALENONA

Amostra	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção
FG-728 -M	319.1/ 301.2	10,83	319.1/ 231,3	10,82	319.1/ 189.2	10,83
FG-728 -C	319.1/ 301.2	10,82	319.1/ 231,3	10,82	319.1/ 189.2	10,81
FG-732-M	319.1/ 301.2	10,81	319.1/ 231,3	10,81	319.1/ 189.2	10,81
FG-732-C	319.1/ 301.2	10,80	319.1/ 231,3	10,83	319.1/ 189.2	10,81

Legenda: (FG – 728 - M) *Fusarium graminearum* 728 – Milho

(FG – 728 -C) *Fusarium graminearum* 728 - Cevada

(FG – 732 - M) *Fusarium graminearum* 732 – Milho

(FG – 732 -C) *Fusarium graminearum* 732 – Cevada

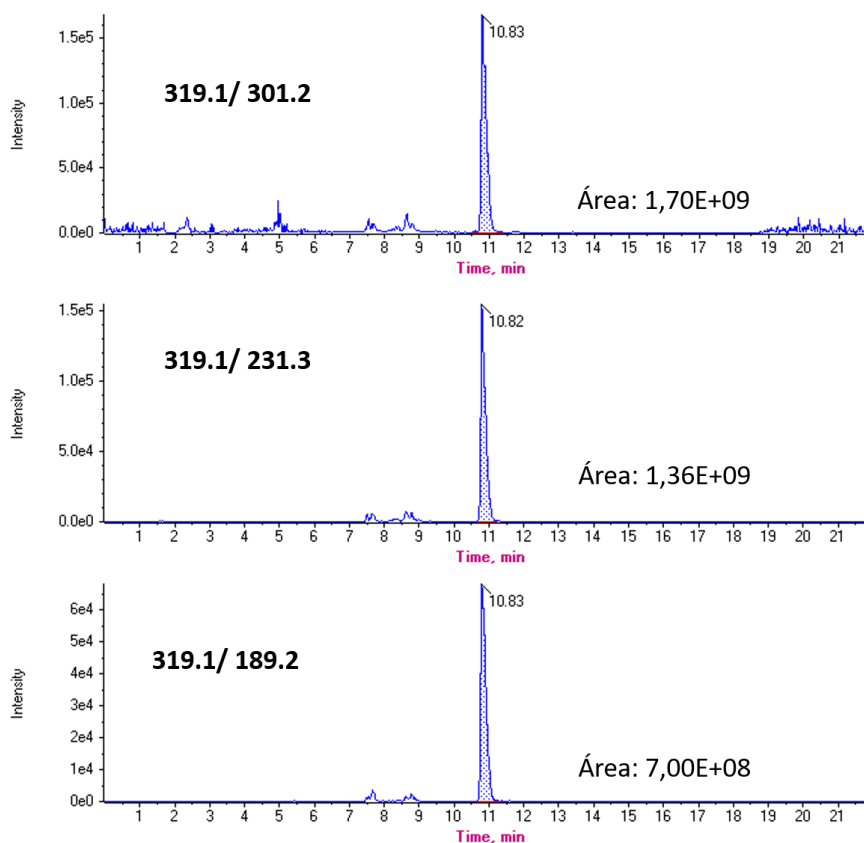


FIGURA 23 - MRM DA ZEARALENONA REFERENTE AO FG-728-M.

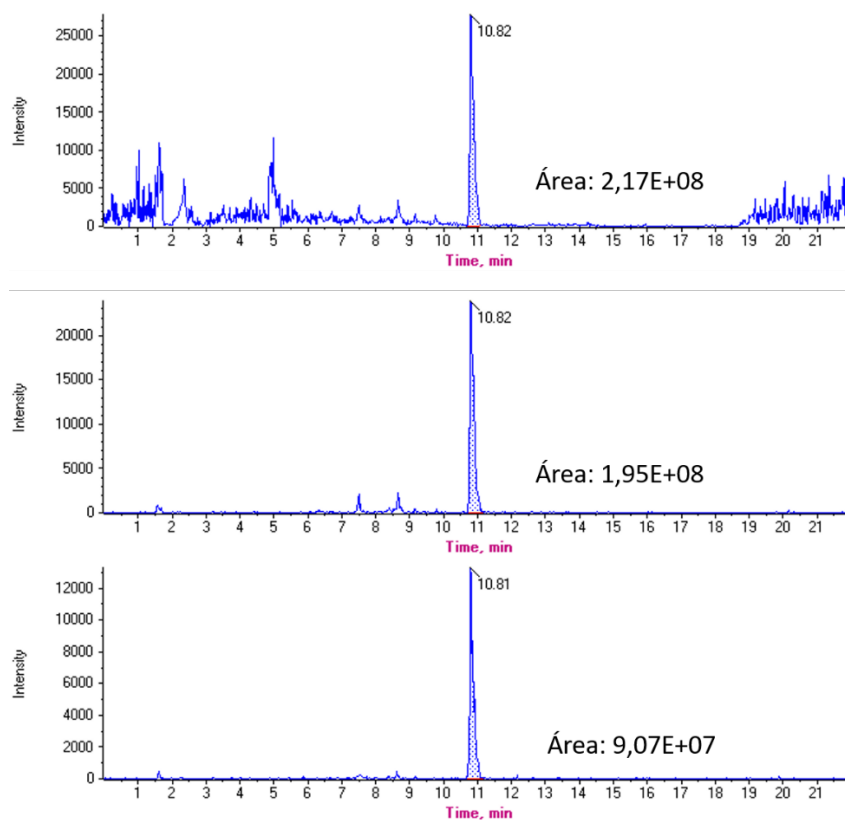


FIGURA 24 - MRM DA ZEARALENONA REFERENTE AO FG-728-C.

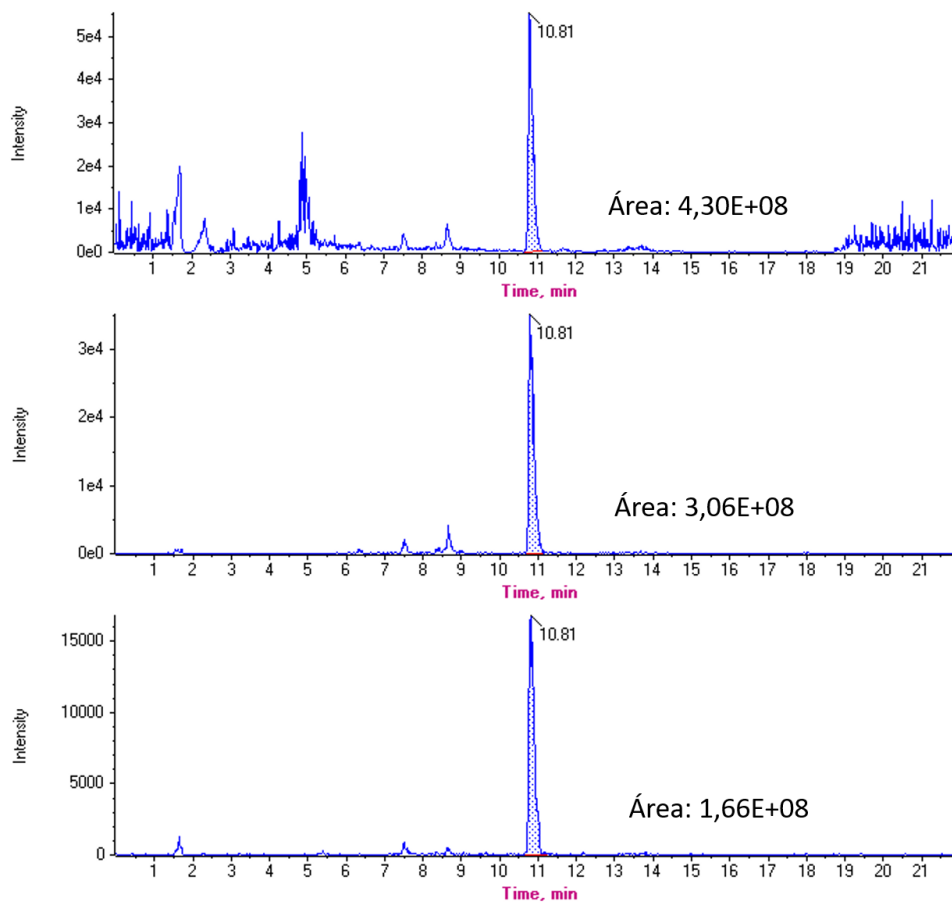


FIGURA 25 - MRM DA ZEARALENONA REFERENTE AO FG-732-M.

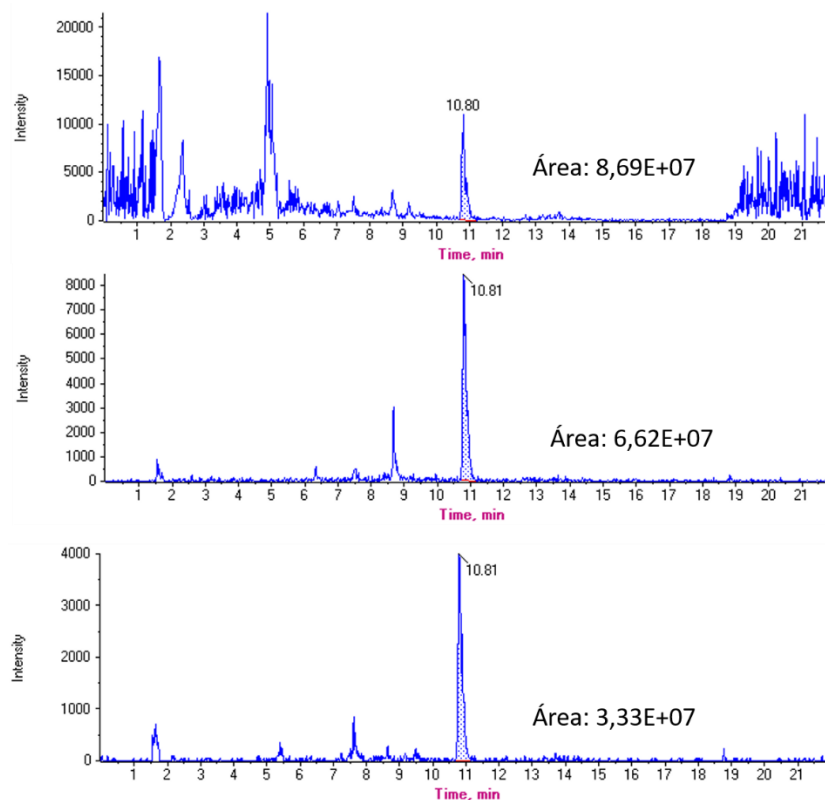


FIGURA 26 - MRM DA ZEARALENONA REFERENTE AO FG-732-C.

As fragmentações responsáveis pelas transições são mostradas abaixo.

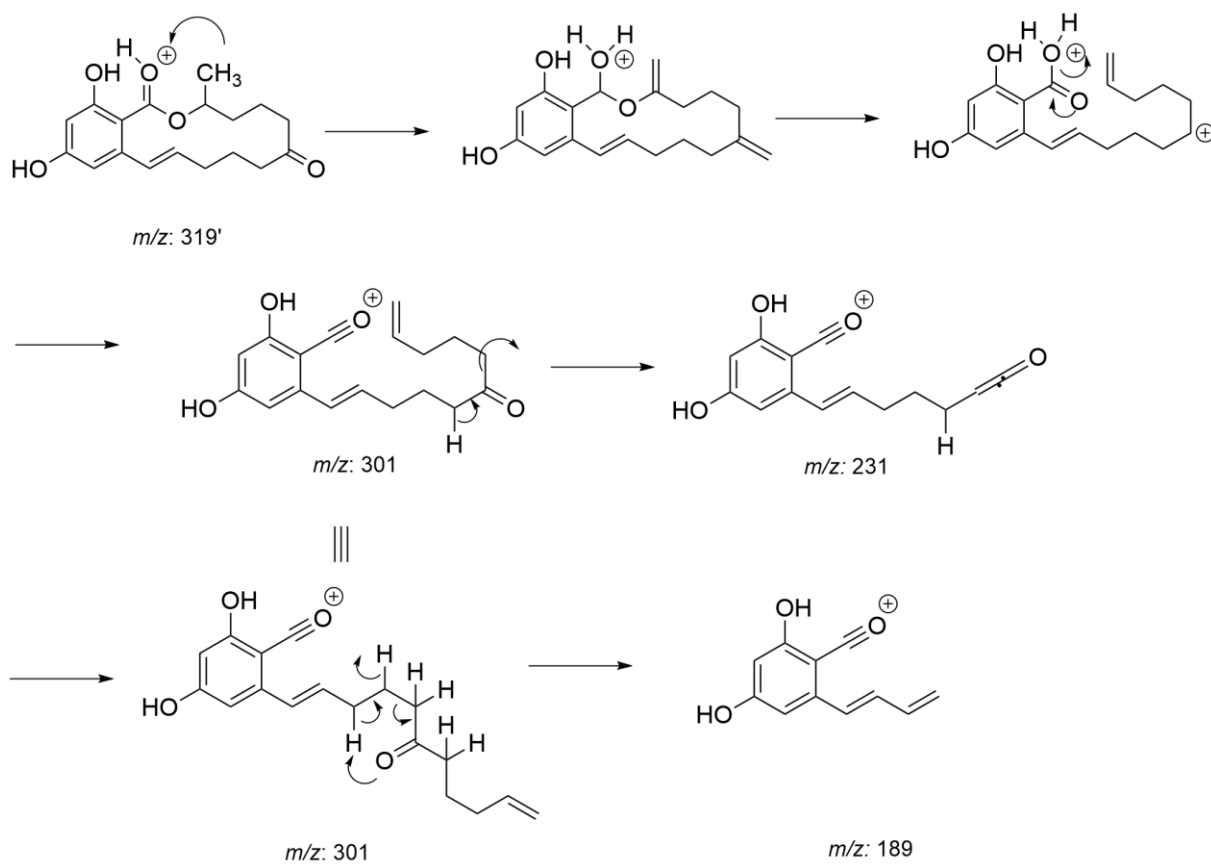


FIGURA 27 - FRAGMENTAÇÕES ZEARALENONA.

Já a espécie de *Fusarium graminearum* 729, produziu zearalenona somente no meio de cultivo de milho, como é mostrado abaixo pela FIGURA 28 e TABELA 7. A molécula foi confirmada pelo tempo de retenção comparado ao padrão e também em relação as transições obtidas pelo experimento de MRM. Em relação a espécie de *Fusarium graminearum* 730 não observou nenhuma produção de micotoxinas.

TABELA 7 - ZEARALENONA

Amostra	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção
FG-729 –M	319.1/ 301.2	10,81	319.1/ 231,3	10,82	319.1/ 189.2	10,82

Legenda: (FG – 729 - M) *Fusarium graminearum* 729 – Milho

(FG – 732 - M) *Fusarium graminearum* 732 – Milho

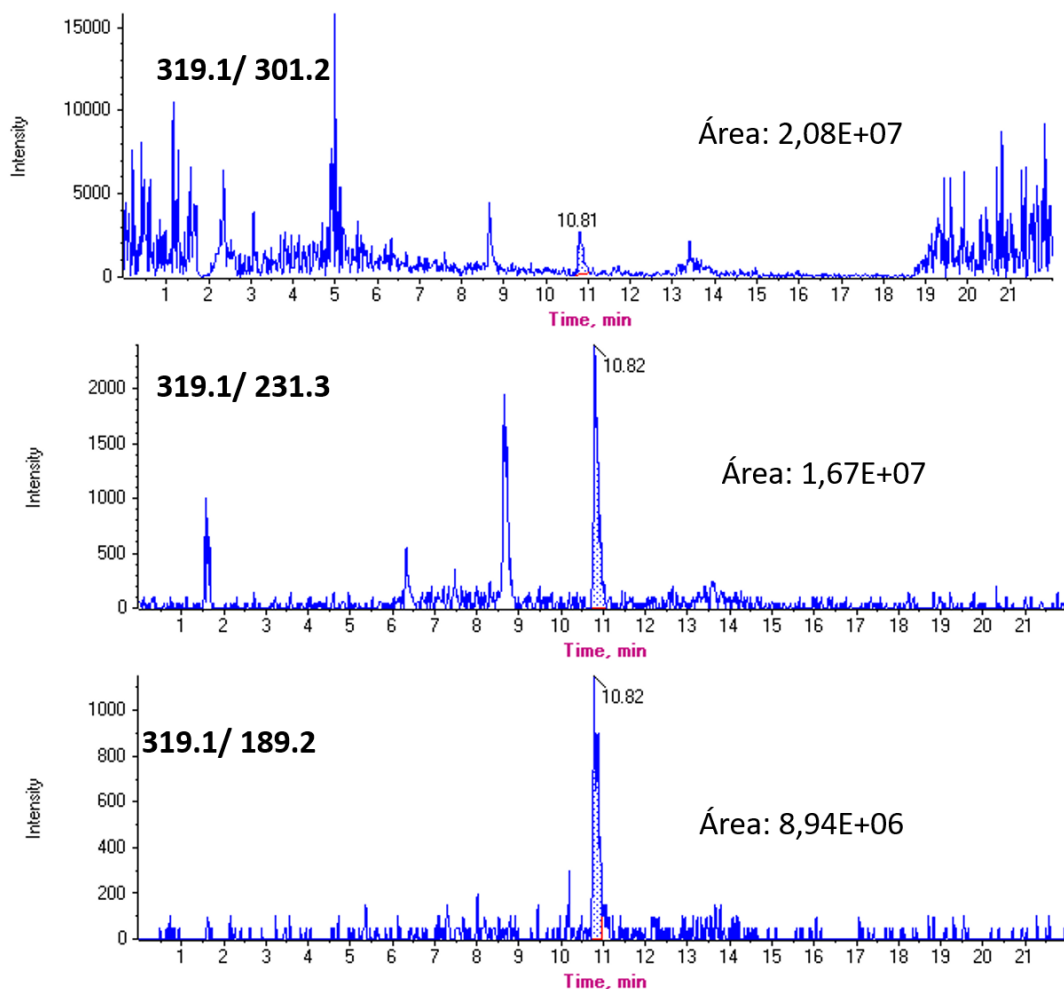


FIGURA 28 - MRM DA ZEARALENONA REFERENTE AO FG-729-M.

Além disso foi possível observar a produção de outros micóestrogênios produzidos pela biossíntese dos espécimes de *Fusarium graminearum* 728 e 732, como a Zearalanona encontrado no substrato de milho, que estes apesar de não utilizar padrões para confirmar as moléculas foram utilizadas além do íon precursor m/z : 321, foram utilizadas as transições m/z : 321/189 de confirmação e m/z : 321/303 de quantificação, como mostrado na TABELA 8, comprovando a existência da molécula. Os cromatogramas dos MRMs utilizados e as fragmentações responsáveis pelas transições também são mostradas abaixo nas FIGURAS 29, 30 e 31 respectivamente.

TABELA 8-ZEARALANONA

Amostra	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção
FG-728-M	321.1/ 189.0	10.77	321.1/ 303.0	10.78
FG-732-M	321.1/ 189.0	10.76	321.1/ 303.0	10.78

Legenda: (FG – 728 - M) *Fusarium graminearum* 729 – Milho

(FG – 732 - M) *Fusarium graminearum* 732 – Milho

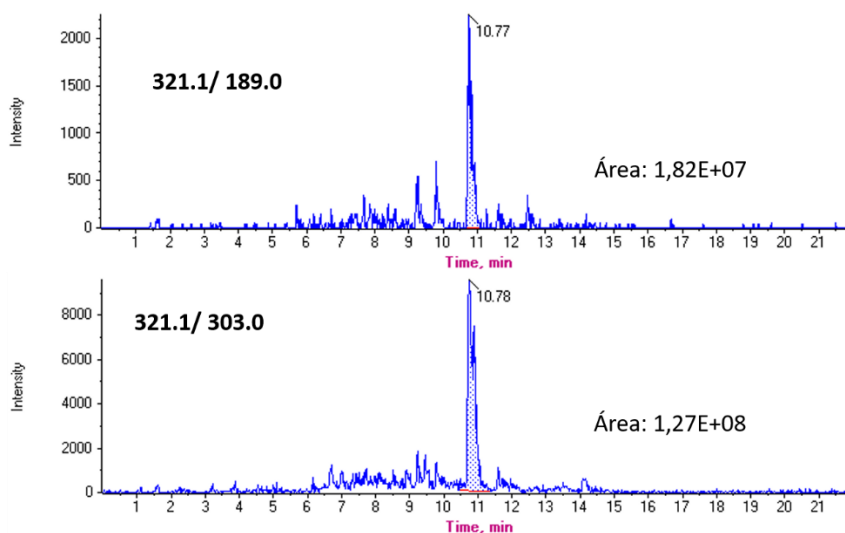


FIGURA 29 - MRM DA ZEARALANONA REFERENTE AO FG-728M.

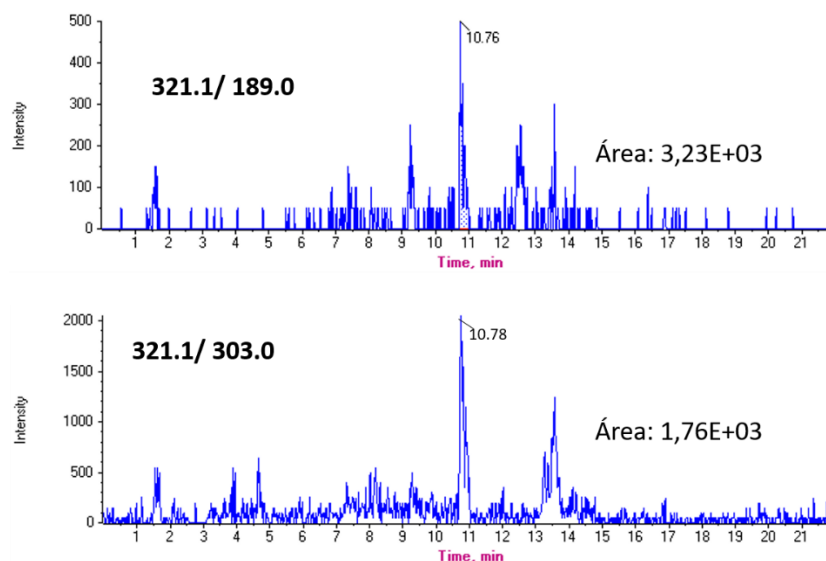


FIGURA 30 - MRM DA ZEARALANONA REFERENTE AO FG-732-M.

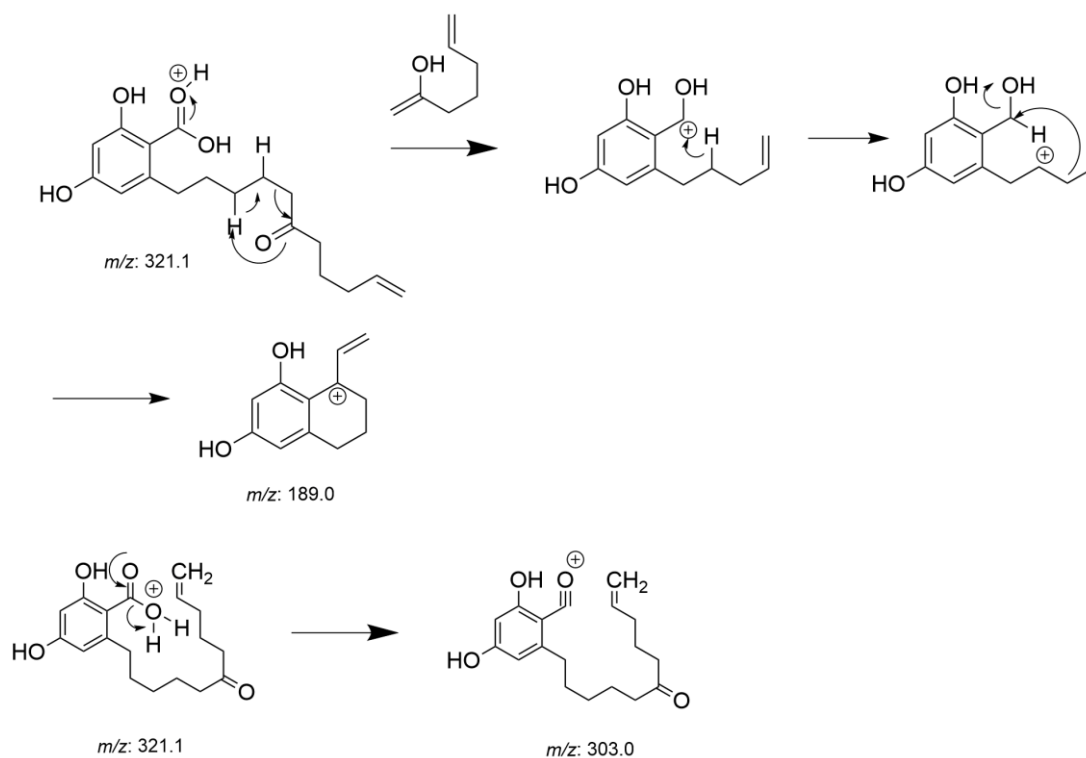


FIGURA 31 - FRAGMENTAÇÕES ZEARALANONA.

Já os fungos *Fusarium graminearum* 728, 729 e 732, como mostrado na TABELA 10, produziram outro mico-estrógeno o Zearalenol, no substrato de cevada também. A diferenciação dos isômeros não foi possível devido à falta de padrões das moléculas e por não termos certeza de que no método cromatográfico ocorreria a separação dos isômeros. Os cromatogramas de MRM estão mostrados nas FIGURA 33, 34 e 35, além de algumas informações sob os possíveis fragmentos monitorados são mostrados na FIGURA 36.

TABELA 9 - ZEARALENOL.

Amostra	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção
FG-728-C	321 / 285	9,24	321 / 303	9,24
FG-729-C	321 / 285	9,23	321 / 303	9,19
FG-732-C	321 / 285	9,24	321 / 303	9,25

Legenda: (FG – 728 - C) *Fusarium graminearum* 728 – Cevada

(FG – 729 - C) *Fusarium graminearum* 729 – Cevada

(FG – 732 - C) *Fusarium graminearum* 732 – Cevada

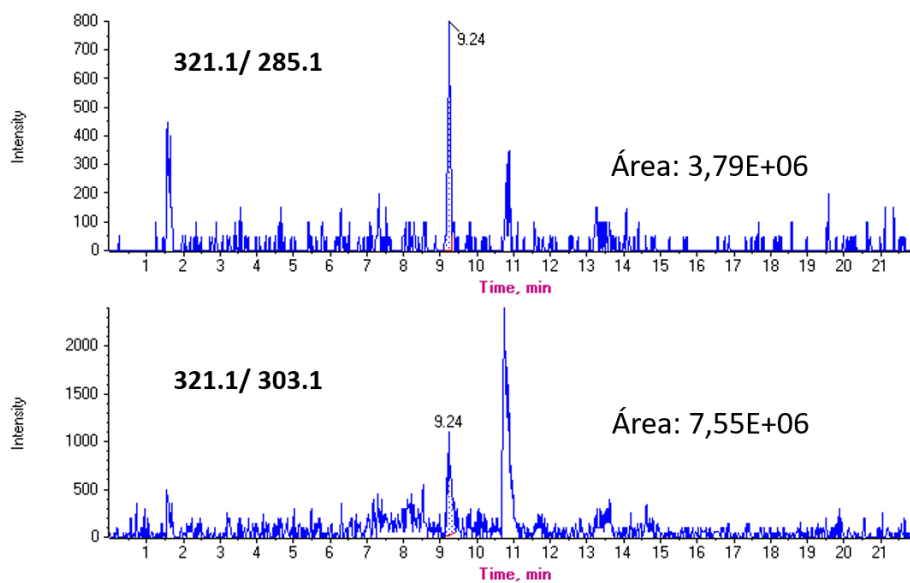


FIGURA 32 - MRM REFERENTE AO ZEARALENOL PRODUZIDO PELO FUNGO FG-728-C.

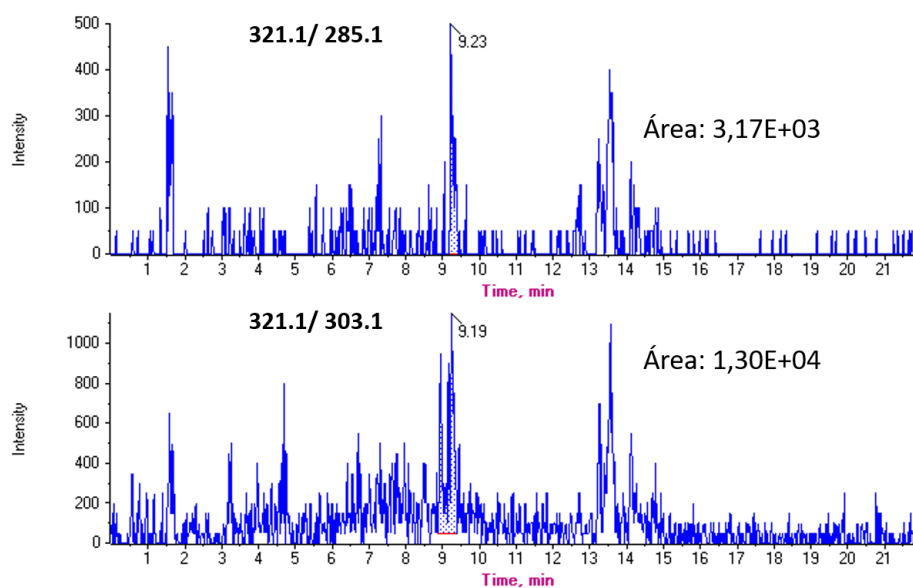


FIGURA 33 - MRM REFERENTE AO ZEARALENOL PRODUZIDO PELO FUNGO FG-729-C.

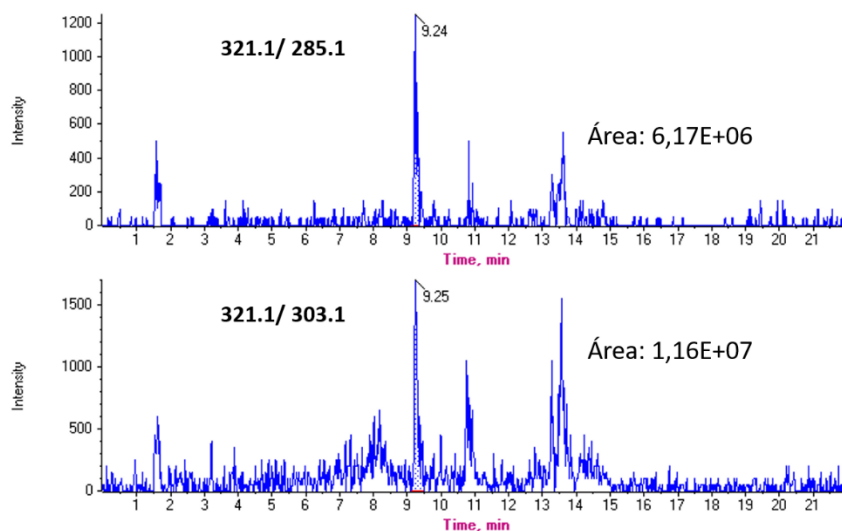


FIGURA 34 - MRM DO ZEARALENOL REFRENTE AO FUNGO FG-732-C.

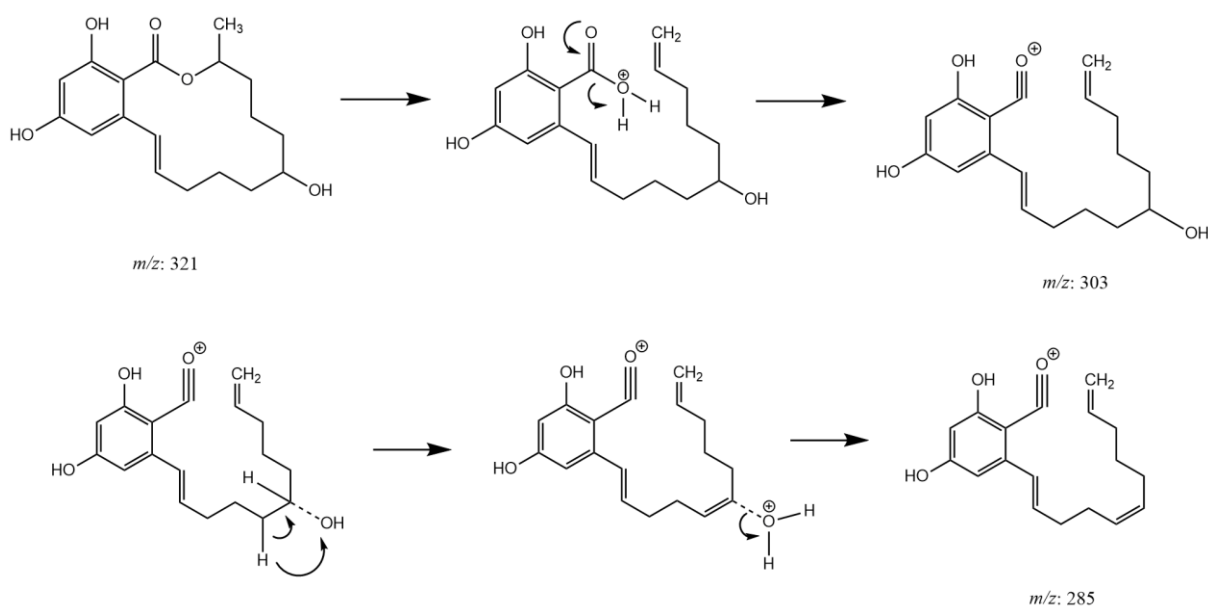


FIGURA 35 - FRAGMENTAÇÕES DO ALFA - ZEARALENOL.

Outro composto observado foi o Nivalenol, encontrado nas amostras de milho e arroz para o fungo *Fusarium graminearum* 728 e na amostra de cevada para o fungo *Fusarium graminearum* 732, que pode ser observado no TABELA 11.

TABELA 10- NIVALENOL

Amostra	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção
FG-728 –M	311.1/ 281.1	3,21	313.1/ 233.2	3,21	313.1/ 191,1	3,22
FG-728 – A	311.1/ 281.1	3,21	313.1/ 233.2	3,23	313.1/ 191,1	3,19
FG-732 - C	311.1/ 281.1	3,19	313.1/ 233.2	3,21	313.1/ 191,1	3,21

Legenda: (FG – 728 - M) *Fusarium graminearum* 728 – Milho

(FG – 728 - A) *Fusarium graminearum* 728 – Arroz

(FG – 732 - C) *Fusarium graminearum* 732 – Cevada

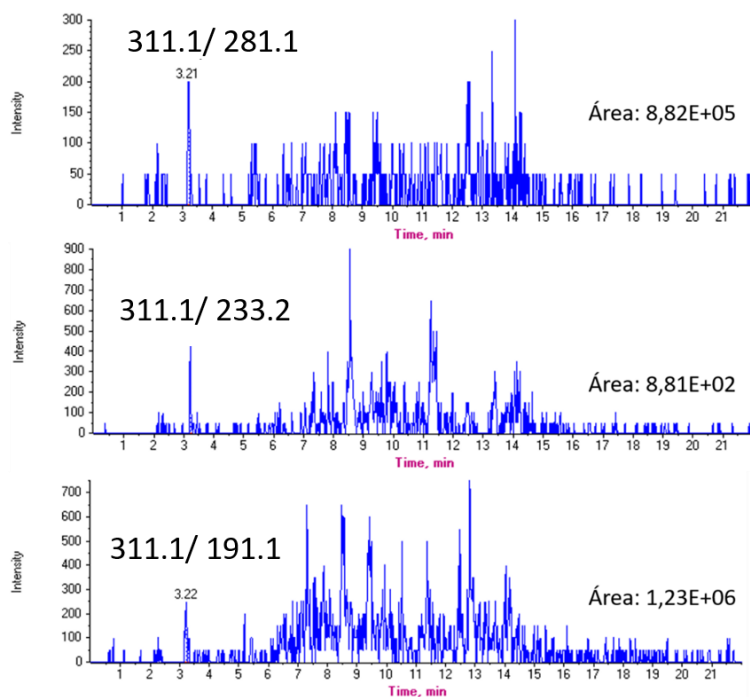


FIGURA 36 - MRM REFRENTE AO NIVALENOL DO FUNGO FG-728-M.

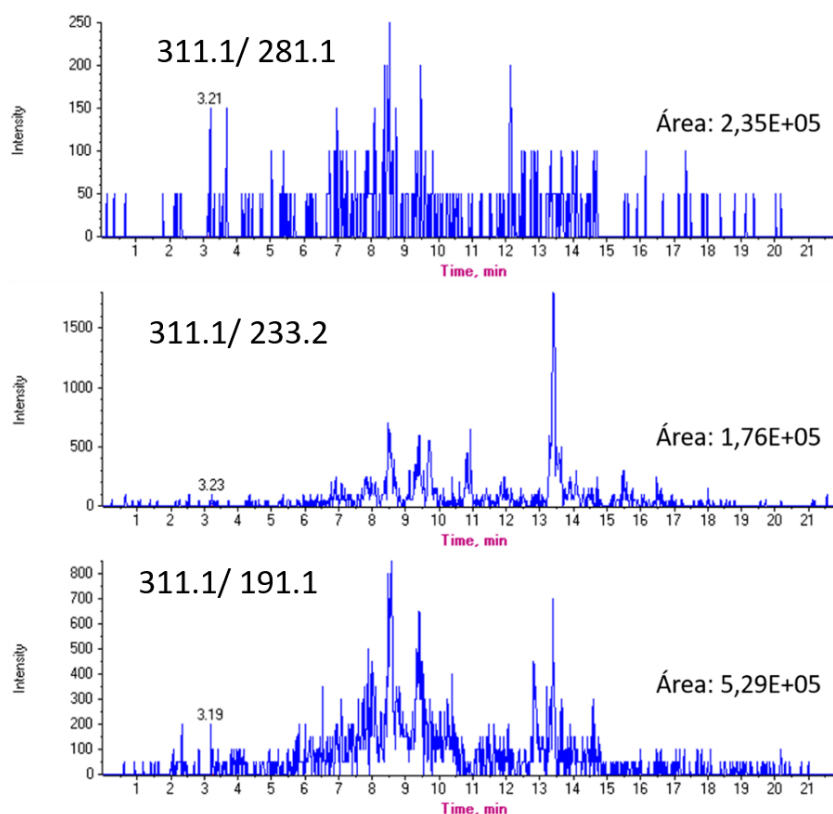


FIGURA 37 - MRM REFRENTE AO NIVALENOL DO FUNGO FG-728-A.

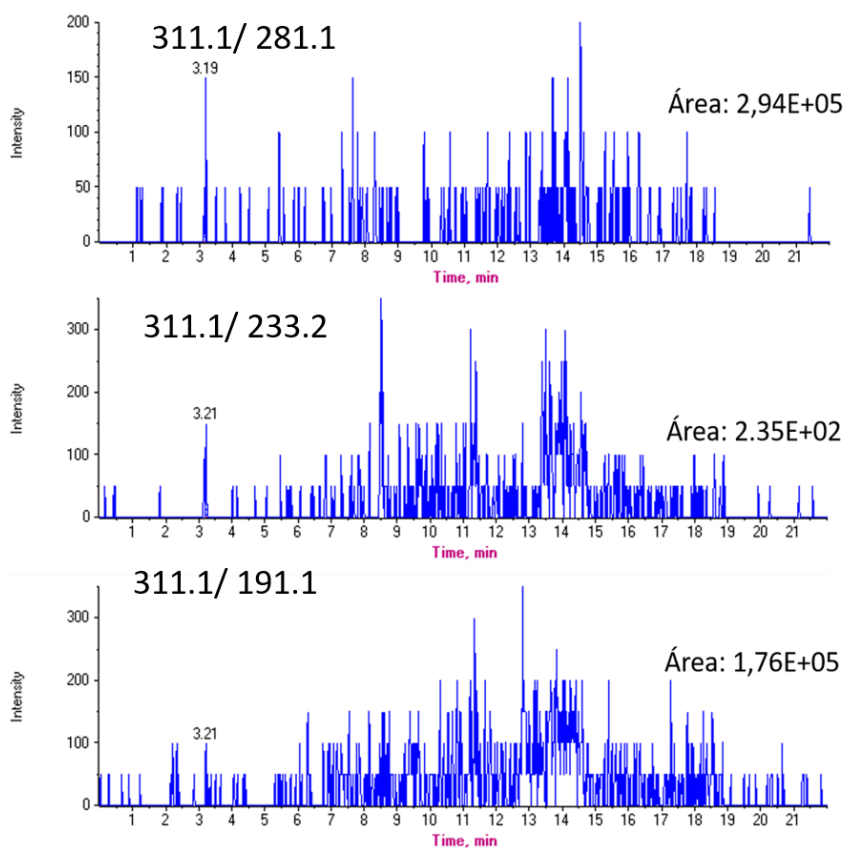


FIGURA 38 - MRM REFERENTE AO NIVALENOL PRODUZIDO PELO FUNGO FG-732-C.

As fragmentações observadas nas transições do nivalenol são mostradas abaixo:

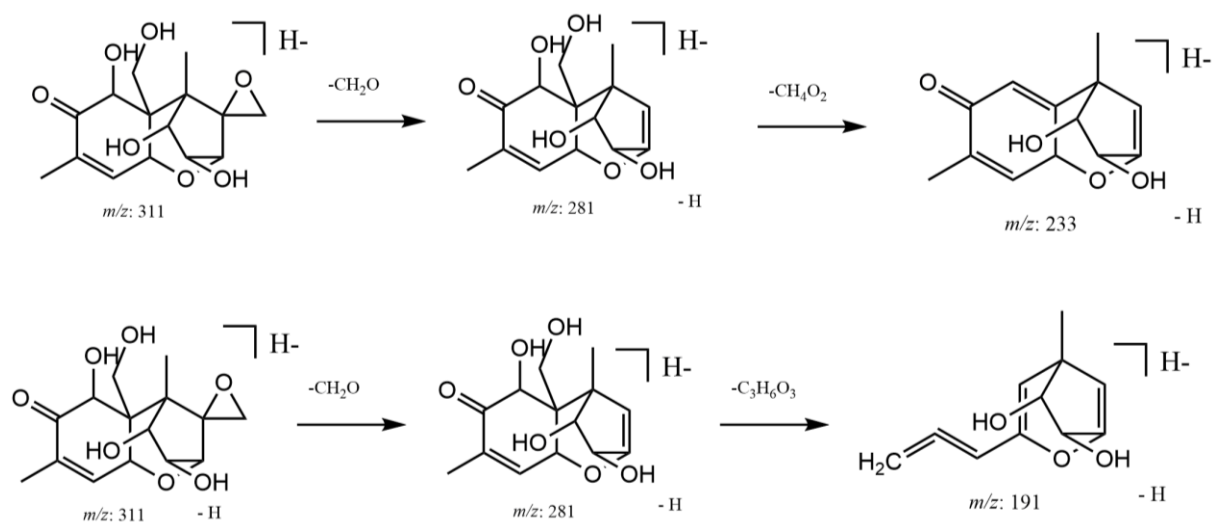


FIGURA 39 - FRAGMENTAÇÕES NIVALENOL.

As micotoxinas Deoxinivalenol, Fumosina B1, Fumosina B3, HT-2 e T-2 que são metabolitos secundários produzidos por espécies de fungos *Fusarium sp.*, foram analisadas, porém não foi detectada a presença destas moléculas.

4.3 Análises dos extratos em diferentes meios de cultivo do fungo *Aspergillus Flavus*.

Em relação ao fungo *Aspergillus Flavus* este também crescido sob diferentes meios de cultivo de milho, arroz e cevada maltada. Como nos outros experimentos, as amostras foram analisadas por UPLC-PDA (WATERS®), onde foi observada a produção da Aflatoxina B1, uma alta produção deste composto no substrato de arroz, como mostrado na FIGURA 17 abaixo.

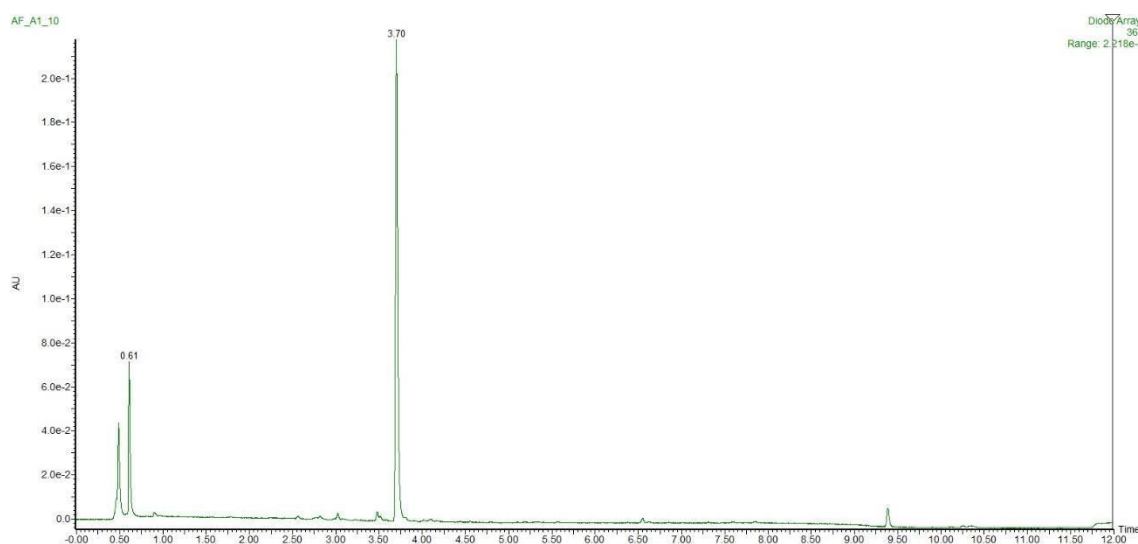


FIGURA 40: CROMATOGRAMA OBTIDO DO EXTRATO DE CULTIVO DO FUNGO *ASPERGILLUS FLAVUS*

A amostra de arroz possui um pico no tempo de retenção de 3,70 minutos muito intenso e com um espectro de UV muito parecido ao relatado na literatura, mostrado abaixo.

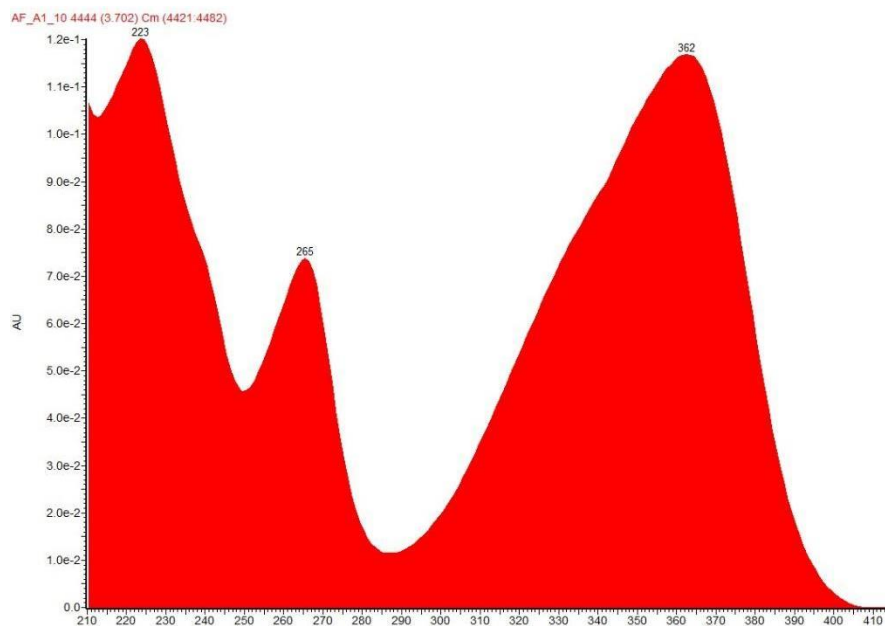


FIGURA 41: ESPECTRO DE UV DA AFLATOXINA B1 ENCONTRADA NAS AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS FLAVUS* EM ARROZ.

Dados da literatura, mostram que a absorção máxima é observada para a Aflatoxina B1 é 224, 266 e 362 nm. (MADRIGAL, et al.; 2009), o que correspondem as absorções 223, 265 e 362 nm, na molécula encontrada no extrato de arroz onde foi cultivado o fungo *Aspergillus flavus*.

Para confirmar a molécula foi feito um experimento de MRM, onde também foi possível mostrar que o fungo também produziu esta molécula nos outros meios de cultivo, como mostrado nas FIGURA 42, 43, 44 e TABELA 12.

TABELA 11- EXPERIMENTO DE MRM PARA ANÁLISE DA AFLATOXINA B1.

Amostra	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção	Transição	Tempo de Retenção
AF –M	313.1/ 243.1	9,40	313.1/ 285.1	9,40	313.1/ 257.1	9,40
AF –A	313.1/ 243.1	9,40	313.1/ 285.1	9,40	313.1/ 257.1	9,40
AF –C	313.1/ 243.1	9,40	313.1/ 285.1	9,40	313.1/ 257.1	9,39

Legenda: (AF –M) *Aspergillus flavus* – Milho

(AF – A) *Aspergillus flavus* – Arroz

(AF – C) *Aspergillus flavus* – Cevada

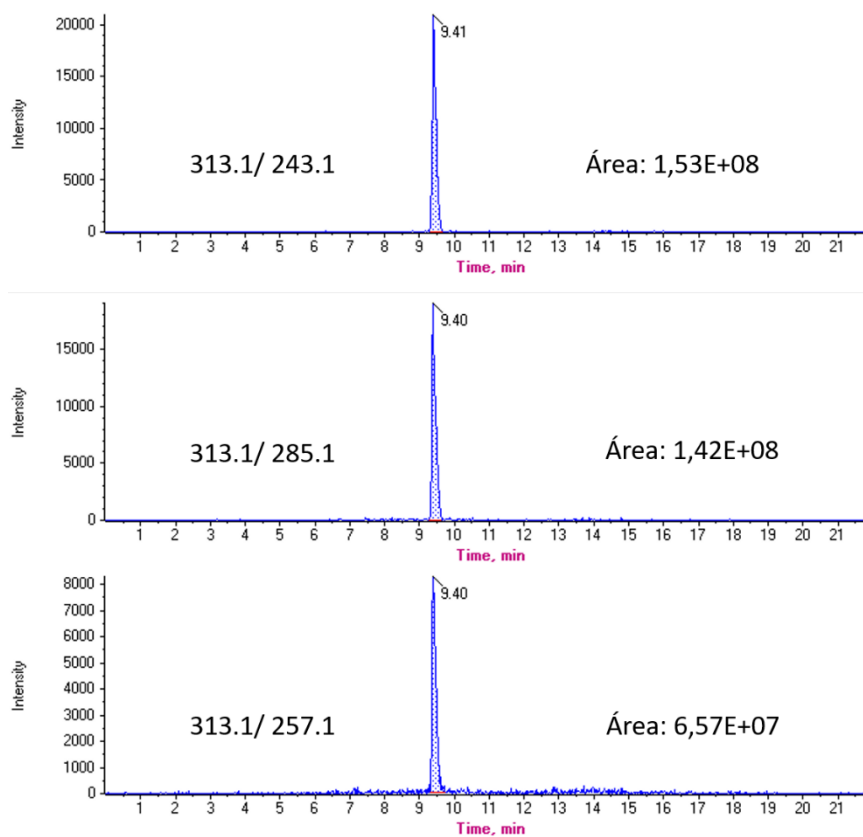


FIGURA 42 - MRM REFERENTE A AFLATOXINA B1 PRODUZIDA PELO FUNGO AF-M.

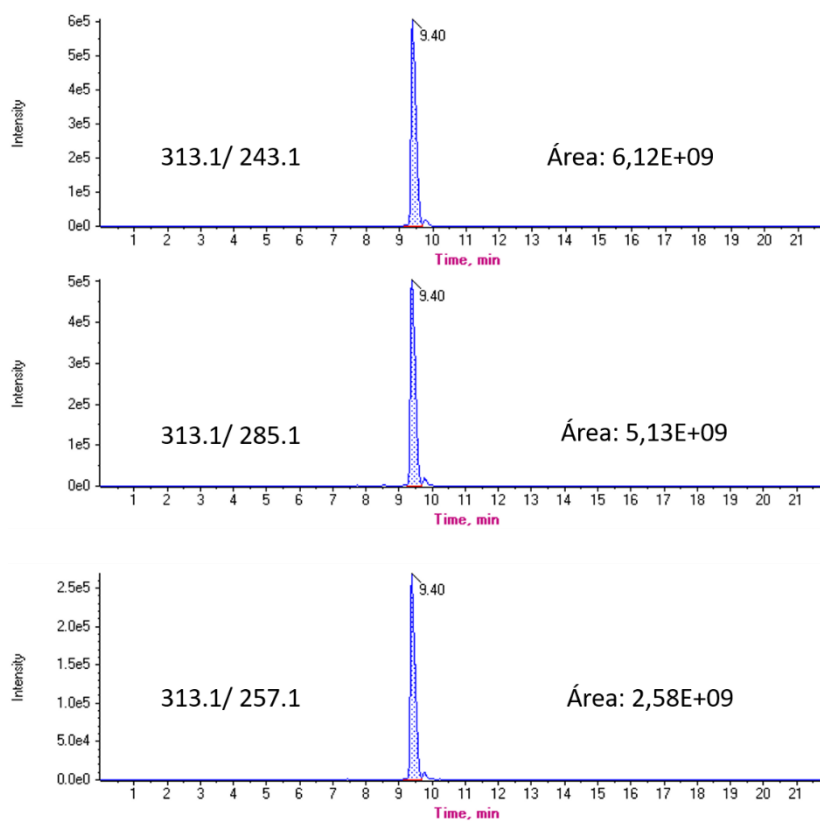


FIGURA 43 - MRM DA REFERENTE A AFLATOXINA B1 PRODUZIDA PELO FUNGO AF-A.

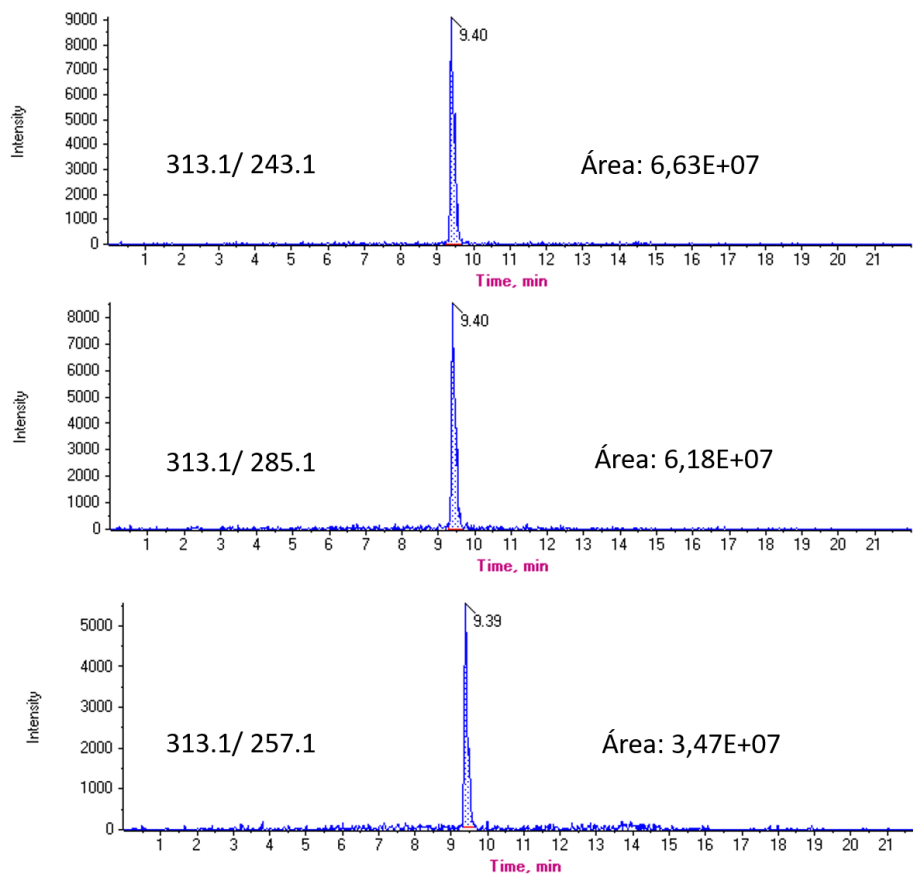


FIGURA 44 - MRM REFERENTE A AFLATOXINA B1 PRODUZIDA PELO FUNGO AF-C.

As fragmentações responsáveis pelas transições da Aflatoxina B1 são mostradas abaixo na FIGURA 45.

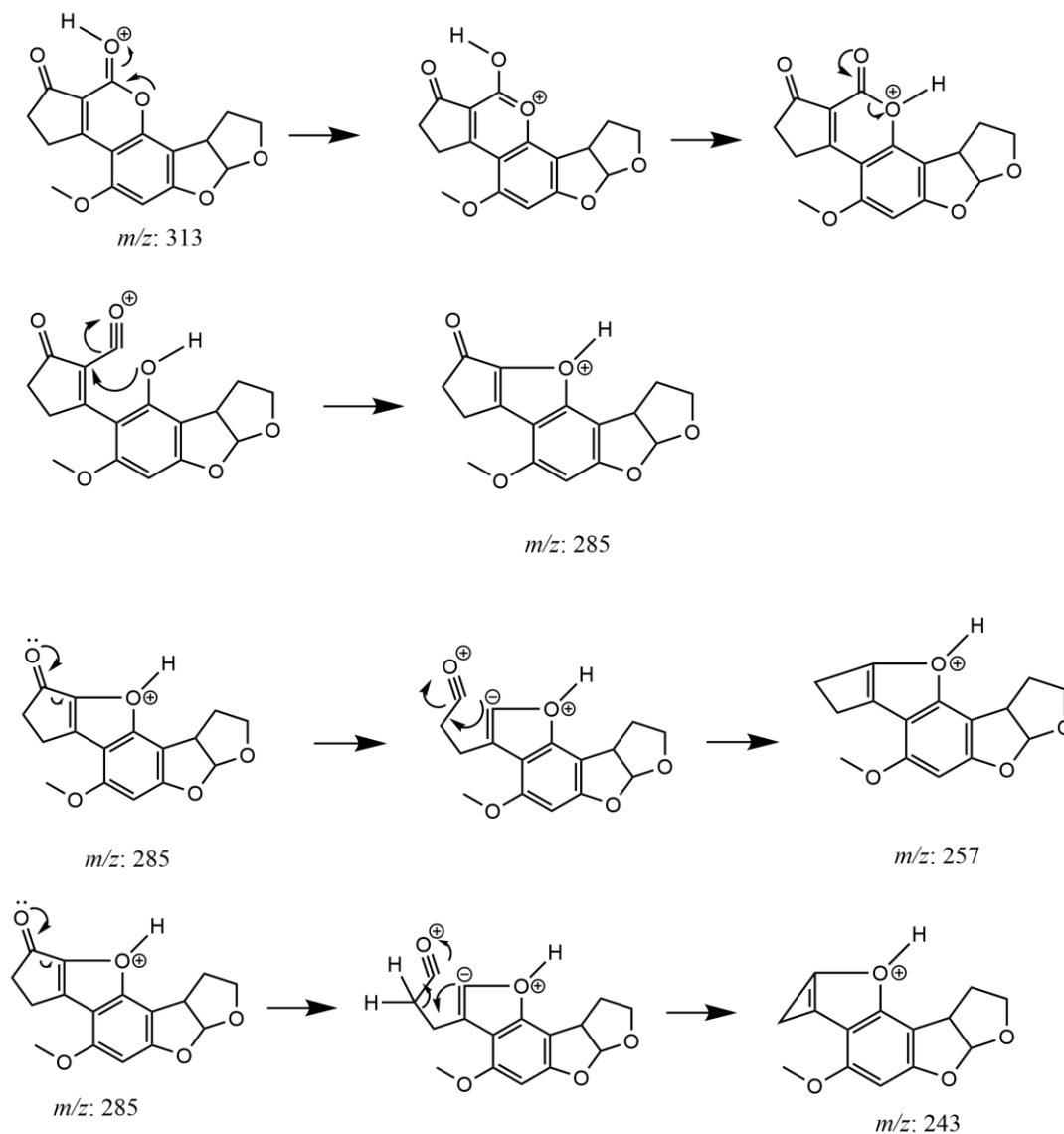


FIGURA 45 - FRAGMENTAÇÕES DA AFLATOXINA B1.

Foram também analisadas as micotoxinas Aflatoxina B2, Aflatoxina G1 e Aflatoxina G2, porém não foi observada no experimento a presença dessas moléculas.

4.4 Resultado sobre o Isolamento de Microrganismos Endofíticos Presentes em Grão Germinado de Cevada Utilizando Técnica de Microcultivo e MALDI-TOF como Ferramenta de Análise.

Sabe-se que uma grande quantidade de microrganismos coloniza os tecidos de plantas superiores e com esse intuito foi feita a tentativa de isolamento de alguns microrganismos que vivem de forma endófito nos grãos de malte de cevada que passaram por diferentes processos de torrefação e também alguns isolados a partir do malte de trigo.

Apesar de uma etapa do trabalho ser voltada para o isolamento de fungos endofíticos, foram isoladas algumas bactérias resistentes a estreptomicina, um antibiótico que abrange um grande espectro de ação, dentre eles bactérias gram-positivas e gram-negativas.

4.4.1 Fungos Isolados

Durante 14 dias de cultivos foram isolados cerca de 7 fungos a partir das sementes de cevada e trigo, no qual a lista com os microrganismos isolados é mostrada nas tabelas abaixo.

TABELA 12- FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DA SEMENTE DE CEVADA

	Tipo do Malte	Microrganismos
Fungos	Trigo	<i>LaBioMMi 1396</i>
	Munich II	<i>LaBioMMi 1397</i>
	Munich II	<i>LaBioMMi 1398</i>
	Vienna	<i>LaBioMMi 1399</i>
	Vienna	<i>LaBioMMi 1400</i>
	Vienna	<i>LaBioMMi 1401</i>
	Vienna	<i>LaBioMMi 1402</i>

Com relação aos fungos foi feito um experimento de microcultivo onde é possível observar como os esporos se dispõem sobre as hifas gerando várias outras estruturas (BRASIL, 2004), dessa forma se possível observar a qual gênero de fungos vivem nestes cereais pertencem.

Dessa forma, foram feitas fotos dos microcultivos de cada fungo isolado e em seguida alguns estudos por Maldi-TOF também foram realizados.

A FIGURA 46 remete ao fungo denominado *LABIOMMI 1396*, isolado a partir de um malte produzido a partir do grão de trigo.

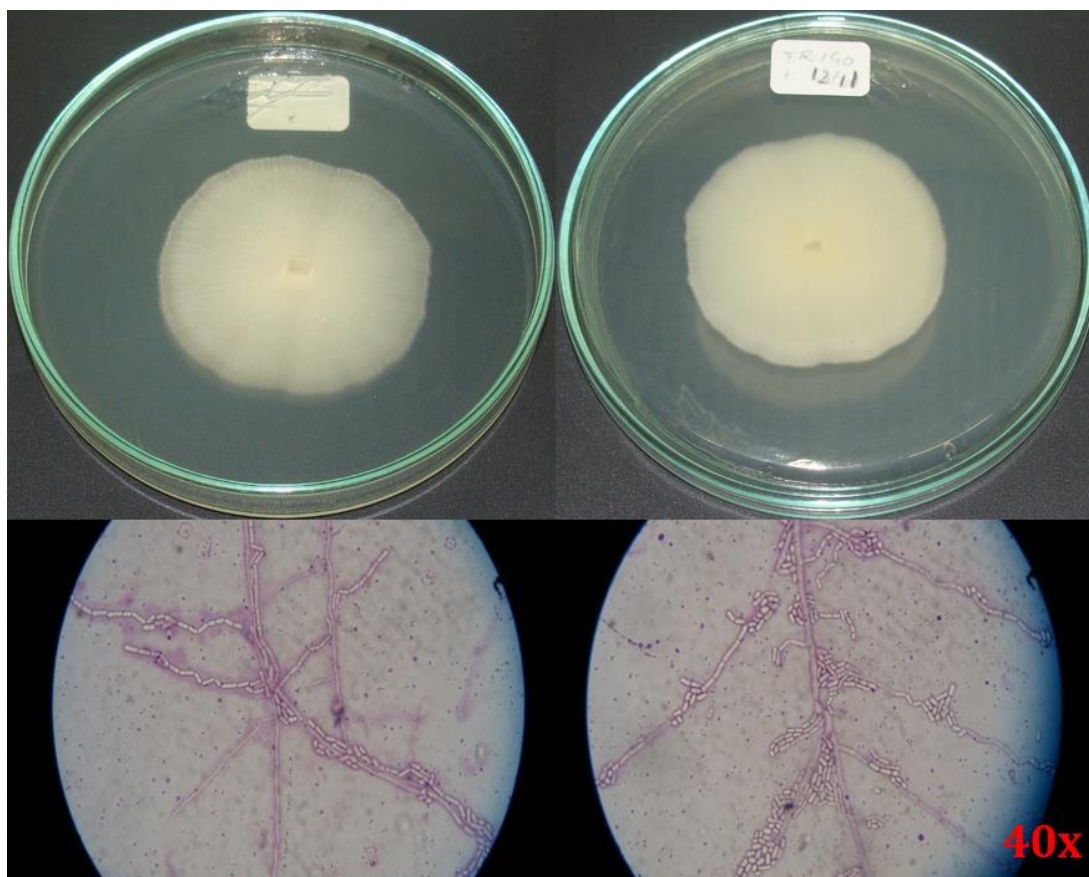


FIGURA 46 - *LABIOMMI 1396*, ISOLADO A PARTIR DO TRIGO.

A TABELA 14, a seguir, traz uma comparação produzida pelo software Biotyper®, no qual, os espectros de massas obtido pelo MALDI-TOF é comparado com os espectros de massas de microrganismos que a sua biblioteca possui. O quão mais próximo esse valor se aproxima de 3, mais provável que o fungo pertença a espécie da sua biblioteca.

Segundo as ferramentas do Biotyper®, é provável que o fungo *LABIOMMI 1396* possa pertencer ao gênero *Geotrichum ssp.*, no qual, segundo Pimenta *et al.*, 2005 as colônias são brancas, planas e a massa de esporos produzidos são secos. Já ALPER *et al.*, 2011 descreve que o gênero *Geotrichum sp.* são fungos

dimórficos, que em certas condições pode se comportar como fungos ou como leveduras, possui colônias de coloração creme, que se caracterizam morfológicamente pela presença de artroconídeos, que são resultados de fragmentações aleatório das hifas (HOOG, et al., 1986), o que pode ser observado nas imagens de microcultivo anteriormente.

TABELA 13- RESULTADO DO MALDI-TOF, UTILIZANDO A FERRAMENTA BIOTYPER.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>LaBioMMi 1396</i>	3	-
2 (+++)	<i>LaBioMMi 1401</i>	2,713	-
3 (+++)	<i>LaBioMMi 1400</i>	2,707	-
4 (+++)	<i>LaBioMMi 1402</i>	2,668	-
5 (+++)	<i>LaBioMMi 1397</i>	2,65	-
6 (+)	<i>Geotrichum silvícola 04_188 LBK</i>	1,785	215419
7 (+)	<i>Geotrichum silvícola 04_322 LBK</i>	1,731	215419
8 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_007 LBK</i>	1,688	215419
9 (-)	<i>Geotrichum candidum CBS 184_56</i> CBS	1,633	27317
10 (-)	<i>Geotrichum silvícola 2 LBK</i>	1,586	215419

Afim de observar o perfil dos metabolitos secundários do fungo *LaBioMMi 1396*, foi feito um experimento com o extrato fúngico do fungo *LaBioMMi 1396*, quando este cultivado em meio sólido de milho, já que este não se desenvolveu

nos meios sólidos de cevada e arroz. Na FIGURA 47 e 48 possível observar o cromatograma do extrato fúngico e o espectro de ultravioleta no tempo de retenção de 12,94 min., respectivamente.

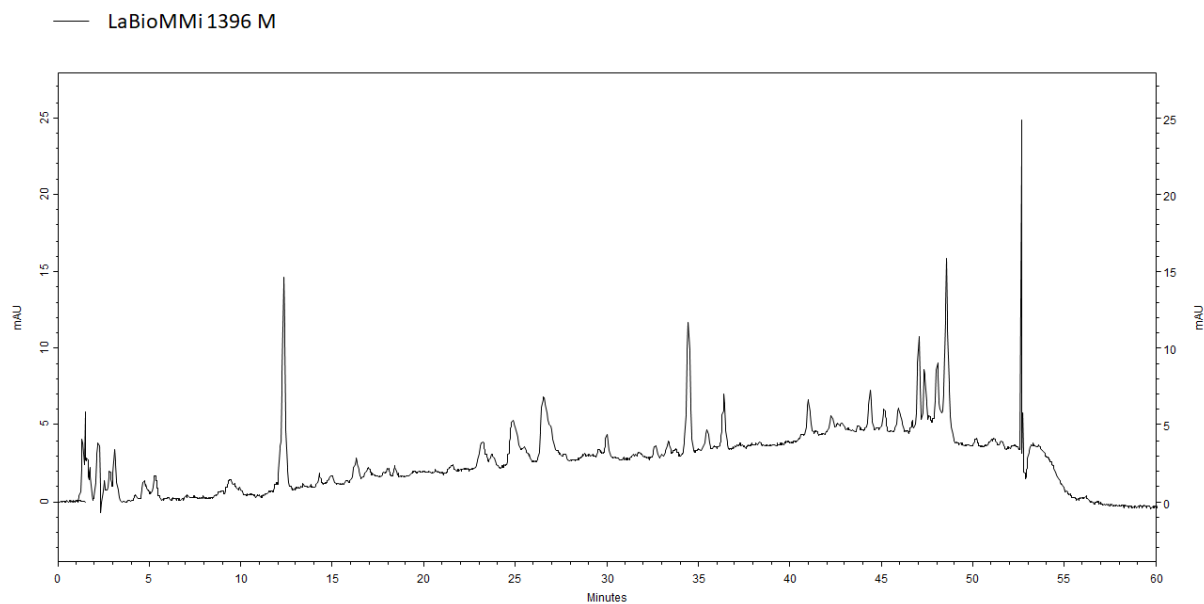


FIGURA 47 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO FÚNGICO DO FUNGO *LaBioMMi 1396* CULTIVADO EM MEIO DE MILHO.

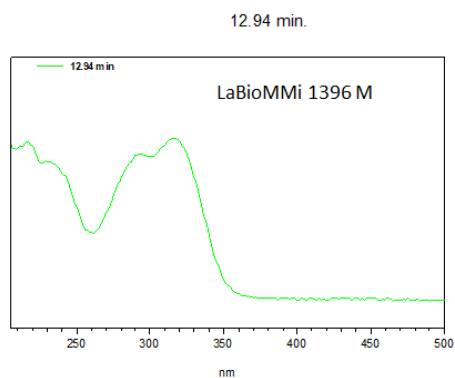


FIGURA 48 - ESPECTRO DO ULTRAVIOLETA NO TEMPO DE RETENÇÃO 12,94 MIN..

O fungo isolado *LaBioMMi* 1397, também passou pelos mesmos experimentos de identificação como microcultivo e análise proteômica pelo software Biotyper®.

Apesar de não ser possível identificar as espécies o *LaBioMMi* 1397, este tem um alto valor de “score” com os outros microrganismos isolados, TABELA 15 o que pode dizer que estes microrganismos possam ser muito parecidos. Observando o cruzamento dos dados do Biotyper® e as imagens de microcultivo FIGURA 49, mostra realmente que este fungo possa se tratar de alguma espécie do gênero *Geotricum* sp..

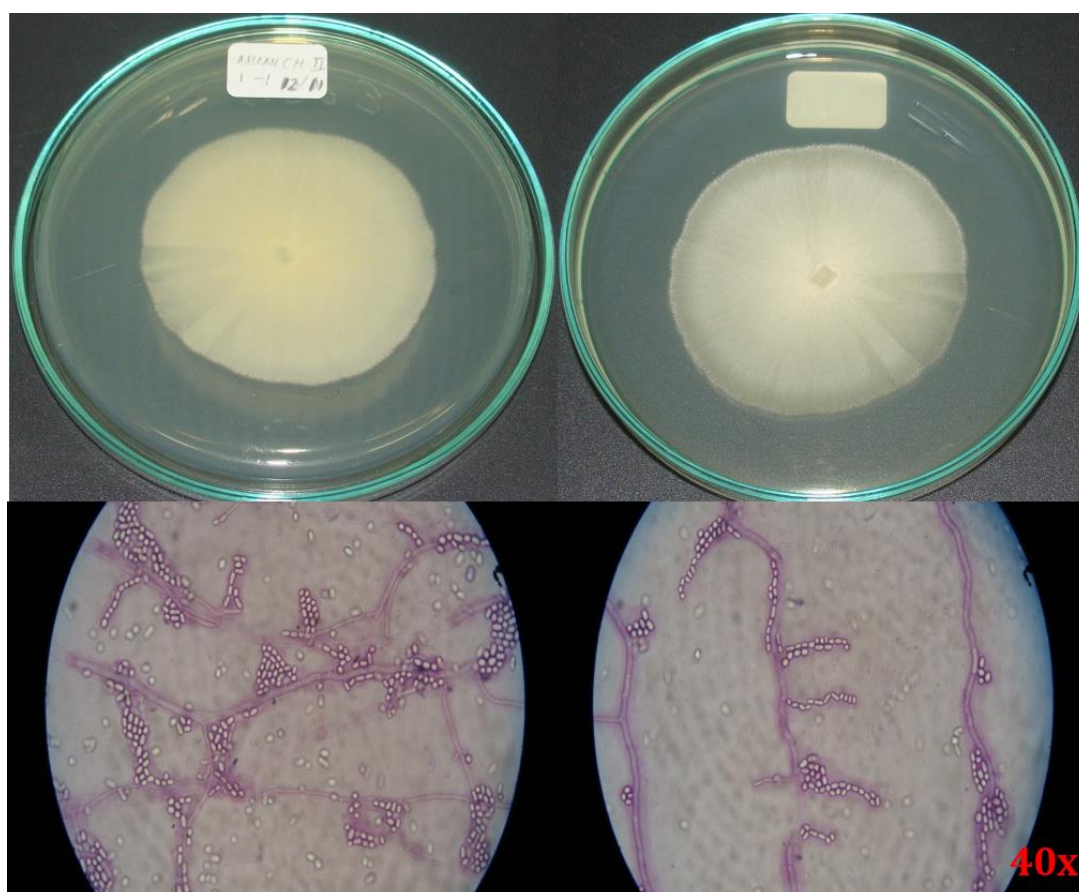


FIGURA 49: *LaBioMMi* 1397, ISOLADO A PARTIR DA CEVADA MUNICH II.

TABELA 14- RESULTADO DO MALDI-TOF, UTILIZANDO A FERRAMENTA BIOTYPER.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>LaBioMMi 1397</i>	3	-
2 (+++)	<i>LaBioMMi 1401</i>	2,69	-
3 (+++)	<i>LaBioMMi 1400</i>	2,68	-
4 (+++)	<i>LaBioMMi 1396</i>	2,652	-
5 (+++)	<i>LaBioMMi 1402</i>	2,639	-
6 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_322 LBK</i>	1,572	215419
7 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_007 LBK</i>	1,544	215419
8 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_188 LBK</i>	1,514	215419
9 (-)	<i>Pseudomonas trivialis DSM 14937T</i> <i>HAM</i>	1,405	200450
10 (-)	<i>Geotrichum candidum CBS 184_56</i> <i>CBS</i>	1,376	27317

Foram feitos cromatogramas e alguns espectros na região do UV-Vis do extrato do fungo *LaBioMMi 1397*, quando cultivado nos meios de cevada e milho no qual são apresentados a seguir.

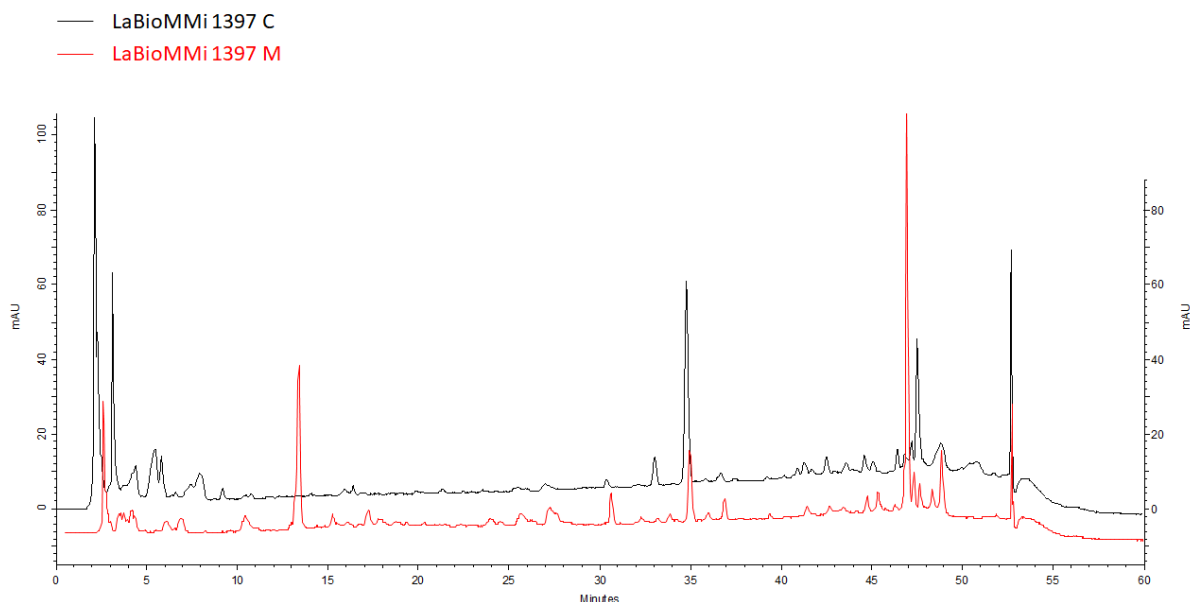
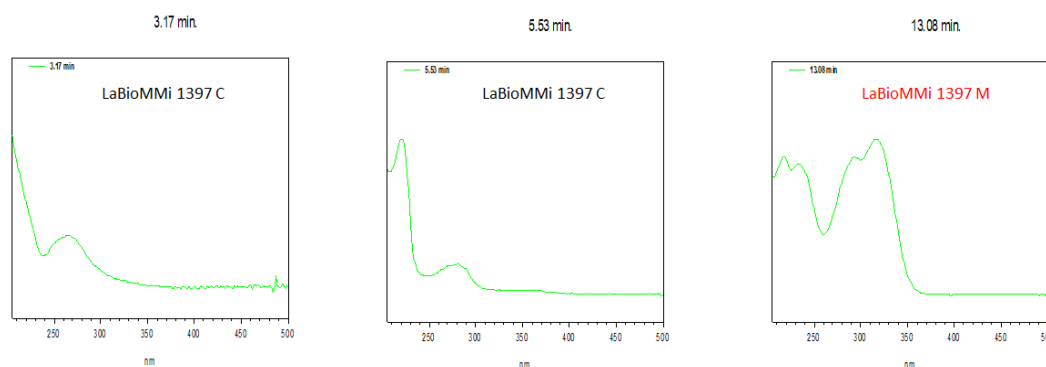


FIGURA 50 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO FUNGO *LaBioMMi 1397*, CULTIVO EM MEIO DE CEVADA E MILHO.



Legenda:

LaBioMMi 1397 C – LaBioMMi 1397 em cevada

LaBioMMi 1397 M – LaBioMMi 1397 em milho

FIGURA 51 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *LaBioMMi 1397*, QUANDO CULTIVADOS NO SUBSTRATO DE MILHO E CEVADA.

Observa-se que no extrato do fungo *LaBioMMi 1397*, ocorreu a produção de metabolitos diferentes, já que o mesmo fungo foi inoculado em diferentes meios. De certa forma, estes cereais são de gêneros diferentes (milho *Zea* e cevada *Hordeum*), possuem metabolitos diferentes o que nos leva a crer que o microrganismo deve ter

utilizado desses compostos, chegando a sintetizar outros metabólitos por suas diferentes vias.

O fungo *LaBioMMi 1398* também foi isolado do tipo de malte Munich II. Ao observar a FIGURA 52 referente ao experimento de microcultivo observa-se que o fungo isolado possui uma colônia de coloração marrom amarelada, com formação de macroconídios hialinos, com células apicais curtas de 1-2 células e duas células centrais cilíndricas e microconídios cilíndricos de 1-2 células, conidiósporos hialinos, eretos e longos, não muito simples. Essas informações levam a uma possível identificação de um fungo do gênero *Fusarium sp.*, apesar dos dados da biblioteca do software Biotyper®, TABELA 16, não conseguir identificar pela análise proteômica

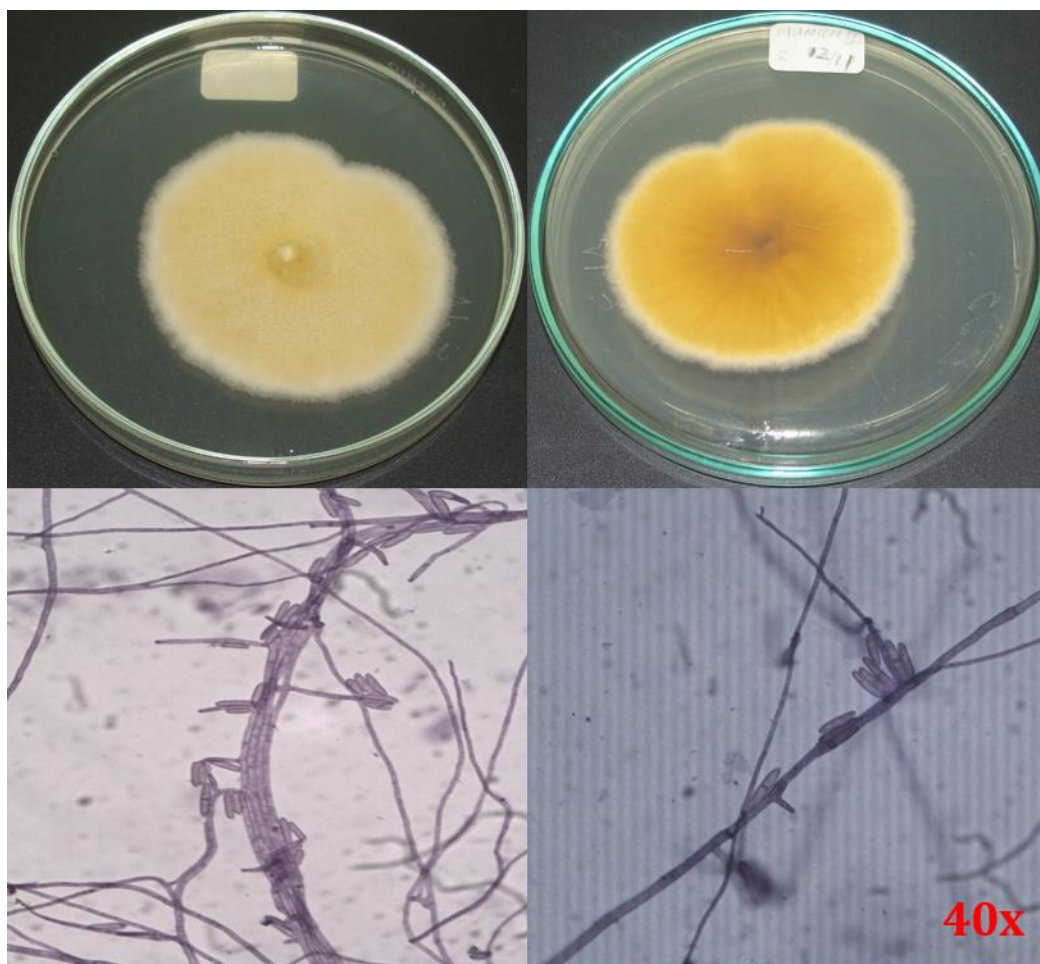


FIGURA 52: *LaBioMMi 1398*, ISOLADO A PARTIR DO CEVADA MUNICH II.

TABELA 15- RESULTADO DO MALDI-TOF, UTILIZANDO A FERRAMENTA BIOTYPER.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>LaBioMMi 1398</i>	3	-
2 (-)	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>2273_CCUG 35297 BOG</i>	1,064	1490
3 (-)	<i>Campylobacter jejuni MB_4738_05</i> <i>THL</i>	1,056	197
4 (-)	<i>Clostridium tetani type 1 1049_NCTC</i> <i>279T BOG</i>	1,054	1513
5 (-)	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>2274_CCUG 35556 A BOG</i>	1,047	1490
6 (-)	<i>Pannonibacter phragmitetus LGM</i> <i>5430 HAM</i>	1,025	121719
7 (-)	<i>LaBQuiM 96 – MALT2% Direct cell</i>	1,015	133995672
8 (-)	<i>LaBQuiM 96</i>	1,015	133995672
9 (-)	<i>Brevibacterium iodinum IMET 10995T</i> <i>HKJ</i>	0,999	31943
10 (-)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>(Pseudomonas beteli) LMG 978T</i> <i>HAM</i>	0,993	40324

A seguir encontra-se os cromatogramas, além dos espectros na região do ultravioleta do extrato do fungo *LaBioMMi 1398*, após do isolamento, cultivado nos meios sólidos de arroz, cevada e milho.

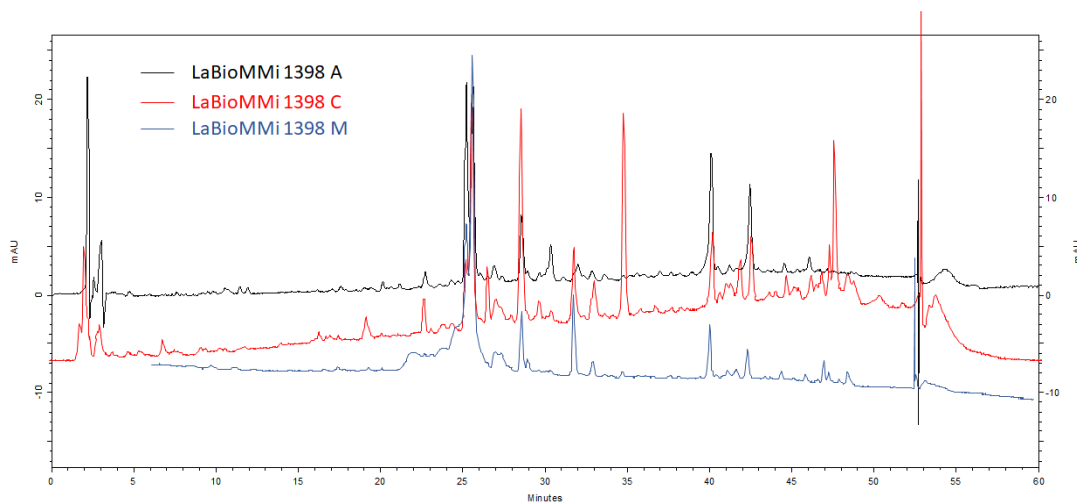


FIGURA 53 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO FUNGO *LaBioMMi 1398* NOS MEIOS DE CEVADA, MILHO E ARROZ.

Observa-se na FIGURA 53 que o comportamento do extrato do fungo *LaBioMMi 1398*, quando cultivado nos meios sólidos de arroz, cevada e milho, mostram um perfil muito semelhante. Nos tempos de retenção em 25,2 min., nos espectros da FIGURA 54 observamos compostos semelhantes entre os extratos, bem como também no tempo de retenção em 40,4 min., observamos nas FIGURAS 54 e 55 um composto encontrado na membrana celular de fungos, o ergosterol. Onde os picos de absorção máxima estão em 271, 281 e 293 nm., respectivamente.

Espectro de UV-Vis do cromatograma do extrato do fungo *LaBioMMi 1398* em arroz e milho.

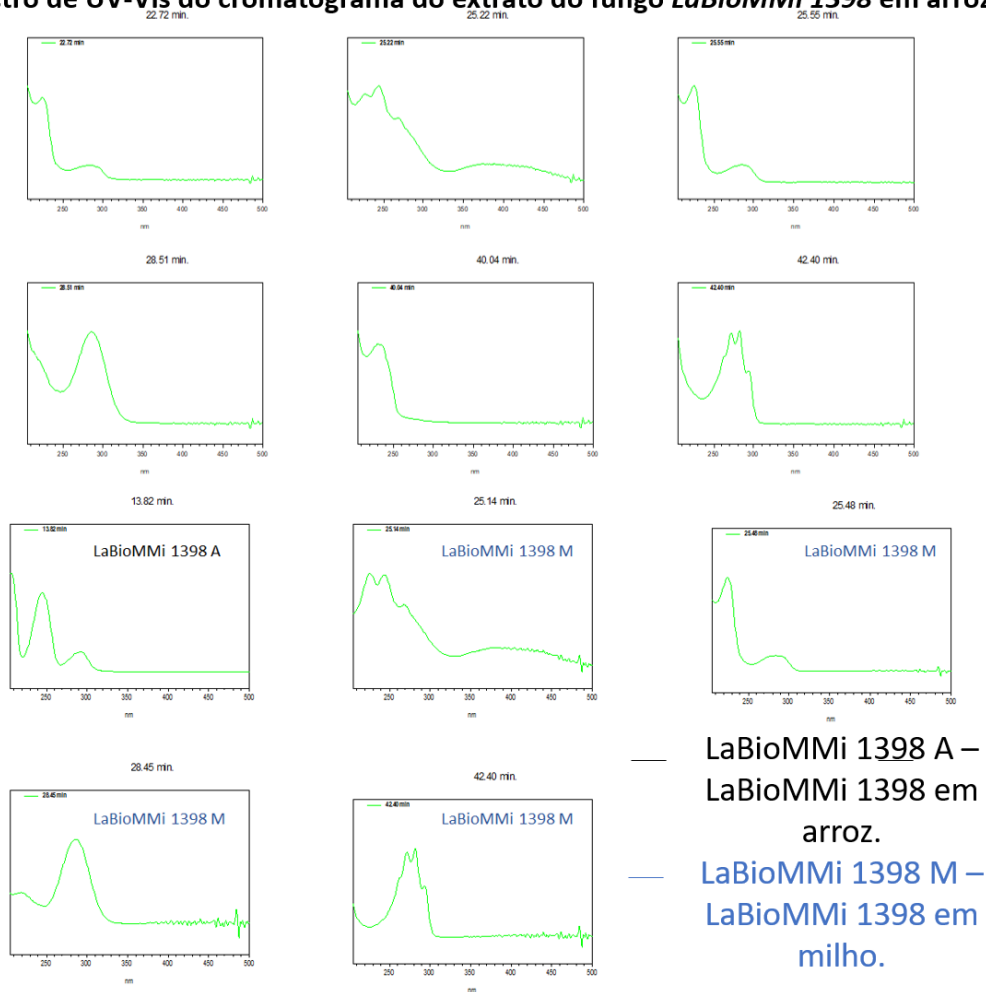


FIGURA 54 - ESPECTROS NO ULTRAVIOLETA PARA O EXTRATO DO FUNGO *LABIOMMI 1398* EM ARROZ E MILHO.

Espectro de UV-Vis do cromatograma do extrato do fungo *LaBioMMi 1398* em cevada.

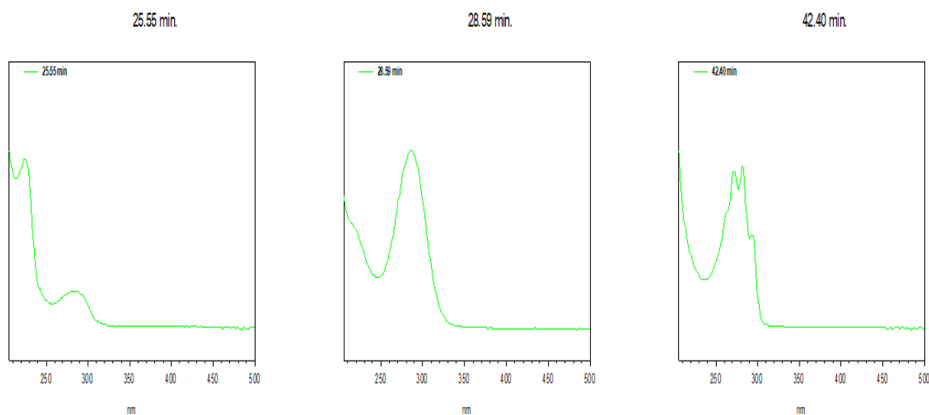


FIGURA 55 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA PARA O EXTRATO DO FUNGO *LABIOMMI 1398* EM CEVADA.

O próximo fungo isolado foi isolado a partir do malte Vienna, este o que obteve o maior número de isolamento, o primeiro foi denominado *LaBioMMi 1399*. Apesar dos “scores value” não serem confiáveis, TABELA 18, a ferramenta Biotyper® cita o gênero *Mucor*, como sendo o microrganismo que mais se assemelha a este isolado. Apesar de não termos a certeza de que este isolado realmente pertence a este gênero, podemos comparar as estruturas de microcultivo com a família *Mucorales*, na qual o *Mucor* também se encontra e segundo BOTHA et al., 2014 e MILLER et al., 2019 que os fungos pertencentes a esta família, produz esporangiosporos, que são esporos assexuados, que ficam contidos dentro de uma espécie de bolsa, chamada de esporângio, além dos rizoides e estolões serem reduzidos ou até mesmo não possuírem, o que ao observar as imagens de microcultivo deste isolado, notamos uma semelhança muito grande a esta família, como se pode observar nota-se a presença de esporângios e os esporangiosporos poucos rizóides em algumas imagens, como mostrado acima.

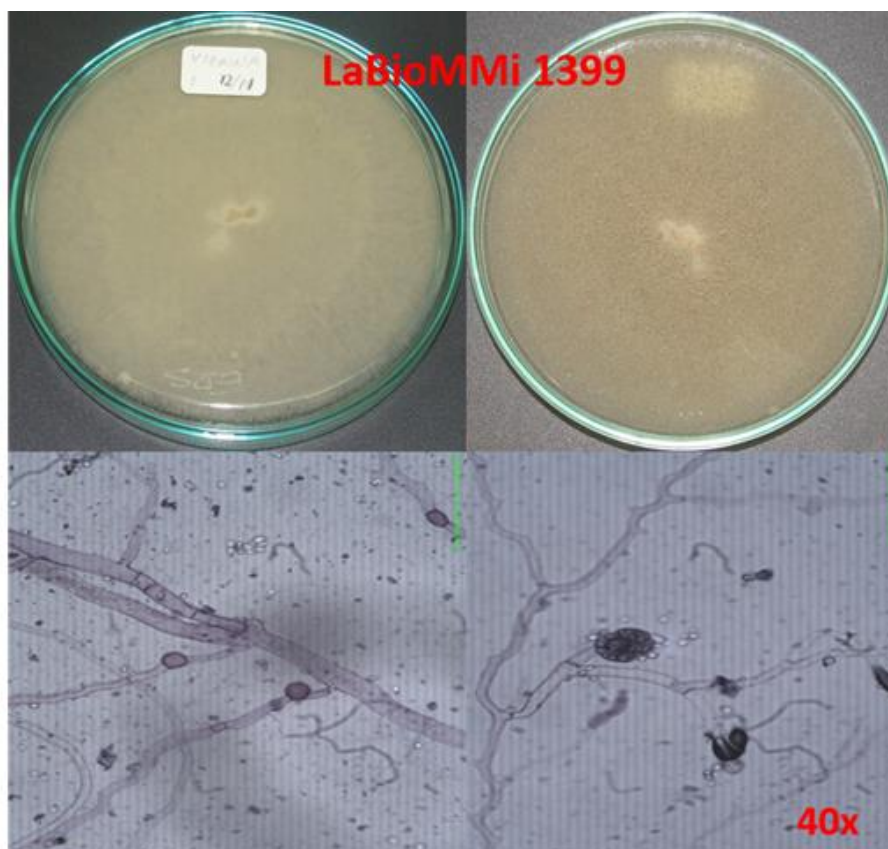


FIGURA 56 – FUNGO *LABIOMMI 1399* ISOLADO A PARTIR DA CEVADA VIENNA.

TABELA 16- RESULTADO DO MALDI-TOF, UTILIZANDO A FERRAMENTA BIOTYPER.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>LaBioMMi 1399</i>	3	-
2 (-)	<i>Mucor rouxii_Aveia_7dias_d_cell</i>	1,425	130535518
3 (-)	<i>Mucor rouxii - LaBioMMi 8</i>	1,425	130535518
4 (-)	<i>Enterococcus faecium 11037 CHB</i>	1,373	1352
5 (-)	<i>Mucor rouxii - LaBioMMi 8</i>	1,33	130535518
6 (-)	<i>LaBioMMi 8</i>	1,33	130535518
7 (-)	<i>Mucor rouxii - LaBioMMi 8</i>	1,251	130535518
8 (-)	<i>Mucor rouxii - LaBioMMi 8</i>	1,231	130535518
9 (-)	<i>Mucor circinelloides – LaBioMMi 9</i>	1,213	130535518
10 (-)	<i>Streptomyces violaceorubacter B263</i> <i>UFL</i>	1,211	1935

Abaixo é apresentado o cromatograma e o espectro de na região do ultravioleta - visível. O que mostrou um comportamento semelhante aos diferentes cultivos. Resultando em moléculas de média a baixa polaridade. Algumas moléculas tiveram um λ de absorção acima de 300 nm, no qual uma molécula chegou a um $\lambda = 350\text{nm}$, chegando próximos da região do visível (400nm). É possível observar a presença de ergosterol nos metabolitos extraídos como observado na FIGURA 58 e 60.

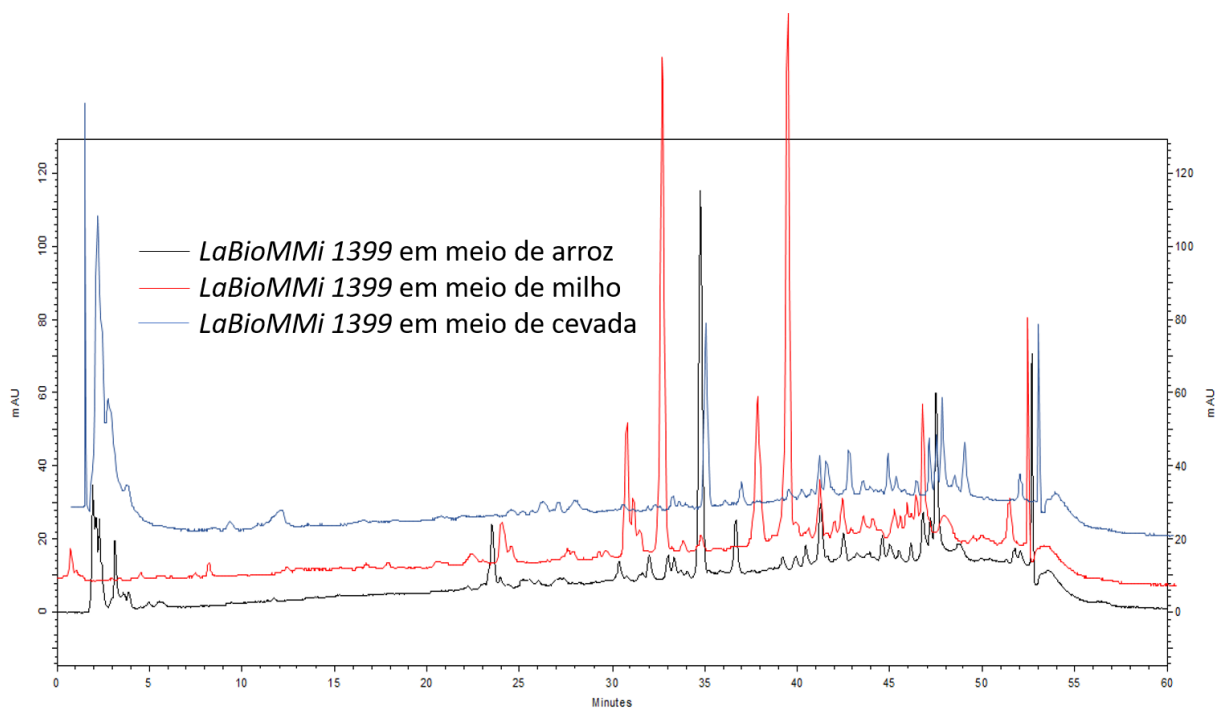


FIGURA 57 – CROMATOGRAMAS DO EXTRATO DO FUNGO *LABIOMMI 1399* NOS MEIOS DE ARROZ, MILHO E CEVADA.

Espectro de UV-Vis do cromatograma do fungo *LaBioMMi 1399* em arroz

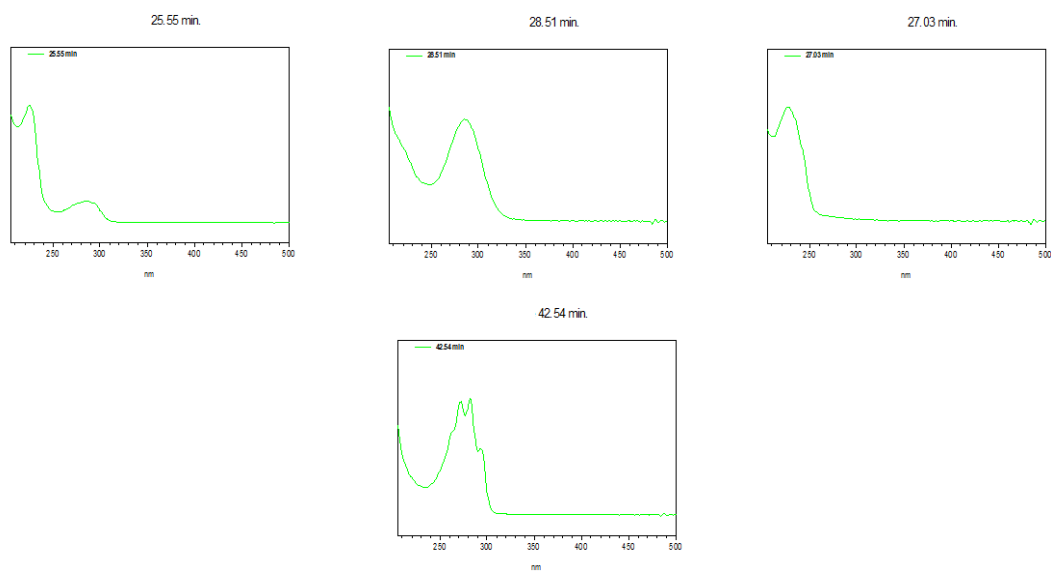


FIGURA 58 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO *LABIOMMI 1399* NO MEIO DE ARROZ.

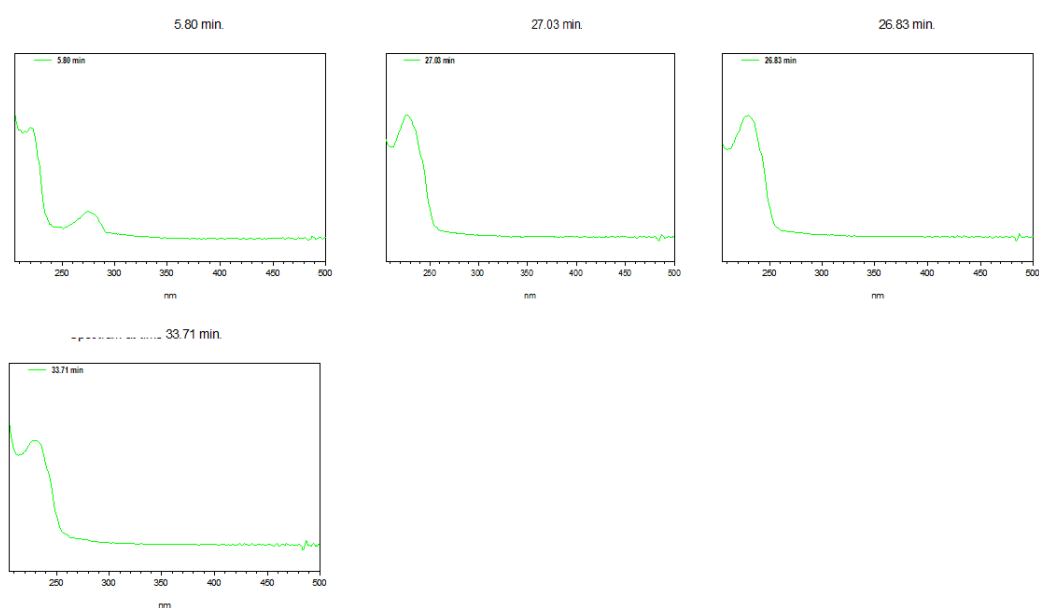
Espectro de UV-Vis do cromatograma do fungo LaBioMMi 1399 em cevada

FIGURA 59 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO *LABIOMMI* 1399 NO MEIO DE CEVADA.

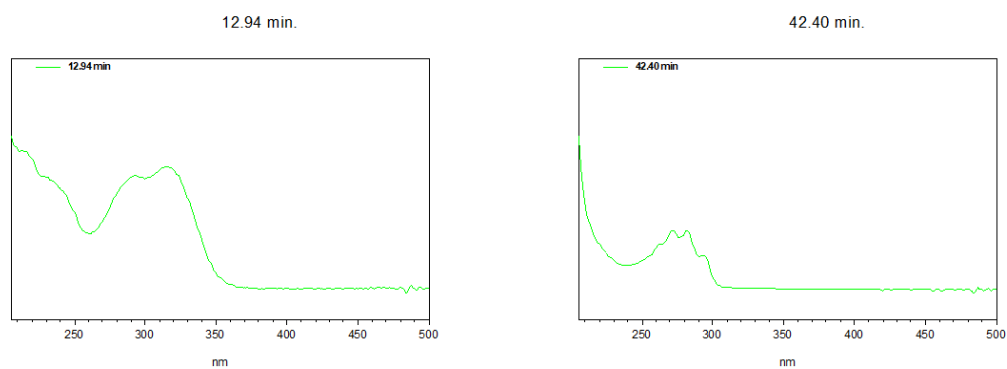
Espectro de UV-Vis do cromatograma do fungo LaBioMMi 1399 em milho

FIGURA 60 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO *LABIOMMI* 1399 NO MEIO DE MILHO.

Em seguida temos o segundo microorganismos isolado a partir do malte Vienna, no qual foi denominado *LaBioMMi 1400*. Os “score value” obtidos na análise por Maldi-TOF, mostra que o microorganismo isolado, é muito parecido com os microorganismos *LaBioMMi 1396* e *1397* possuindo resultados de “Matched Pattern”, é encontrado novamente os microorganismos do gênero *Geotrichum sp.*, TABELA 18 Ao observar a FIGURA 61 do experimento de microcultivo, também encontramos artroconideos e coloração creme.

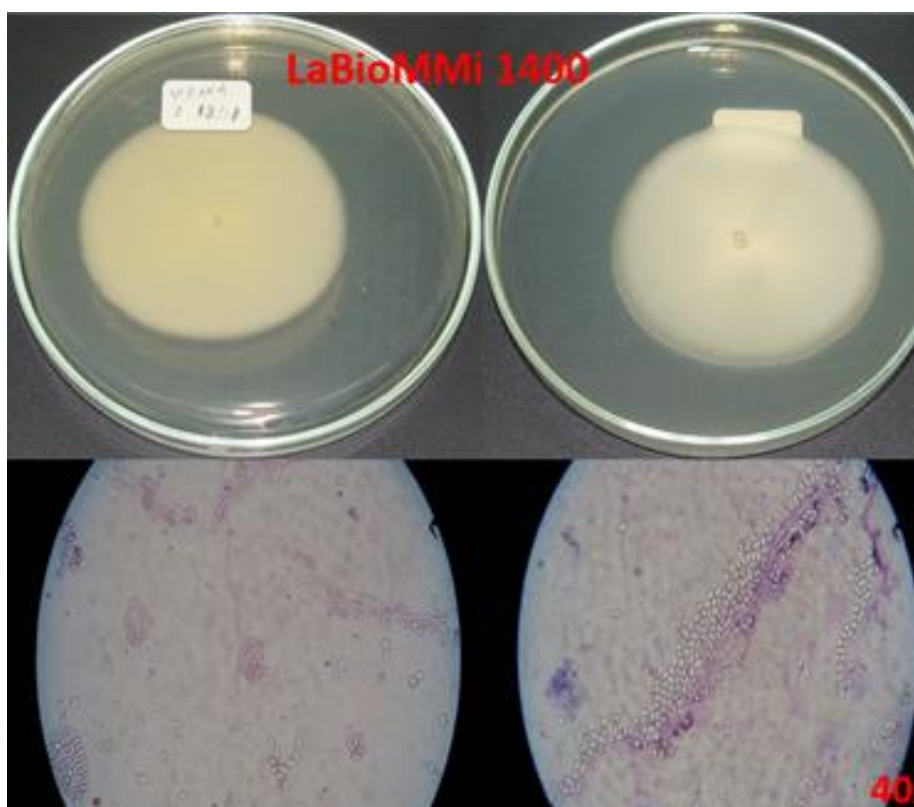


FIGURA 61: *LaBioMMi 1400*, ISOLADO A PARTIR DO MALTE VIENNA.

TABELA 17 - RESULTADO DO MALDI-TOF, UTILIZANDO A FERRAMENTA BIOTYPER

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>LaBioMMi 1400</i>	3	-
2 (+++)	<i>LaBioMMi 1396</i>	2,734	-
3 (+++)	<i>LaBioMMi 1401</i>	2,72	-
4 (+++)	<i>LaBioMMi 1402</i>	2,695	-
5 (+++)	<i>LaBioMMi 1397</i>	2,691	-
6 (+)	<i>Geotrichum silvícola 04_188 LBK</i>	1,744	215419
7 (-)	<i>Geotrichum candidum CBS 184_56</i> CBS	1,655	27317
8 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_007 LBK</i>	1,637	215419
9 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_322 LBK</i>	1,613	215419
10 (-)	<i>Geotrichum candidum DSM 1240 CBS</i>	1,516	27317

Os cromatogramas do extrato do fungo *LaBioMMi 1400* cultivados em meio de cevada e milho é apresentado a seguir, no qual também é possível observar a presença de ergosterol, como mostrado na FIGURA 63.

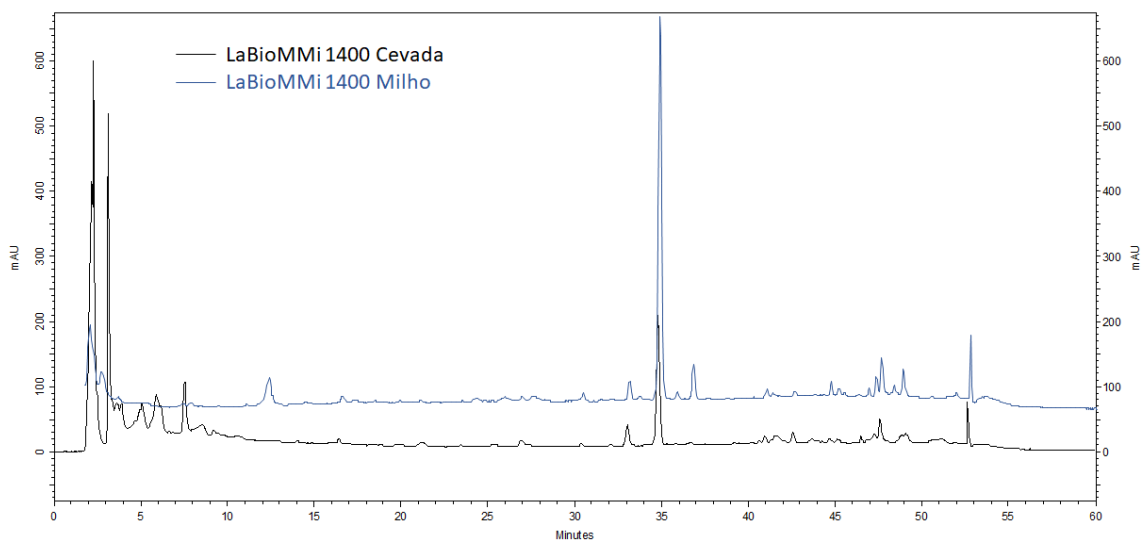


FIGURA 62 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO DO FUNGO *LABIOMMI 1400* NOS MEIOS DE CEVADA E MILHO.

Espectro UV-Vis para o extrato do fungo *LaBioMMi 1400* cevada

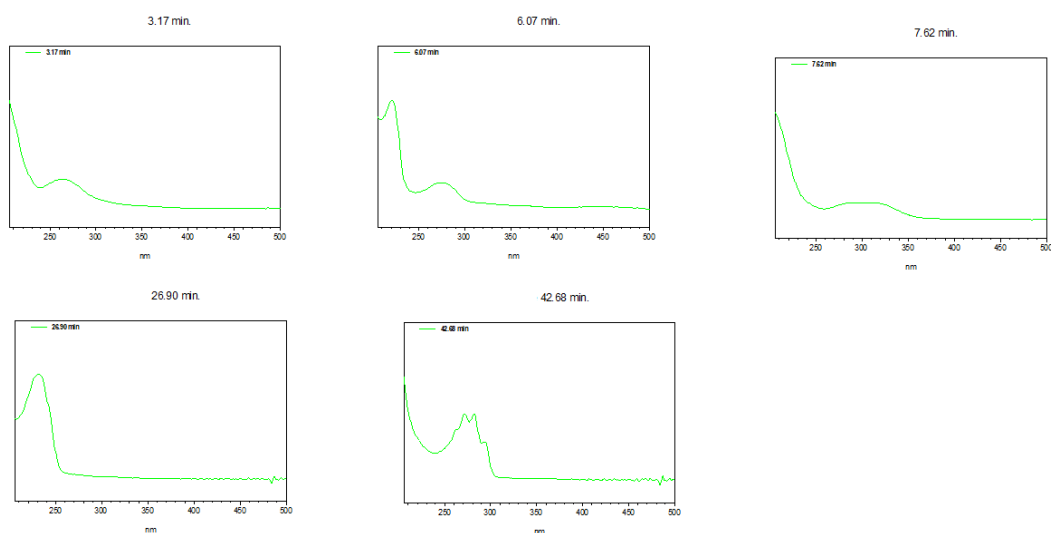


FIGURA 63 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO *LABIOMMI 1400* NO MEIO DE CEVADA.

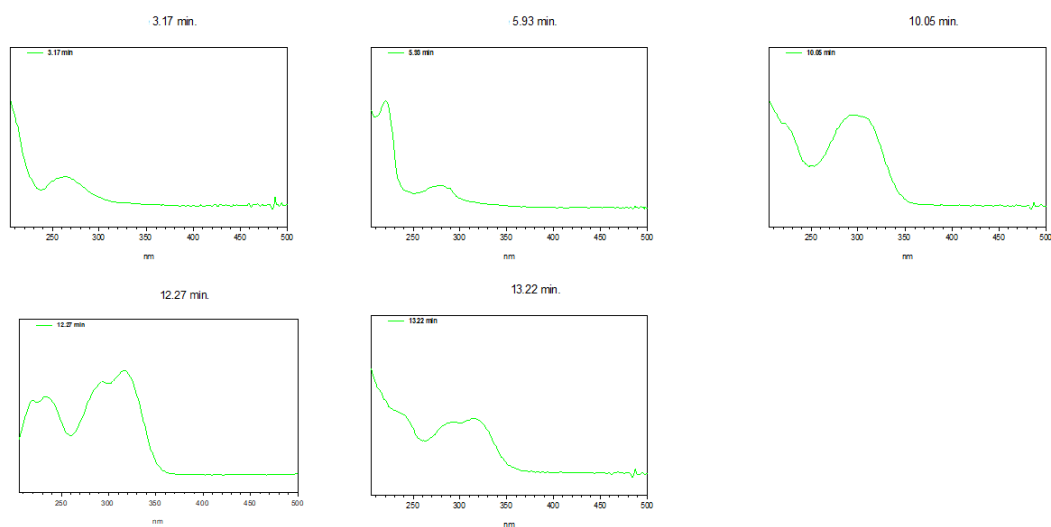
Espectro de UV-Vis do cromatograma do fungo LaBioMMi 1400 em milho

FIGURA 64 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO *LABIOMMI 1399* NO MEIO DE MILHO.

O terceiro microrganismo isolado do malte Vienna, foi o *LaBioMMi 1401*. No qual, a fermenta Biotyper®, TABELA 19, mostra uma correlação com o gênero *Geotrichum sp.*, no qual pode ser possível observar na FIGURA 65 pelo experimento de microcultivo a presença artroconídeos e uma coloração creme.

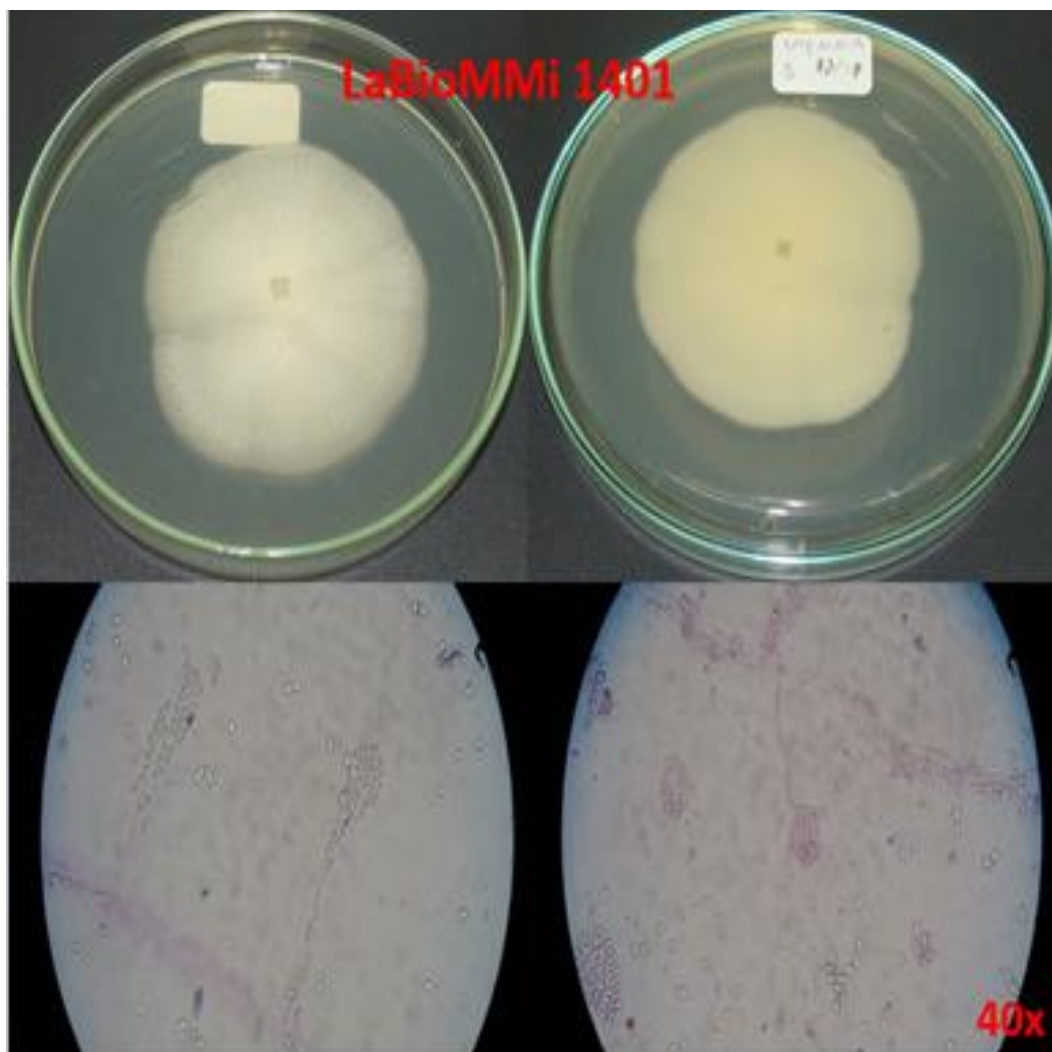


FIGURA 65: *LaBioMMi 1401*, ISOLADO A PARTIR DO MALTE VIENNA.

TABELA 18- RESULTADO DO MALDI-TOF, UTILIZANDO A FERRAMENTA BIOTYPER.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>LaBioMMi 1401</i>	3	-
2 (+++)	<i>LaBioMMi 1402</i>	2,739	-
3 (+++)	<i>LaBioMMi 1396</i>	2,716	-
4 (+++)	<i>LaBioMMi 1400</i>	2,702	-
5 (+++)	<i>LaBioMMi 1397</i>	2,686	-
6 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_188 LBK</i>	1,518	215419
7 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_007 LBK</i>	1,496	215419
8 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_322 LBK</i>	1,49	215419
9 (-)	<i>Vibrio xuii DSM 17185T HAM</i>	1,337	170661
10 (-)	<i>Salmonella sp (choleraesuis) 08 LAL</i>	1,303	591

Os cromatogramas do extrato do fungo *LaBioMMi 1401* cultivados em meio de cevada e milho e alguns espectros encontrados são apresentados abaixo nas FIGURA 66 e 67 respectivamente.

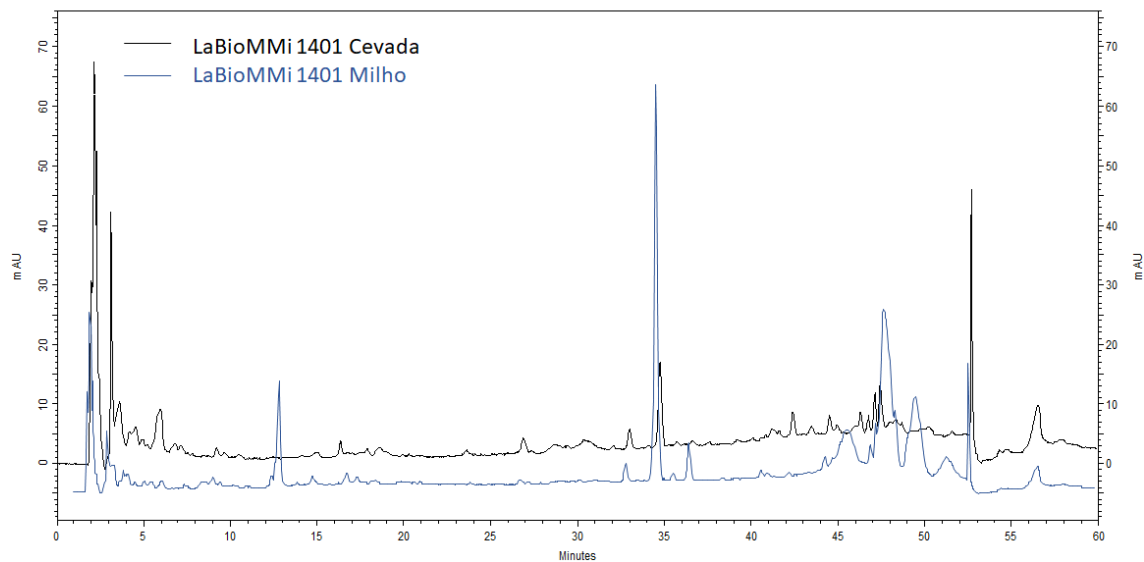
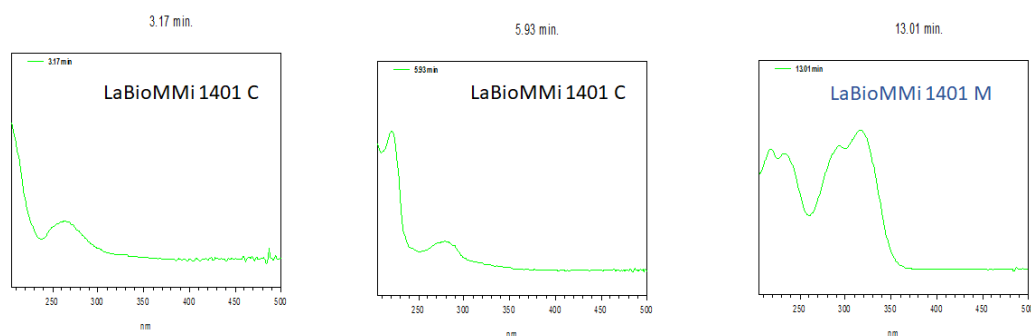


FIGURA 66 – CROMATOGRAMAS DO EXTRATO DO FUNGO *LABIOMMI 1401* NOS MEIO DE CEVADA E MILHO.



Legenda:

LaBioMMi 1401 C – LaBioMMi 1401 em cevada

LaBioMMi 1401 M – LaBioMMi 1401 em milho

FIGURA 67 - ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DE ALGUNS METABOLITOS DO FUNGO *LABIOMMI 1399* NO MEIO DE CEVADA E MILHO.

O último isolado do Malte Vienna, é o *LaBioMMi 1402*, e algumas informações sobre ele é mostrado na FIGURA 68 e Tabela 20. A ferramenta Biotyper mostra uma correlação com o gênero *Geotrichum sp.*, no qual pode ser possível observar pelas imagens de microcultivo a presença arthroconideos e uma coloração creme, sendo estes microrganismos muito parecidos ao comparados acima. Não foi realizada a análise por cromatografia líquida com detecção UV para o extrato desse fungo nos meios de cevada, milho e arroz, pois o mesmo não chegou a crescer nesse tipo de substrato.

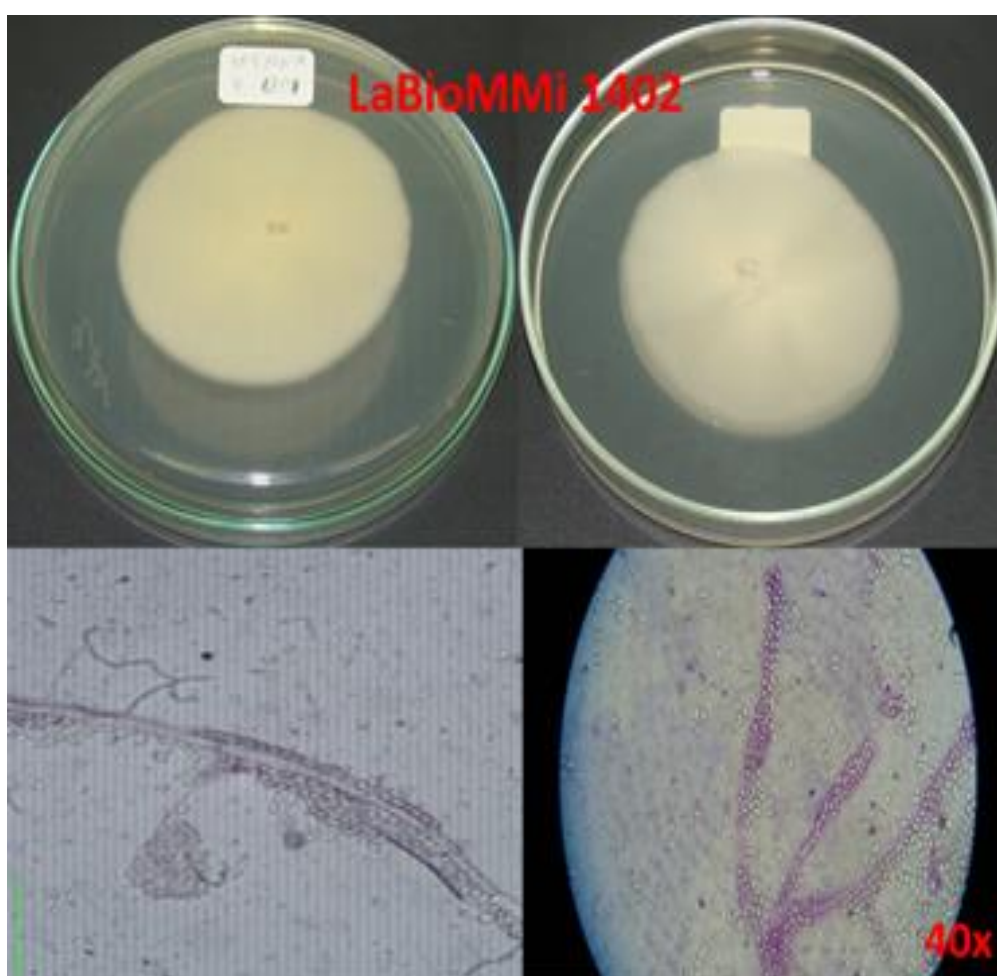


FIGURA 68: *LaBioMMi 1402*, ISOLADO A PARTIR DO MALTE VIENNA.

TABELA 19- RESULTADO DO MALDI-TOF, UTILIZANDO A FERRAMENTA BIOTYPER

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	<i>LaBioMMi 1402</i>	3	-
2 (+++)	<i>LaBioMMi 1401</i>	2,745	-
3 (+++)	<i>LaBioMMi 1400</i>	2,688	-
4 (+++)	<i>LaBioMMi 1396</i>	2, 676	-
5 (+++)	<i>LaBioMMi 1397</i>	2,631	-
6 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_188 LBK</i>	1,629	215419
7 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_007 LBK</i>	1,54	215419
8 (-)	<i>Geotrichum silvícola 04_322 LBK</i>	1,54	215419
9 (-)	<i>Salmonella sp (entérica st Anatum) 11</i> <i>LAL</i>	1,34	58712
10 (-)	<i>Geotrichum candidum RV_02 VML</i>	1,308	27317

Utilizando de ferramentas disponíveis pelo software MALDI Biotyper (Bruker TM), foi possível construir um dendograma FIGURA 69 e 69.1 dos fungos isolados a partir dos seus Mass Spectrometry Proteomic (MSP – do inglês: Espectro de Massas Proteômica). Percebe-se que duas espécies *LaBioMMi 1398* e *LaBioMMi 1399*, são microrganismos que se diferem entre si um nível de distância acima de 700, FIGURA 69. Estes dois microrganismos se diferem a um nível de distância dos demais microrganismos isolados, em torno de 1000, mostrando a diferença entre as espécies isoladas.

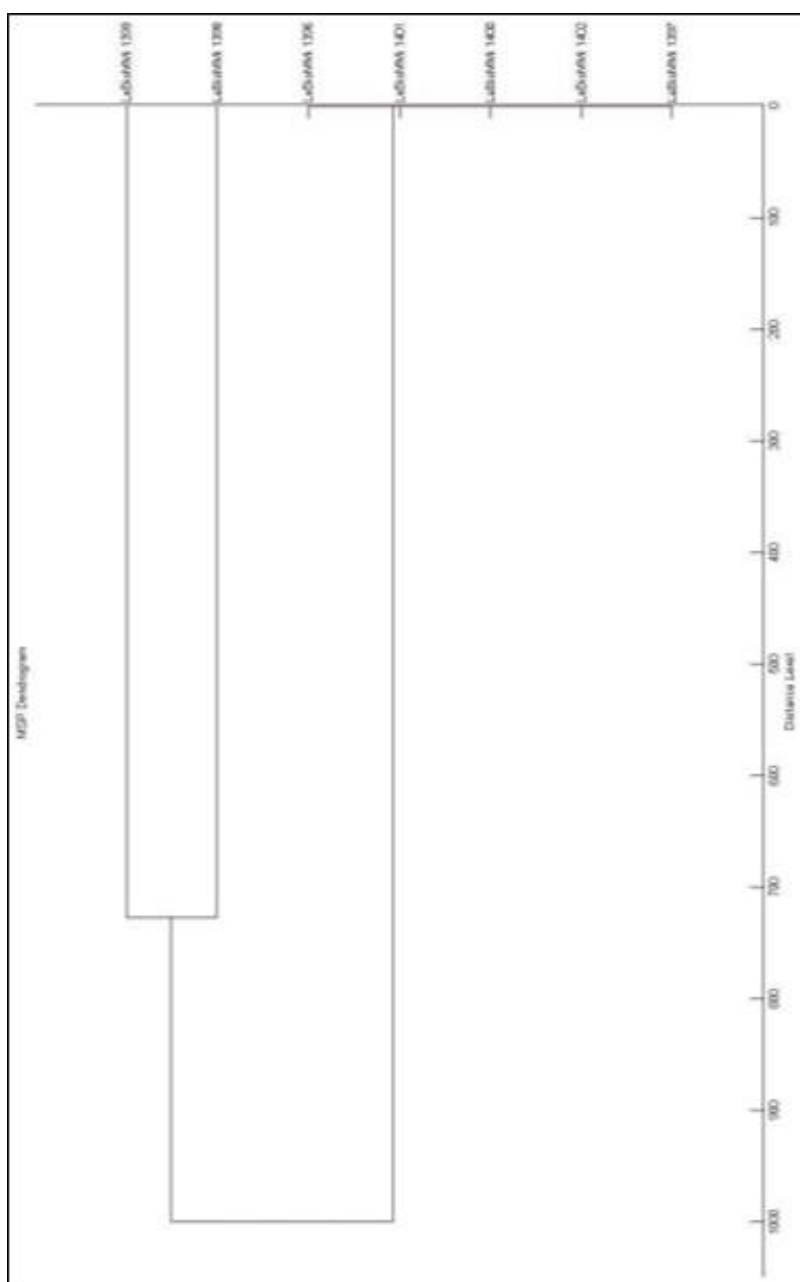


FIGURA 69 - DENDOGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS MSP DOS FUNGOS ISOLADOS.

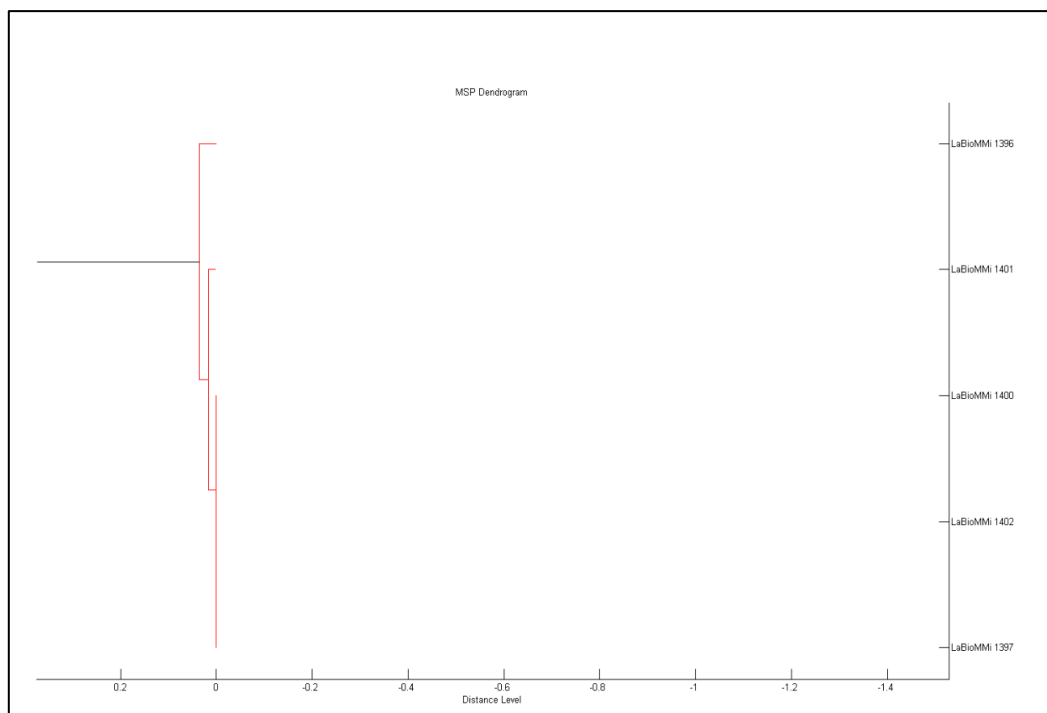


FIGURA 69.1 – DENDOGRAMA DOS FUNGOS ISOLADOS (APROXIMAÇÃO).

4.4.2 Bactérias Isoladas

Em relação aos outros microrganismos isolados foram observadas cerca de 17 bactérias, TABELA 21, porém dentre estas algumas cepas isoladas não foram possíveis isolar no Maldi-TOF, pois foram perdidas, por não crescerem no meio de cultivo que seria utilizado, dentre elas são a *LaBioMMi 1405*, *1406*, *1407*, *1408*, *1410*, *1414*, *1416*, *1417* e *1419*.

Observa-se que os maltes Munich II e Vienna, foram os maltes que foi possível isolar mais microrganismo, seguidos de Pilsen e Trigo, apenas duas bactérias foram isoladas do malte Munich I e Pale Ale.

Os maltes Vienna e Munich são produzidos de forma semelhantes, onde a etapa de secagem chega a uma temperatura de 100°C, o que mostra a presença algumas bactérias que possuem uma resistência a antibióticos e a altas temperaturas.

Ao observar o dendrograma (FIGURA 70 e 70.1), a seguir, percebe-se que existe uma boa semelhança (distância menor 4) entre os microrganismos *LaBioMMi 1401_1*, *1411*, *1412*, *1415* e *1420_1*. Já os isolados *LaBioMMi 1418* e *1420_2* possuem uma semelhança com os isolados anteriores a uma distância menor que 6. Esses isolados anteriores mostram um “score value” (maior que 2,300; o mais

próximo de 3,000, maior a chance do microrganismo ser da mesma espécie) o que leva a entender que são microrganismos possuem características que os levam a mesma espécie, porém o isolado 1404_2 possui uma semelhança menor quando comparado aos isolados anteriores (distância menor que 300) e observando o relatório gerado pelo software, ele possui uma semelhança apenas uma semelhança com o isolado *LaBioMMi 1420_2* a nível de gênero.

Os isolados *LaBioMMi 1403* e *1413*, se assemelham a uma distância menor que 600, que então vai possuir características parecidas com o grupo *LaBioMMi 1409* e *1404_2* a um nível de distância em torno de 1000. Já o isolado *LaBioMMi 1409*, possui uma semelhança em um nível de distância em torno de 700 com o grupo *LaBioMMi 1404_2* e *1420_2*. Já em relação aos dados de “score value” gerado pelo software estes não apresentam semelhança significativa com os dados gerados, portanto não foi possível gerar a identificação.

TABELA 20- BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DA SEMENTE DE MALTE.

	Tipo de Malte	Microrganismos
<i>Bactérias</i>	Munich I A	<i>LaBioMMi 1403</i>
	Munich I B	<i>LaBioMMi 1404</i>
	Munich II A	<i>LaBioMMi 1405</i>
	Munich II B	<i>LaBioMMi 1406</i>
	Munich II C	<i>LaBioMMi 1407</i>
	Munich II	<i>LaBioMMi 1408</i>
	Pale ale A	<i>LaBioMMi 1409</i>
	Pale ale B	<i>LaBioMMi 1410</i>
	Pilsen A	<i>LaBioMMi 1411</i>
	Pilsen B	<i>LaBioMMi 1412</i>
	Pilsen C	<i>LaBioMMi 1413</i>
	Trigo A	<i>LaBioMMi 1414</i>
	Trigo B	<i>LaBioMMi 1415</i>
	Trigo C	<i>LaBioMMi 1416</i>
	Vienna A	<i>LaBioMMi 1417</i>
	Vienna B	<i>LaBioMMi 1418</i>
Vienna C	<i>LaBioMMi 1419</i>	
Vienna D	<i>LaBioMMi 1420</i>	

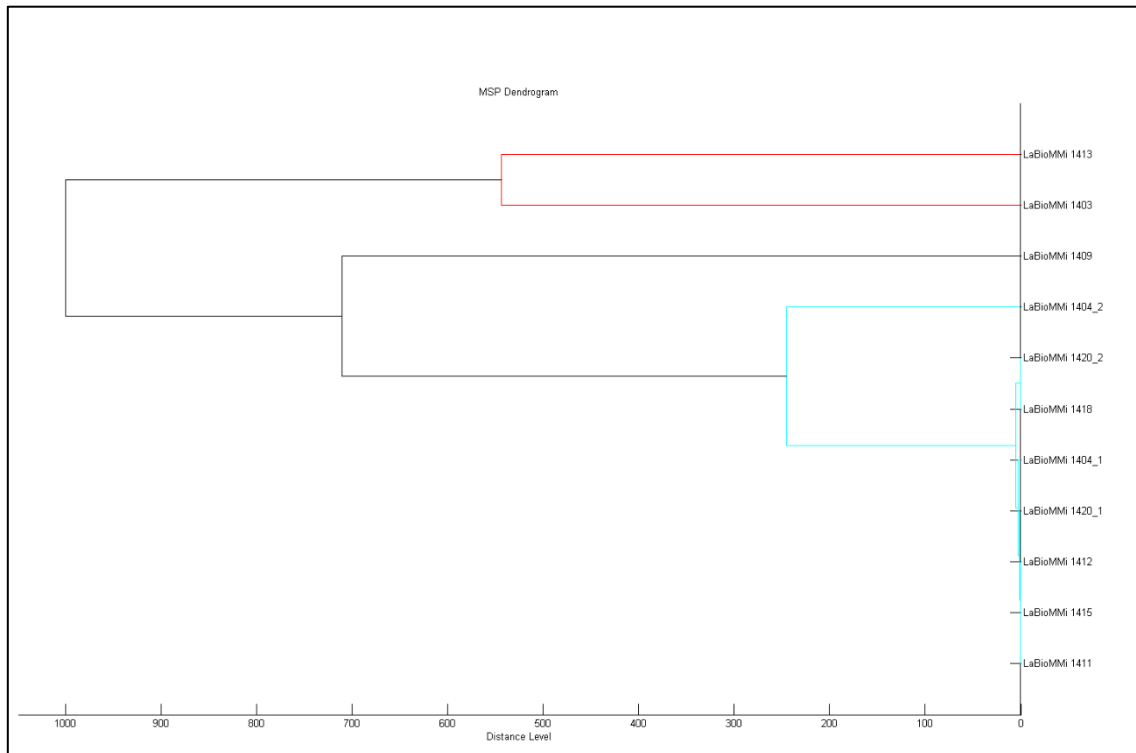


FIGURA 70: DENDOGRAMA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

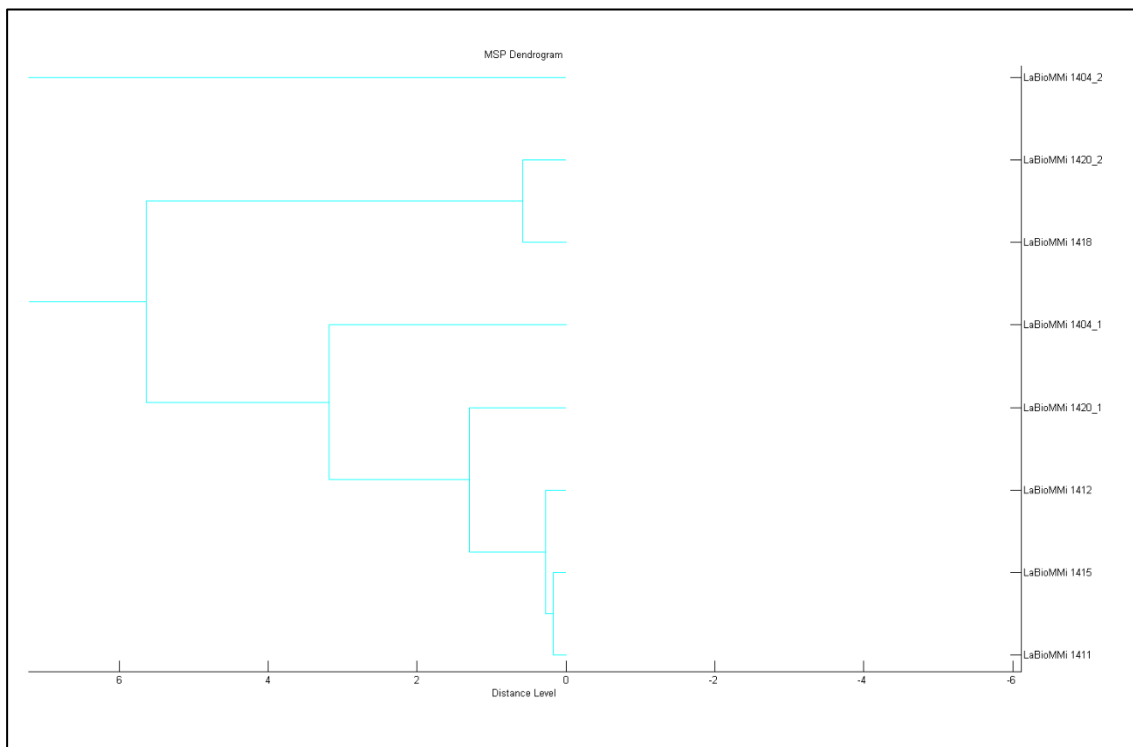
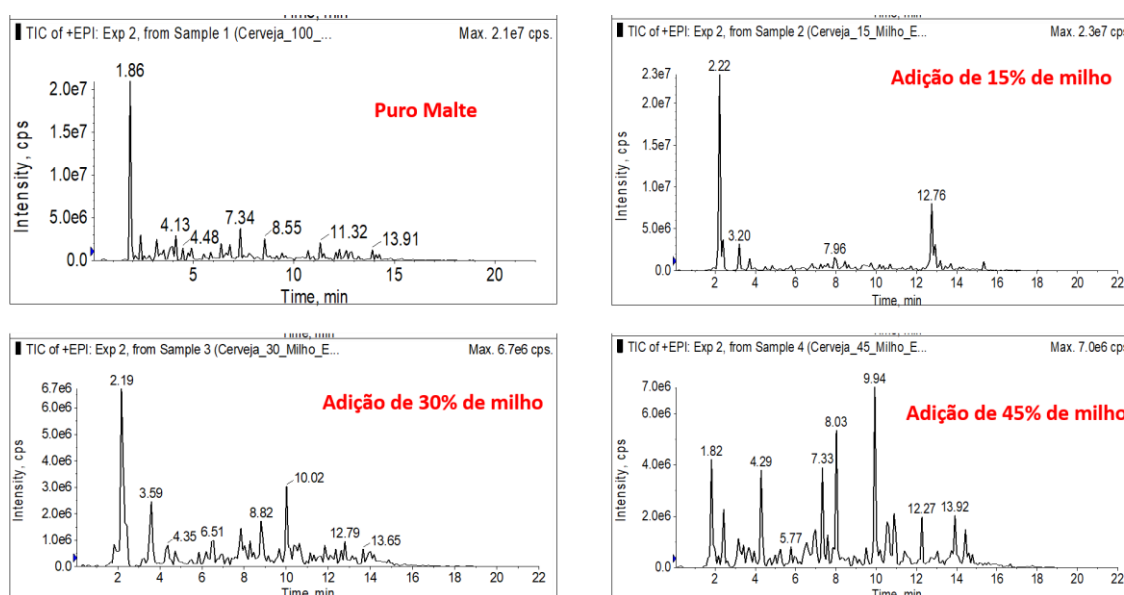


FIGURA 70.1: DENDOGRAMA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS (APROXIMAÇÃO)

4.5 Resultados das Cervejas Produzidas em Escala Laboratorial

Ao longo do projeto foram feitas um total de 9 cervejas produzidas em escala de laboratório com diferentes proporções de adição de adjunto de milho e arroz. Entre as cervejas produzidas e analisadas estão a Cerveja Puro Malte (100% de cevada maltada), Cerveja com adição de 15% de adjunto de milho, Cerveja com 30% de adição de adjunto de milho e Cerveja com 45% de adição de adjunto de milho.

Foram analisadas as micotoxinas Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Deoxinivalenol, Isso-deoxinivalenol, Nivalenol, HT-2, T2, Zearalenona, Zearalanona, α -Zearalenol, β -Zearalenol, Fumonisina B1, Fumonisina B2, Fumonisina B3 e Ocratoxina. No qual não foi identificado nenhuma micotoxina nas cervejas analisadas, no qual o não identificar, não significa que elas não possam estar presente, pois, como não houve uma validação do método, não podemos dizer que não estão, sendo as vezes o método utilizado não tenho um limite de detecção tão baixo o quanto necessite para identificar essas micotoxinas, já que estas são produzidas em pequenas quantidades pelos microrganismos, além disso os cereais que foi utilizado no estudo poderiam não estar contaminados com micotoxinas. Na FIGURA 71 e 72 é possível observar os cromatogramas das Cerveja Puro Malte (100% de cevada maltada), Cerveja com adição de 15% de adjunto de milho, Cerveja com 30% de adição de adjunto de milho e Cerveja com 45% de adição de adjunto de milho.



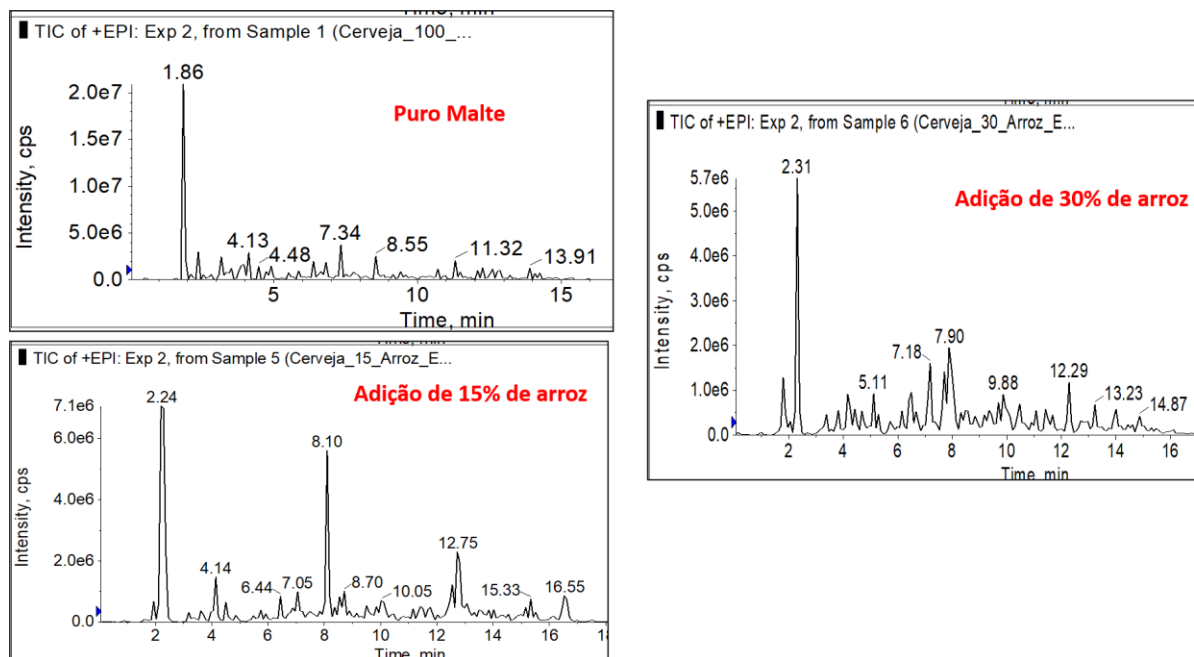


FIGURA 72 - CERVEJA 100% MALTE DE CEVADA E COM 15% E 30% DE ADIÇÃO DE ARROZ.

Para analisar as cervejas, foram feitos experimentos de (Enhanced mass scan – EMS), no qual foi obtido uma varredura de íons totais realizados pelo espectrômetro de massa Ion Trap linear e para traçar um perfil químico das substâncias presentes, foram feitos experimentos de data-dependent acquisition (DDA), no qual se seleciona os 5 picos mais intensos do Cromatograma de Pico Base e realiza-se a fragmentação (MS/MS) destas moléculas.

Na TABELA 22, referente as Cerveja Puro Malte (100% de cevada maltada), Cerveja com adição de 15% de adjunto de milho, Cerveja com 30% de adição de adjunto de milho e Cerveja com 45% de adição de adjunto de milho, é possível observar (FIGURA 73) alguns compostos, e dentre as classes encontrados temos aminoácidos, flavonoides, compostos fenólicos, alguns ácidos orgânico provenientes do lúpulo e açúcares.

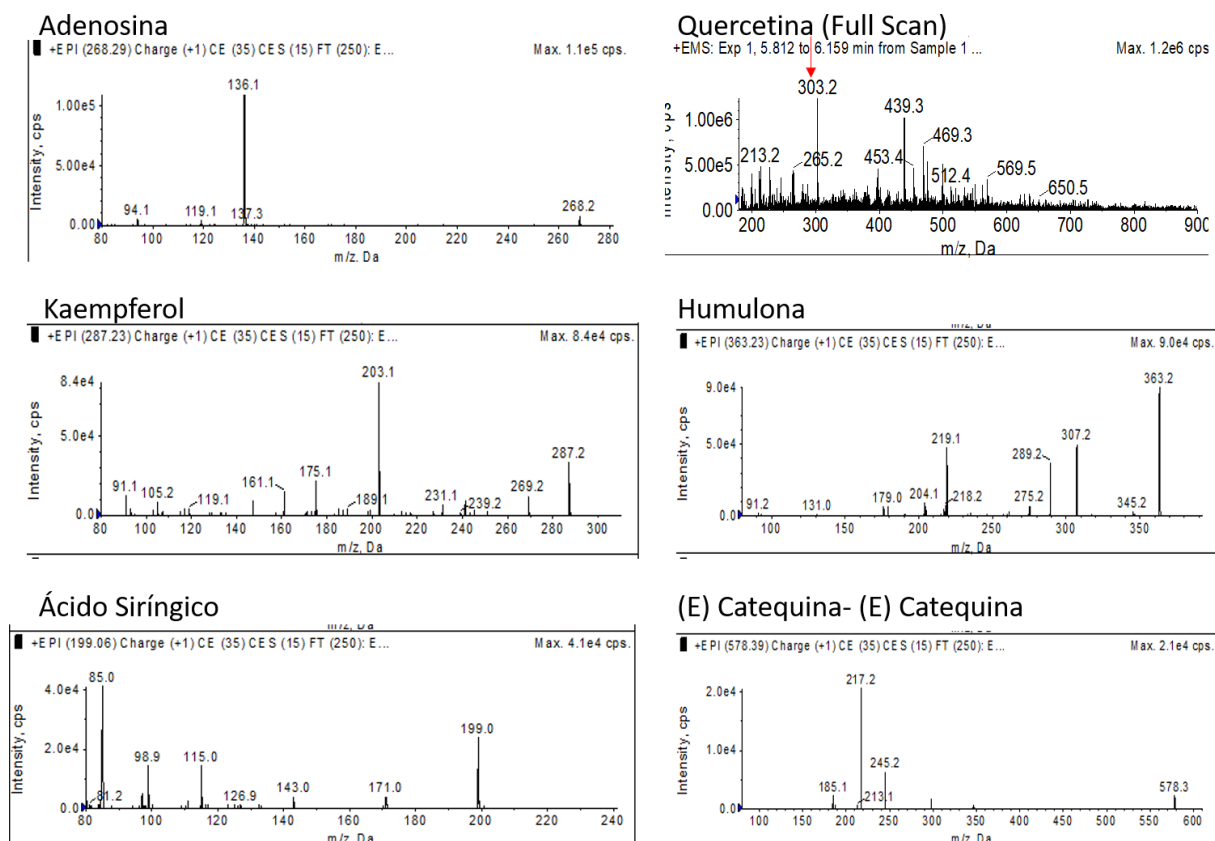


FIGURA 73 - MS/MS DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NA CERVEJA 100% MALTE DE CEVADA E MILHO.

Na TABELA 23, está mostrado os resultados das cervejas Cerveja Puro Malte (100% de cevada maltada), Cerveja com adição de 15% de adjunto de arroz, Cerveja com 30% de adição de adjunto de arroz. As micotoxinas Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Deoxinivalenol, Isso-deoxinivalenol, Nivalenol, HT-2, T2, Zearalenona, Zearalanona, α -Zearalenol, β -Zearalenol, Fumonisina B1, Fumonisina B2, Fumonisina B3 e Ocratoxina, no qual também não foi observar a presença dessas micotoxinas na cerveja com adição de adjunto de arroz. Embora com o experimento de EMS (Enhanced mass scan), foi possível identificar nestas análises compostos provenientes do lúpulo como humulona e compostos provenientes da cevada como a hordatina, quercetina e antocianidinas como a mirtilina, no qual podem ser observados na FIGURA 74.

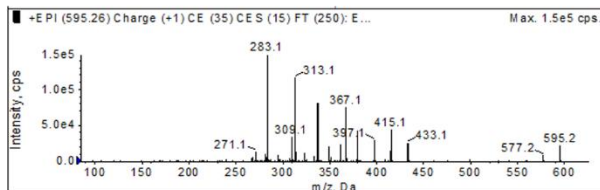
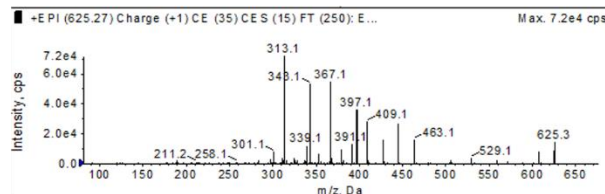
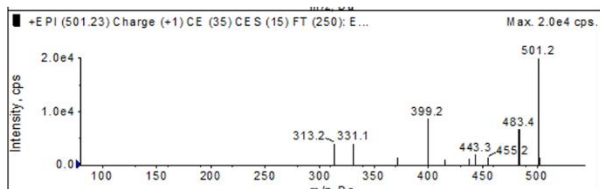
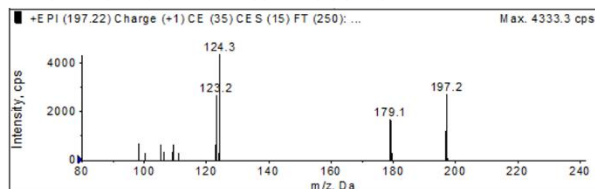
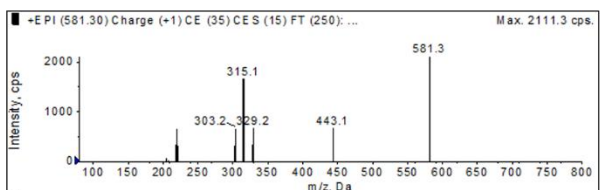
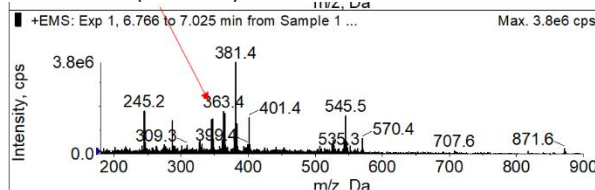
(E) – Catequina – (E) - Catequina**Rhamnosylhexosyl methyl quercetin****Mirtilina****2-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl) propanoic acid****Hordatina B****Humulona (Full Scan)**

FIGURA 74 - MS/MS DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NA CERVEJA DE ARROZ.

Não foram analisadas as amostras de Cerveja com 45% de adição de adjunto de arroz, Cerveja com adição de 80% cevada, 10% milho, 10% arroz e a Cerveja com adição de 60% cevada, 20% milho e 20% arroz, por motivo de saída para trabalho em ambiente privado.

TABELA 21: COMPOSTOS ENCONTRADOS NA CERVEJA 100% PURO MALTE E COM ADIÇÃO DE ADJUNTO DE MILHO.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de milho	Cerveja 30% de adição de milho	Cerveja 45% de adição de milho
2-O-b-D-Xylopyranosyl-L-arabinose	283			X	
6-Geranyl	409				X
Adenosine	268	X			
Chrorogenic acid	355	X	X	X	X
Colupulone	401	X	X	X	X
Coumaroylagmatin _e	277		X		
Coumaroylagmatin e hexoside	439		X		
Coumaroyl-OH-agmatine	293	X			
Coumaroyl-OH-agmatine	455	X			X
N/ID	282	X			
N/ID 1	287	X	X	X	X
N/ID 2	372	X	X	X	X
N/ID 3	293	X			X

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de milho	Cerveja 30% de adição de milho	Cerveja 45% de adição de milho
N/ID 4	671	X			
N/ID 5	494	X			
N/ID 6	191	X			
N/ID 7	486	X			
N/ID 8	625	X			
N/ID 9	630	X			
N/ID 10	438	X			
N/ID 11	498	X			
N/ID 12	470	X			
N/ID 13	561	X			
N/ID 14	368	X			
N/ID 15	245	X			
N/ID 16	385	X			

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de milho	Cerveja 30% de adição de milho	Cerveja 45% de adição de milho
N/ID 17	510	X			
N/ID 17	554	X			
N/ID 18	295	X			
N/ID 19	538	X			
N/ID 20	235	X			
N/ID 21	616	X			
N/ID 22	447	X			
N/ID 23	522	X			
N/ID 24	784	X			
N/ID 25	747	X			
N/ID 27	678	X			
N/ID 28	761	X			
N/ID 29	783	X			

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de milho	Cerveja 30% de adição de milho	Cerveja 45% de adição de milho
N/ID 30	736	X			
N/ID 31	254		X		X
N/ID 32	395		X	X	
N/ID 33	578		X		
N/ID 34	454		X		
N/ID 35	470		X		
N/ID 36	704		X		X
N/ID 37	774		X		
N/ID 38	347		X		
N/ID 39	428		X		
N/ID 40	509		X		
N/ID 41	353		X		
N/ID 42	546		X		

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de milho	Cerveja 30% de adição de milho	Cerveja 45% de adição de milho
N/ID 43	590		X		
N/ID 44	782		X		
N/ID 45	737		X		
N/ID 46	540		X		
N/ID 47	553			X	
N/ID 48	557			X	
N/ID 49	274			X	
N/ID 50	534			X	
N/ID 51	421			X	
N/ID 52	525			X	
N/ID 53	470			X	
N/ID 54	732			X	
N/ID 55	363			X	

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de milho	Cerveja 30% de adição de milho	Cerveja 45% de adição de milho
N/ID 56	402			X	
N/ID 57	264			X	
N/ID 58	491			X	
N/ID 59	442			X	
N/ID 60	500			X	
N/ID 61	369			X	
N/ID 62	457			X	
N/ID 63	507			X	X
N/ID 64	539			X	
N/ID 65	766			X	
N/ID 66	279				X
N/ID 67	282				X
N/ID 68	671				X

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de milho	Cerveja 30% de adição de milho	Cerveja 45% de adição de milho
N/ID 69	484				X
N/ID 70	488				X
N/ID 71	376				X
N/ID 72	625	X			
N/ID 73	233				X
N/ID 74	542				X
N/ID 75	292				X
N/ID 76	524				X
N/ID 77	395				X
N/ID 78	550				X
N/ID 79	288				X
N/ID 80	363				X
N/ID 81	382				X

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

TABELA 22: COMPOSTOS ENCONTRADOS NA CERVEJA 100% PURO MALTE E COM ADIÇÃO DE ADJUNTO DE ARROZ.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de arroz	Cerveja 30% de adição de arroz
Prodelphinidina B3	595	X	X	
Adhumulona	377	X		
Catequina	291	X	X	X
Ácido Clorogênico	355	X		
Colupulona	401	X		
Humulona	363	X	X	X
Quercetina	303	X	X	X
Kaempferol	287	X	X	X
Coumaroyl-OH- asmatina	293	X		
Adenosina	268	X		
Mirtilina	501		X	
N/ID	282	X		
N/ID 1	323	X		

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de arroz	Cerveja 30% de adição de arroz
N/ ID 2	455	X		
N/ ID 3	671	X		
N/ ID 4	494	X		
N/ ID 5	191	X		
N/ ID 6	486	X		
N/ ID 7	425	X	X	
N/ ID 8	630,4	X		X
N/ ID 9	438,2	X		
N/ ID 10	498,2	X		
N/ ID 11	470,2	X		
N/ ID 12	561,4	X	X	
N/ ID 13	368,3	X		
N/ ID 14	245,2	X		

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de arroz	Cerveja 30% de adição de arroz
N/ ID 15	385,4	X		
N/ ID 16	510,41	X	X	
N/ ID 17	554,3	X		
N/ ID 18	295,3	X		
N/ ID 19	538,3	X		
N/ ID 20	235,1	X		
N/ ID 21	616,5	X		
N/ ID 22	447,2	X		
N/ ID 23	522,3 _v	X		
N/ ID 24	784,6	X		
N/ ID 25	747,51	X		X
N/ ID 26	678,59	X	X	X
N/ ID 27	551,3	X		

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de arroz	Cerveja 30% de adição de arroz
N/ ID 28	761,6	X		
N/ ID 29	783,7	X		
N/ ID 30	736,7	X		
N/ ID 31	439,3		X	
N/ ID 32	425,28		X	
α -Tocotrienol	369,19		X	
N/ ID 33	524,42			X
N/ ID 34	453,24		X	
N/ ID 35	276,27		X	
N/ ID 36	522,33		X	
N/ ID 37	569,42		X	
Zeaxanthin	397,36		X	
N/ ID 38	517,2		X	

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de arroz	Cerveja 30% de adição de arroz
N/ ID 39	535,14		X	
N/ ID 40	545,4		X	X
N/ ID 41	507,38		X	
N/ ID 42	359,35		X	X
N/ ID 43	331,22		X	
N/ ID 44	423,34		X	
N/ ID 45	501,23		X	
N/ ID 46	431,4		X	
N/ ID 47	470,3		X	
N/ ID 48	587,39		X	
N/ ID 49	459,34		X	
N/ ID	573,55		X	
N/ ID 51	388,34		X	

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de arroz	Cerveja 30% de adição de arroz
N/ ID 52	656,6		X	
N/ ID 53	672,66		X	
N/ ID 54	197,22			X
2-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl) propanoic acid	660,46			X
N/ ID 55	635,37			X
N/ ID 56	511,37			X
N/ ID 57	492,35			X
N/ ID 58	527,41			X
N/ ID 59	519,33			X
N/ ID 60	417,25			X
N/ ID 61	387,25			X
N/ 62	496,32			X
Hordatina	581,3			X

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

Continua.

Compostos	m/z	Cerveja 100% Puro Malte	Cerveja 15% de adição de arroz	Cerveja 30% de adição de arroz
N/ ID 63	372,33			X
N/ ID 64	742,52			X
N/ ID 65	387,25			X
N/ ID 66	385,26			X
N/ ID 67	451,3			X

Legenda: Não-identificado (N/ ID).

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, podemos chegar as seguintes conclusões:

- Fungos patogênicos do gênero *Fusarium sp.* e *Aspergillus flavus*, são micro-organismos que podem facilmente contaminar os principais insumos, que são utilizados no processo de fabricação de cerveja, visto que quando cultivados em cereais produzem quantidades relevantes de metabólitos secundários quando comparamos extrato fúngico com extrato obtido dos cereais.
- Foi observada a produção de diversos tipos de micotoxinas, provenientes de seu metabolismo secundário, como Zearalenona, α -Zearalenol e β -Zearalenol, Nivalenol, Fumonisina B2 e Aflatoxinas que no caso a encontrada foi a Aflatoxina B1.
- Em relação as micotoxinas em cervejas artesanais, estas não foram encontradas, porém as mesmas poderiam não estar presentes nas amostras na qual foi produzida as cervejas, ou estar por estarem em quantidades muito baixas, entretanto como não houve uma validação da metodologia utilizada não sabemos o limite de detecção do método.
- Técnicas de detecção como LC-MSMS, se mostraram muito mais sensível e eficaz na detecção destes compostos quando comparada com a técnica LC-UV, pois são moléculas que são produzidas em quantidades muito baixas e que em alguns casos a própria estrutura da molécula não favorece o uso da técnica por este método.
- Em relação a cervejas está se mostrou uma matriz extremamente complexa com inúmeros compostos que coeluem, no mesmo tempo de retenção, além disso um dos objetivos era utilizar marcadores, moléculas que cada cereal tem em comum a fim de utilizar na identificação de qual cereal é utilizado nas cervejas. Compostos como aminoácidos, flavonoides, compostos fenólicos, alguns ácidos orgânico provenientes do lúpulo e açucares foram encontrados.
- Diversos tipos de micro-organismos foram isolados de vários tipos de sementes de cevada, o que mostra que apesar do cereal sofrer alguns processos na qual envolvem temperatura e umidade estes microrganismos se mostraram capazes de sobreviver a condições de estresse e quando colocados em ambientes favoráveis ainda são capazes de se desenvolver, dentre eles

possíveis fungos do gênero *Fusarium sp.* e *Muccor sp.*, o que mostra que além de se comportarem como patógenos, ainda são microrganismos endofíticos que podem estar em um estado de latência.

- Além disso muitas espécies de fungos dimórficos foram isoladas, mostrando que estes podem se comportar como leveduras, nos quais quem sabe um dia podemos pensar em processos de fermentação aeróbico no processo de fabricação de cervejas.
- Apesar do uso de antibióticos diversas espécies de bactérias também puderam ser encontradas, mostrando a extrema diversidade de microrganismos que vivem endofiticamente em cereais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N., Plant Pathology. 3rd ed.; Academic Press: New York, 1989.
- ALPER I.; FRENETTE M.; LABRIE, S. Genetic diversity of dairy *Geotrichum candidum* strains revealed by multilocus sequence typing . *Appl Microbiol Biotechnol*, v.97, p.5907–5920, 2013.
- ARAGUÁS, C., GONZÁLEZ-PEÑAS, E. AND LÓPEZ DE CERAIN, A., Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chemistry*, 2005, 92, 459-464.
- 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.
- BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., MIKULÍKOVÁ, R., & SVOBODA, Z. (2011). Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food chemistry*, v. 126, n. 1, p. 321-325, 2011.
- BELHASSEN, H., JIMÉNEZ-DÍAZ, I., GHALI, R., GHORBEL, H., MOLINA-MOLINA, J. M., OLEA, N., & HEDILI, A. (2014). Validation of a UHPLC–MS/MS method for quantification of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol and zearalanone in human urine. *Journal of Chromatography B*, v. 962, p. 68-74, 2014.
- BENNET, J.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BOTHA, A., & BOTES, A. *Mucor*. 2014
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Detecção e identificação dos fungos de importância médica. Módulo VII, 2004. Available at: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acessado em: 07 de março de 2019.
- BRASIL. Decreto n. 2.314, de 4 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei n. 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. Brasília, 1997. Disponível em: <http://www.dfsp.gov.br/sipag_vegetal/legislacao/19970905DEC02314.doc>. Acesso em: 02 jul. 2019.
- BRUINS, A. P., & NIESSEN, W. M. A. Mass Spectrometry| Atmospheric-pressure ionization. In: Elsevier Reference Module Chemical, Molecular Sciences and Engineering. 2013.
- BULLERMAN, L. B., & BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. *International journal of food microbiology*, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, 2007.
- CARROLL, G., Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology* 1988, 69, (1), 2-9.
- CASTÁNARES, E., ALBUQUERQUE, D. R., DINOLFO, M. I., PINTO, V. F., PATRIARCA, A., CIACCIZANELLA, J. R., et al. Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells. *Food and chemical toxicology*, v. 36, n. 9-10, p. 791-804, 1998.
- CERVBRASIL – Associação brasileira da indústria da cerveja (2014). Anuário (2014). p03-33. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuariofinal2014.pdf>
- CHALUPOVÁ J, RAUS, M., SEDLÁŘOVÁ, M., & ŠEBELA, M., Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology advances*, v. 32, n. 1, p. 230-241, 2014.

- CHERNICK, V. *Kendig's disorders of the respiratory tract in children* (pp. 349-359). Philadelphia: Saunders. (1990). 2019, Pages 507-527.e3
- COONEY, J. M.; HOTTER, G. S.; LAUREN, D. R., Biotransformation of the Trichoderma metabolite 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one by cell suspension cultures of *Pinus radiata*. *Phytochemistry* 2000, 53, (4), 447-450.
- DE RUYCK, K., DE BOEVRE, M., HUYBRECHTS, I., DE SAEGER, S., 2015. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 766, p. 32-41, 2015.
- DEWICK, P. M., *Medicinal Natural Products*. 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2004.
- DIRHEIMER, G., & CREPPY, E. E. Mechanism of action of ochratoxin A. IARC scientific publications, n. 115, p. 171-186, 1991.
- Douglas DJ, Frank AJ, Mao D*. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, v. 24, n. 1, p. 1-29, 2005.
- EDWARDS, S. G. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology letters*, v. 153, n. 1, p. 29-35, 2004.
- ESCRIVA, L., FONT, G., MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 78, p. 185-206, 2015.
- FABERI, A.; FOGLIA, P.; PASTORINI, E.; SAMPERI, R.; LAGANA, A., Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQlinear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, (2), 275-282.
- GAUTAM, Ajay Kumar; AVASTHI, Shubhi. Fungal endophytes: potential biocontrol agents in agriculture. In: *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology*. Woodhead Publishing, 2019, 14, p. 241-283..
- GELDERBLUM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; VLEGGAAR, R.; THIEL, P. G.; CAWOOD, M. E., Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia* 1992, 117, (1-2), 11-16.
- GELDERBLUM, W. C.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N. P., Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 1988, 54, (7), 1806-11.
- GNONLONFIN, G.J., HELL, K., ADJOVI, Y., FANDOHAN, P., KOUDANDE, D.O., MENSAH, G.A., SANNI, A., BRIMER, L., 2013. A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: a sub-Saharan African perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 53, n. 4, p. 349-365, 2013.
- HAGER, James W., 2002. Performance of a hybrid RF/DC quadrupole linear ion trap mass spectrometry. MDS SCIEX. Disponivel em: <https://slideplayer.com/slide/3303109/>. Acessado em:22/01/2020.
- HLYWKA, J. J., & BULLERMAN, L. B. (1999). Occurrence of fumonisin B1 and B2 in beer. *Food Additives & Contaminants*, v. 16, n. 8, p. 319-324, 1999.
- HOOG, G.S.; SMITH, M.T.; GUÉHO, E. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. *Studies in Mycology*, v. 29, p.1– 131, 1986.

- JELEN, H. H.; WASOWICZ, E., Determination of trichothecenes in wheat grain without sample cleanup using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2008, 1215, (1-2), 203-207.
- KABAK, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, n. 4, p. 549-554, 2009.
- KAWASHIMA, L. M., VIEIRA, A. P., & VALENTE SOARES, L. M. (2007). Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. *Food Science and Technology*, v. 27, n. 2, p. 317-323, 2007.
- KEW, M.C. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, v. 22, n. 3, 2013.
- KRISHNAMURTHY, T.; SARVER, E. W., Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. III. Synthesis, characterization and applications of pentafluoropropionyl and trifluoroacetyl esters of simple trichothecenes. *J Chromatogr* 1986, 355, (1), 253-64.
- KRISHNAMURTHY, T.; SARVER, E. W.; GREENE, S. L.; JARVIS, B. B., Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. II. Detection and quantitation of macrocyclic trichothecenes by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Assoc Off Anal Chem* 1987, 70, (1), 132-40.
- KRSKA, Rudolf et al. Mycotoxin analysis: An update. *Food additives and contaminants*, v. 25, n. 2, p. 152-163, 2008.
- LEE, S. E., PARK, B. S., BAYMAN, P., BAKER, J. L., CHOI, W. S. AND CAMPBELL, B. C., Suppression of ochratoxin biosynthesis by naturally occurring alkaloids. *Food Addit. Contam.*, 2007, 24, 391-397.
- LEGARDA, T. M. AND BURDASPAL, P. A., Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países europeos, *Alimentaria*, 1998, 291, 115-122.
- GAFFOOR, Iffa; TRAIL, Frances. Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, n. 3, p. 1793-1799, 2006.
- HO, Ch S. et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, v. 24, n. 1, p. 3, 2003.
- Kim, Jung-Eun & Son, Hokyong & Lee, Yin-Won. Biosynthetic mechanism and regulation of zearalenone in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins*, v. 68, p. 1-6, 2018.
- MADRIGAL-SANTILLÁN, E., MORALES-GONZÁLEZ, J. A., SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M., REYES-ARELLANO, A., & MADRIGAL-BUJADAR, E. Investigation on the protective effect of α -mannan against the DNA damage induced by aflatoxin B1 in mouse hepatocytes. *International journal of molecular sciences*, v. 10, n. 2, p. 395-406, 2009.
- MARAGOU, N. C., ROSENBERG, E., THOMAIDIS, N. S., & KOUPPARIS, M. A. Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone, α - and β -zearalenol in beer by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, v. 1202, n. 1, p. 47-57, 2008.
- March, Raymond E (2000). Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 200, n. 1-3, p. 285-312, 2000.
- MARCH, R. E., An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, (4), 351-369.
- MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 60, p. 218-237, 2013.

- MARÍN, S., MAGAN, N., SERRA, J., RAMOS, A. J., CANELA, R., & SANCHIS, V. (1999). Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *Journal of Food Science*, v. 64, n. 5, p. 921-924, 1999.
- MASHEGO MLAWULE, R.; RUMBOLD, K.; DE MEY, M.; VANDAMME, E.; SOETAERT, W.; HEIJNEN JOSEPH, J., *Microbial metabolomics: past, present and future methodologies*. *Biotechnol Lett* 2007, 29, (1), 1-16.
- MAYER, A. M., *Plant-fungal interactions: A plant physiologist's viewpoint*. *Phytochemistry* 1989, 28, (2), 311-317.
- MOL, H. G. J.; PLAZA-BOLANOS, P.; ZOMER, P.; DE RIJK, T. C.; STOLKER, A. A. M.; MULDER, P. P. J., *Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes*. *Anal. Chem.* (Washington, DC, U. S.) 2008, 80, (24), 9450-9459.
- NIXDORF, A., *Innovative interfaces for liquid chromatography/mass spectrometer coupling*. *LaborPraxis* 1999, 23, (2), 16-18.
- OLIVEIRA, N. A. M. (2011). *Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja*. Programa de pós graduação, Minas gerais, UFMG, 44.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S., *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*. Harcourt Brace College Publishers: New York, 1996. Shukla, A. K.; Futrell, J. H., *Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation*. *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, (9), 1069-1090.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A. *Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans*. *Molecular nutrition & food research*, v. 51, n. 1, p. 61-99, 2007.
- PIACENTINI, KARIM & ROCHA, LILIANA & FONTES, LÍVIA & CARNIELLI QUEIROZ, LORENA & REIS, TATIANA & CORRÊA, BENEDITO. *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., & DONALDINI, 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.
- PIMENTA, R. S., ALVES, P. D., CORRÊA JR, A., LACHANCE, M. A., PRASAD, G. S., SINHA, B. R. R. P., & ROSA, C. A. *Geotrichum silvicola sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus Galactomyces*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 1, p. 497-501, 2005
- PLATTNER, R. D., *Detection of fumonisins produced in Fusarium moniliforme cultures by HPLC with electrospray MS and evaporative light scattering detectors*. *Nat Toxins* 1995, 3, (4), 294-8
- PLATTNER, R. D., *HPLC/MS analysis of fusarium mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol*. *Nat Toxins* 1999, 7, (6), 365-70.
- PLATTNER, R. D.; ROSS, P. F.; REAGOR, J.; STEDELIN, J.; RICE, L. G., *Analysis of corn and cultured corn for fumonisin B1 by HPLC and GC/MS by four laboratories*. *J Vet Diagn Invest* 1991, 3, (4), 357-8.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F., *Production of fumonisin analogs by Fusarium species*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, (5), 2101-2105.

- RITTGEN, J.; PUETZ, M.; PYELL, U., Identification of toxic oligopeptides in Amanita fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection. *Electrophoresis* 2008, 29, (10), 2094-2100.
- ROSENBERG, E.; KRŠKA, R.; WISSIACK, R.; KMETOV, V.; JOSEPHS, R.; RAZZAZI, E.; GRASSERBAUER, M., High-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *J Chromatogr A* 1998, 819, (1-2), 277-88.
- RUBERT, J., MAÑES, J., JAMES, K. J., & SOLER, C. Application of hybrid linear ion trap-high resolution mass spectrometry to the analysis of mycotoxins in beer. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 28, n. 10, p. 1438-1446, 2011.
- RUBERT, J., ZUMAN, Z., VACLAVIKOVA, M., ZACHARIASOVA, M., SOLER, C., & HAJŠLOVA, 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.
- RUMORA, L.; KOVACIC, S.; ROZGAJ, R.; CEPELAK, I.; PEPELJNJAK, S.; ZANIC GRUBISIC, T., Cytotoxic and genotoxic effects of fumonisin B1 on rabbit kidney RK13 cell line. *Arch Toxicol* 2002, 76, (1), 55-61.
- RYU, J. C.; YANG, J. S.; SONG, Y. S.; KWON, O. S.; PARK, J.; CHANG, I. M., Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. *Food Addit Contam* 1996, 13, (3), 333-41.
- SCHWARTZ, J. C.; JARDINE, I., Quadrupole ion trap mass spectrometry. *Methods Enzymol* 1996, 270, 552-86.
- SCOTT, P. M. Recent research on fumonisins: a review. *Food additives & contaminants: part A*, v. 29, n. 2, p. 242-248, 2012.
- SCOTT, P. M., Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: Introduction. *Food Addit. Contam.*, 1996, 13, 19-21.
- SCOTT, P. M., Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.*, 1996, 79, 875-882.
- Semple, R. L., Frio, A. S., Hicks, P. A., & Lozare, J. V. Mycotoxin prevention and control in foodgrains. 1991. Disponível em: <http://www.fao.org/3/X5036E/x5036E00.htm#Contents>. Acessado em 13 de janeiro de 2020.
- SENYUVA, H.; GILBERT, J.; OZCAN, S.; GUREL, N., Rapid LC and LC/MS for routine analysis of mycotoxins in foods. *World Mycotoxin J.* 2008, 1, (3), 229-235.
- SEO, J. A.; KIM, J. C.; LEE, Y. W., Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. *J Nat Prod* 1996, 59, (11), 1003-5.
- Shephard, G. S., Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* 2008, 37, (11), 2468-2477.
- SHIMADZU Corporation, 2020. Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry. Disponível em: <https://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html>. Acessado em 21/01/2020.
- SMITH, J. E., *Biotechnology*. 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1997.
- SONGSEMSAKUL, P.; RAZZAZI-FAZELI, E., A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®*, v. 31, n. 11-12, p. 1641-1686, 2008.

- SOUZA, G. D. Toxinas produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*: Aspectos analíticos e químico-ecológicos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 209. Tese de doutorado, 31 p.
- STEFENON, RAFAEL. Vantagens Competitivas Sustentáveis na Indústria Cervejeira: O caso das cervejas especiais. *Revista Capital Científico – Eletrônica (Rcce)*, 2012. Disponível em: Acesso em SOLOMON, Michael R. O comportamento do consumidor: comprando, possuindo e sendo. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 446p.
- SUGA, K., MOCHIZUKI, N., HARAYAMA, K., & YAMASHITA, H. Analysis of trichothecenes in malt and beer by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 63, n. 1, p. 1-4, 2005.
- SUN, Juan et al. QuEChERS purification combined with ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of 25 mycotoxins in cereals. *Toxins*, v. 8, n. 12, p. 375, 2016.
- SWEENEY, Michael J.; DOBSON, Alan DW. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 175, n. 2, p. 149-163, 1999.
- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W., Review: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 43, (3), 141-158.
- TAMURA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Development of a multimycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Sci.* 2011, 27, 629–635.
- TANAKA, H., TAKINO, M., SUGITA-KONISHI, Y., & TANAKA, T. (2006). Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, v. 20, n. 9, p. 1422-1428, 2006.
- TRABULSI, L. R., *Microbiologia*. 2a ed.; Atheneu: São Paulo, 1998.
- Tsuchiya, M., Development, principle and application of liquid ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.* 1998, 14, (4), 661-676.
- TURNER, Nicholas W.; SUBRAHMANYAM, Sreenath; PILETSKY, Sergey A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta*, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009.
- TURNER, W., *Fungal Metabolites*. Academic Press: New York, 1971.
- TURNER, W., *Fungal Metabolites*. Academic Press: New York, 1983; Vol. 2.
- VAN DER MERWE, K. J., STEYN, P. S., & FOURIE, L. (1965). 1304. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, p. 7083-7088, 1965.
- VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M., Application of computational quantum chemistry to chemical processes involved in mass spectrometry. *Quim. Nova* 2008, 31, (4), 840-853.
- WHITEHOUSE, C. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M.; FENN, J. B., Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* 1985, 57, (3), 675-9.
- WHO, 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

WONG, P. S. H.; COOKS, R. G., Ion trap mass spectrometry. *Curr. Sep.* 1997, 16, (3), 85-92.

WU, F., GROOPMAN, J.D., PESTKA, J.J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual review of food science and technology*, v. 5, p. 351-372, 2014.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 1984, 88, (20), 4451-9.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B., Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Phys. Chem.* 1984, 88, (20), 4671-5.

YOST, R. A.; BOYD, R. K., Tandem mass spectrometry: quadrupole and hybrid instruments. *Methods Enzymol* 1990, 193, 154-200. Creaser, C. S.; Stygall, J. W., Recent developments in analytical ion trap mass spectrometry. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 1998, 17, (10), 583-593.

YOST, R. A.; ENKE, C. G., Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100, (7), 2274-2275.

YU, J., 2012. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, v. 4, n. 11, p. 1024-1057, 2012.

ZHANG, Lei et al. A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines. *Toxins*, v. 10, n. 2, p. 65, 2018.

ZINEDINE, A., SORIANO, J.M., MOLTO, J.C., MANES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology*, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.