

KARIM CRISTINA PIACENTINI

Avaliação da estabilidade de micotoxinas na produção de cerveja artesanal e isolamento de fungos com potencial toxigênico e hidrofóbico em cevada cervejeira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2019

KARIM CRISTINA PIACENTINI

Avaliação da estabilidade de micotoxinas na produção de cerveja artesanal e isolamento de fungos com potencial toxigênico e hidrofóbico em cevada cervejeira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Piacentini, Karim Cristina
Avaliação da estabilidade de micotoxinas na
produção de cerveja artesanal e isolamento de fungos
com potencial toxigênico e hidrofóbico em cevada
cervejeira / Karim Cristina Piacentini; orientador
Prof. Dr. Benedito Corrêa . -- São Paulo, 2019.
120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Micotoxinas . 2. Cevada . 3. Cerveja. 4.
Processamento . 5. Gushing . I. , Prof. Dr.
Benedito Corrêa , orientador. II. Título.



Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2416 - ICB III - 06608-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3001-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **815/2016** referente ao projeto intitulado: *"Avaliação da estabilidade de micotoxinas na produção de cerveja artesanal e isolamento de fungos com potencial toxigênico e hidrofóbico em cevada cervejeira"* sob a responsabilidade de **Karim Cristina Placentini** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **José Gregório Cabrera Gomez**, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 08 de junho de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paulo Marinho A. Zanolto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Dedico esta dissertação ao meu marido Raphael, pela paciência, amor, compreensão e também pela companhia nos momentos mais críticos dessa caminhada. A família, pelo apoio, encorajamento, amor e pelos importantes ensinamentos que me foram passados. Por fim, aos amigos como um todo pelos momentos de descontração e também pelo constante apoio.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta tese de doutorado não seria possível sem a participação ativa de diversas pessoas. Nesse sentido, gostaria de aproveitar a oportunidade para agradecer-las.

De antemão, ao Prof. Dr. Benedito Corrêa, meu orientador, pelo voto de confiança, apoio e fundamental contribuição no meu crescimento enquanto pesquisadora e profissional.

A Geovana, Liliana, Lorena e Lívia em especial, minhas grandes amigas e colegas de laboratório, com quem compartilhei minhas dúvidas e que certamente ajudaram a direcionar os rumos de minha tese. Além disso, pela parceria, suporte e amizade que contribuíram na minha vida pessoal.

Aos amigos e companheiros de trabalho integrantes ou ex-integrantes do laboratório de fungos toxigênicos e micotoxinas, Ednei, Tatiana, Víncius, Natália, Rodrigo e Amanda pelos bons momentos de lazer, descontração e inspiração que tornaram a jornada de estudo mais branda e agradável.

A toda minha família, especialmente, aos meus pais, pelo incondicional apoio em todos os momentos de minha vida.

A minha psicóloga, Dra Solveig Milharcic, por estar perto, por ajudar no meu amadurecimento e autoconhecimento.

Ao Raphael Gonçalves, meu grande amigo e marido, que participou juntamente comigo das fases mais importantes do desenvolvimento deste trabalho, sempre com palavras de conforto nos momentos mais difíceis, corroborando para um amadurecimento conjunto de nossa união.

Aos amigos e colegas da República Tcheca, Sylvie, Karolina, Professor Josef, Marek e Pavel pelos intensos 7 meses de estágio e pelas contribuições relevantes que ajudaram a elevar o nível do trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2016/01798-4, pelo apoio e suporte financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio.

Por fim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

"O sofrimento é passageiro. A desistência é para sempre."

(Lance Armstrong)

RESUMO

PIACENTINI, K. C. **Avaliação da estabilidade de micotoxinas na produção de cerveja artesanal e isolamento de fungos com potencial toxigênico e hidrofóbico em cevada cervejeira.** 2019. 120 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O consumo atual da cerveja tem se mostrado significativo com indiscutível tendência de crescimento. Por esse motivo, a qualidade da cerveja e dos ingredientes utilizados em sua produção são cada vez mais relevantes. Uma preocupação latente da indústria cervejeira é a ocorrência de fungos e micotoxinas nos grãos, que acontecem devido a vários fatores, a saber: manejo inadequado da matéria prima, infestação por insetos, método de secagem, tipos de estrutura de armazenamento, bem como as condições ambientais. O gênero *Fusarium* é considerado um dos principais fungos contaminantes em cevada, sendo capaz de produzir micotoxinas como desoxinivalenol e zearalenona e proteínas denominadas hidrofobinas. Essas proteínas têm sido causadoras de *gushing* na cerveja, fenômeno que consiste na formação excessiva de espuma na abertura da garrafa. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a micobiota, a ocorrência de micotoxinas em cevada, bem como a estabilidade desses contaminantes (micotoxinas). Visou, também, analisar o potencial para *gushing* nas amostras de cevada. As amostras utilizadas no estudo foram provenientes da região Sul do Brasil e coletadas após a colheita. O isolamento dos fungos foi realizado por diluição seriada e a identificação realizada por morfologia clássica e técnicas moleculares (sequenciamento e filogenia). As análises de micotoxinas em cevada e os experimentos de estabilidade desses compostos, durante as etapas do processamento da cerveja, foram realizados por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas. Os testes de *gushing* foram realizados de acordo com a metodologia desenvolvida pela Carlsberg. O gênero *Fusarium* foi o fungo mais predominante, sendo 56,26 % dos isolados classificados como pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium sambucinum*, 31,25 % ao complexo de espécies *Fusarium tricinctum*, 8,33 % ao complexo de espécies de *Fusarium fujikuroi* e 2 % aos complexos de espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* e *Fusarium oxysporum*. Com relação a presença de DON e ZEA nas amostras de cevada, a safra de 2016 apresentou contaminação de 90,6 % e 87,5 %, respectivamente. Adicionalmente, em 2015, as amostras apresentaram contaminação de 94 % para DON e 73,6 % para ZEA. Análises durante as etapas de processamento da cerveja, demonstraram diminuição significativa de DON em 71,6 % entre o início (cevada) e final do processo (cerveja). Nos testes de *gushing*, 9 amostras foram positivas, com níveis que variaram de 3 a 124 g/garrafa. Nossos resultados revelaram uma expressiva contaminação por fungos,

micotoxinas e hidrofobinas, comparativamente aos estudos realizados em outros países. Por esse motivo, há necessidade de um monitoramento constante desses grãos, com o intuito de mitigar os riscos à saúde do consumidor e evitar perdas econômicas à indústria. Pesquisas no que tange o fenômeno *gushing*, incluindo análises de expressão gênica do gene da hidrofobina em espécies de *Fusarium* isoladas da cevada brasileira, bem como, testes de qualidade da matéria prima dentro da indústria cervejeira, devem ser aprofundadas.

Palavras chave: Micotoxinas. Cevada. Cerveja. Processamento. *Gushing*.

ABSTRACT

PIACENTINI, K. C. **Mycotoxins stability evaluation during the beer process and fungi isolation with toxigenic and hydrophobic potential in brewing barley**. 2019. 120 f. Ph. D. these (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Current beer consumption has been significant with an evident growth trend. For this reason, the quality of beer and the ingredients used in its production are increasingly relevant. A latent concern of the brewing industry is the occurrence of fungi and mycotoxins in grains, which happen due to several factors, such as: improper handling of the raw material, insect infestation, drying method, types of storage structure, as well as the environmental conditions. The *Fusarium* genus is considered one of the main contaminating fungi in barley, being able to produce mycotoxins such as deoxynivalenol and zearalenone and proteins called hydrophobins. These proteins have been causing gushing in beer, a phenomenon that consists of excessive foaming at the bottle opening. Therefore, the objective of the present study was to evaluate mycobiota, the occurrence of mycotoxins in barley, as well as the stability of these contaminants (mycotoxins). It also aimed to analyze the gushing potential in barley samples. The samples used in the study were from southern Brazil and collected after harvest. Isolation of the fungi was performed by serial dilution and identification by classical morphology and molecular techniques (sequencing and phylogeny). Barley mycotoxin analyzes and stability experiments of these compounds during beer processing were performed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The gushing tests were performed according to the methodology developed by Carlsberg. The genus *Fusarium* was the most predominant fungi, with 56.26 % of the isolates classified as belonging to the *Fusarium sambucinum* species complex, 31.25 % to the *Fusarium tricinctum* species complex, 8.33 % to the *Fusarium fujikuroi* species complex and 2 % to species complex of *Fusarium incarnatum-equiseti* and *Fusarium oxysporum*. Regarding the presence of DON and ZEA in barley samples, 2016 crop presented contamination of 90.6 % and 87.5 %, respectively. Additionally, in 2015, the samples presented contamination of 94 % for DON and 73.6 % for ZEA. Analyzes during the beer processing stages showed a significant decrease of DON by 71.6 % between the beginning (barley) and the end of the process (beer). In the gushing tests, 9 samples were positive, with levels ranging from 3 to 124 g/bottle. Our results revealed a significant contamination by fungi, mycotoxins and hydrophobins, compared to studies conducted in other countries. For this reason, there is a need

for constant monitoring of these grains, in order to mitigate the risks to consumer health and avoid economic losses to the industry. Research on the gushing phenomenon, including gene expression analysis of the hydrophobin gene in *Fusarium* species isolated from Brazilian barley, as well as quality testing of raw material within the brewing industry, should be further investigated.

Keywords: Mycotoxins. Barley. Beer. Processing. *Gushing*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cevada cervejeira.....	22
Figura 2. Processo de maceração em maltearias na República Tcheca.	24
Figura 3. Processo de produção de cerveja.	25
Figura 4. Formação do fenômeno <i>Gushing</i> em cerveja.	33
Figura 5. Filogenia obtida pelo método de máxima parcimônia inferido pelo locus <i>EF-1α</i> e <i>RPB2</i> isolados de grãos de cevada. Valores de <i>bootstrap</i> são indicados na base de cada clado (os ramos eram sustentados se o <i>bootstrap</i> fosse > 70%). O <i>outgroup</i> está representado pela espécie <i>F. verticillioides</i>	44
Figura 6. Contaminação de DON e ZEA nas 19 amostras analisadas de cada região de cultivo (total: 76 amostras). Os dados são demonstrados em média \pm SD; a mesma letra indica que a contaminação pela micotoxina não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).	48
Figura 7. Fluxograma da amostragem dos processos de malteação e produção de cerveja (blocos em cinza) do estudo	58
Figura 8. Etapas dos processos de malteação e produção de cerveja, demonstrando os níveis de (A) DON e (B) ZEA expressados em média \pm SD e diferenças significativas entre as etapas, de acordo com ANOVA seguido do teste de Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).....	60
Figura 9. Filogenia obtida pelo método de máxima parcimônia inferido pelo locus <i>HyD5</i> isolados de grãos de cevada. Valores de <i>bootstrap</i> são indicados na base de cada clado (os ramos eram sustentados se o <i>bootstrap</i> fosse > 70 %). O <i>outgroup</i> está representado pela espécie <i>Tricholomasp</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites para micotoxinas em cevada malteada e outros produtos.	30
Tabela 2. Limites na legislação internacional para micotoxinas em cevada.....	30
Tabela 3. Iniciadores utilizados para PCR e sequenciamento.....	39
Tabela 4. Parâmetros de tempo de retenção e espectrometria de massas utilizados nas análises de micotoxinas.....	40
Tabela 5. Frequência dos membros de cada complexo de espécies de <i>Fusarium</i> isolados de grãos de cevada.....	42
Tabela 6. Características da performance do método para extração de DON e ZEA em grãos de cevada e meio de cultura.....	45
Tabela 7. Contaminação de DON e ZEA em grãos de cevada cervejeira, safra de 2016.....	46
Tabela 8. Ocorrência e co-ocorrência de micotoxinas em grãos de cevada cervejeira de 4 diferentes regiões do Sul do Brasil, safra de 2015.....	47
Tabela 9. Tempo de retenção e parâmetros de espectrometria de massas utilizados na análise das micotoxinas.	56
Tabela 10. Parâmetros de validação do método.....	57
Tabela 11. Valores médios, mínimos e máximos encontrados em todas as etapas da malteação e produção de cerveja.	59
Tabela 12. Estimativa da ingestão diária de micotoxina pelo consumo de cerveja.	61
Tabela 13. Primers utilizados para PCR e sequenciamento.	68
Tabela 14. Amostras positivas no teste de <i>gushing</i> e espécies de <i>Fusarium</i> isoladas.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – análise de variância
- APCI – pressão atmosférica ionização química
- BDA – batata dextrose ágar
- CE – energia de colisão
- CEFF – complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*
- CEFG – complexo de espécies *Fusarium graminearum*
- CEFIE – complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti*
- CEFO – complexo de espécies *Fusarium oxysporum*
- CEFSAM – complexo de espécies *Fusarium sambucinum*
- CEFT – complexo de espécies *Fusarium tricinctum*
- CO₂ – dióxido de carbono
- CPTEC – centro de previsão do tempo e estudos climáticos
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DNTPs – desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DON – desoxynivalenol
- DP – desvio padrão
- EF1- α -fator de elongação 1 alfa
- ESI – ionização por eletrospray
- EUA – estados Unidos
- FAO - food and Agriculture Organization
- IARC – international agency for research on cancer
- IC – caracteres informativos
- INMET – Instituto nacional de meteorologia
- LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
- LOD – limite de detecção
- LOQ – limite de quantificação
- Mg – magnésio
- MPBS – maximum parcimony bootstrap

MRM – monitoramento de múltiplas reações

NaOH – hidróxido de sódio

NCBI – centro nacional para informação biotecnológica

NIV – nivalenol

PBS – tampão fosfato salino

pc – peso corporal

PCR – reação de polimerização em cadeia

pH – potencial hidrogeniônico

PIB – produto interno bruto

PIC – caracteres informativos de parcimônia

RPB2 – RNA polimerase II

RSD – desvio padrão relativo

SCF – scientific committee on food

YES – yeast extract sucrose

ZEA – zearalenona

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVO GERAL	18
1.1	INTRODUÇÃO 19
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22
1.2.1	<i>Cevada (Hordeum vulgare L.)</i> 22
1.2.2	<i>Malteação</i> 23
1.2.3	<i>Produção de cerveja</i> 24
1.2.4	<i>Contaminantes</i> 27
1.2.5	<i>Legislação nacional e internacional para micotoxinas</i> 30
1.2.6	<i>Hidrofobinas</i> 31
1.2.7	<i>Gushing</i> 32
1.3	PROPOSIÇÃO E OBJETIVO GERAL 34
1.3.1	<i>Proposição</i> 34
CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA NATURAL DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE CEVADA CERVEJEIRA	35
2.1	INTRODUÇÃO 36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37
2.3	MATERIAL E MÉTODOS 37
2.3.1	<i>Amostras de cevada cervejeira</i> 37
2.3.2	<i>Métodos</i> 38
2.4	RESULTADOS 42
2.4.1	<i>Atividade de Água e Identificação de Fungos Isolados</i> 42
2.4.2	<i>Estudo filogenético</i> 42
2.4.3	<i>Validação de método para análises de micotoxinas</i> 44
2.5	DISCUSSÃO 48
CAPÍTULO 3 –ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE DON E ZEA NOS PROCESSOS DE MALTEAÇÃO E PRODUÇÃO DE CERVEJA	51
3.1	INTRODUÇÃO 52
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO 53
3.3	MATERIAL E MÉTODOS 53
3.3.1	<i>Amostras</i> 53
3.3.2	<i>Padrões de micotoxinas e reagentes</i> 53
3.3.3	<i>Métodos</i> 53
3.4	RESULTADOS 56
3.4.1	<i>Método de validação</i> 56

3.4.2	<i>Estabilidade de DON e ZEA durante os Processos de Malteação e Fabricação de Cerveja</i>	57
3.4.3	<i>Estimativa de ingestão diária de micotoxinas pelo consumo de cerveja</i>	60
3.5	DISCUSSÃO	61
3.6	CONCLUSÃO	64
	CAPÍTULO 4– FENÔMENO GUSHING E O GENE HYD5 EM ESPÉCIES DE FUSARIUM ISOLADAS DE AMOSTRAS DE CEVADA DO BRASIL	65
4.1	INTRODUÇÃO	66
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	67
4.3.1	<i>Amostras</i>	67
4.3.2	<i>Métodos</i>	67
4.4	RESULTADOS	69
4.5	DISCUSSÃO	71
4.6	CONCLUSÃO	73
	CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES GERAIS	74
5.1	CONCLUSÕES GERAIS	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICES	88
	Apêndice A – Artigo publicado em periódico internacional: Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil	88
	Apêndice B – Artigo publicado em periódico internacional: Assessment of toxigenic <i>Fusarium</i> species and their mycotoxins in brewing barley grains	94
	Apêndice C– Artigo publicado em periódico internacional: <i>Fusarium</i> mycotoxins stability during the malting and brewing processes	110

**CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVO
GERAL**

1.1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica bastante popular no contexto mundial por razões que transcendem os aspectos sociais e econômicos. No Brasil, por exemplo, o consumo médio de cerveja registrado em 2014 foi de aproximadamente 66,9 L por habitante, e coloca o país como 27 ° maior consumidor. Atualmente, o setor cervejeiro corresponde a 1,6 % do PIB nacional e representa 14 % da indústria do país. (CERVBRASIL, 2016).

Uma vez que o consumo atual é significativo e há uma indiscutível tendência de crescimento, a qualidade da cerveja e dos ingredientes utilizados em sua produção são e tendem a ser cada vez mais relevantes. Nesse contexto, vale destacar os aspectos relacionados a possíveis contaminantes e seus consequentes impactos no produto final e, por que não, no consumo futuro da bebida.

Nesse sentido, uma preocupação latente da indústria cervejeira é a ocorrência de fungos nos grãos, que acontecem devido a vários fatores como: o manejo inadequado da matéria prima (lesões mecânicas), infestação por insetos, método de secagem, tipos de estrutura de armazenamento e condições do processamento (CHANNIAH; MAIER, 2014). Contudo, condições ambientais, tais como alta umidade dos grãos (16 à 30 %) e alta temperatura (25 à 32 °C) também são considerados fatores críticos e que influenciam diretamente no crescimento desses contaminantes (NEME; MOHAMMED, 2017).

Há uma variedade de gêneros fúngicos que podem ser encontrados em cevada, no entanto, os mais representativos são: *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria* (PIACENTINI et al., 2015a).

O gênero *Fusarium* é considerado um dos fungos infectantes em cereais de maior preocupação para a produção agrícola e segurança alimentar/dos alimentos em todo o mundo (DESJARDINS, 2007). Espécies deste gênero ameaçam o rendimento e a qualidade dos cereais devido à sua capacidade de causar doenças e produzir micotoxinas (MA et al., 2013).

As micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular produzidos como metabólitos secundários por uma grande variedade de fungos filamentosos, que causam perdas nutricionais e representam um risco significativo para humanos e a cadeia alimentar (BENNETT; KLICH, 2003; NEME; MOHAMMED, 2017).

A *Food and Agriculture Organization of the United Nation* (FAO) estima que pelo menos 25 % dos grãos de cereais do mundo estão contaminados por micotoxinas. Esses compostos, por sua vez, podem causar prejuízos econômicos por diversos fatores, tais como: perdas diretas de produtos agrícolas, mortalidade de animais, doenças em humanos, diminuição da produtividade agrícola e pecuária, custos indiretos de sistemas de controle, rejeição ou

desvalorização de produtos pelo mercado, queda na exportação e aumento da importação, entre outros (EDITE BEZERRA DA ROCHA et al., 2014).

As micotoxinas mais encontradas em cevada pertencem ao grupo dos tricotecenos, destacando o desoxinivalenol (DON, Tipo B), produzido principalmente por espécies do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG). Todas as espécies, precisam de temperaturas ótimas para crescimento (25 °C e 21 °C) e isso provavelmente afeta a distribuição geográfica. Esta toxina é resistente ao processo de moagem e aquecimento e, por isso, entra diretamente na cadeia alimentar de animais e humanos (PESTKA, 2010)

Os principais efeitos toxigênicos de DON quando em doses agudas são caracterizadas por sintomas como diarreia, vômito, leucocitose, hemorragia, choque circulatório, podendo levar a morte. As doses crônicas causam recusa alimentar, redução do ganho de peso e na absorção de nutrientes, além de alterações neuroendócrinas e imunológicas (LARSEN et al., 2004; PESTKA; SMOLINSKI, 2005).

Outra micotoxina que é considerada importante em cereais como a cevada, é a zearalenona (ZEA) (BOLECHOVÁ et al., 2015). A ZEA é a micotoxina estrogênica mais estudada, e pertence a um grande e variado grupo de compostos (estrogênicos) de estrutura semelhante e com propriedades farmacológicas (TAKEMURA et al., 2007). Ela é não esteroide e altamente termoestável, produzida por várias espécies do gênero *Fusarium*, incluindo *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, e *F. semitectum* (ZINEDINE et al., 2007). Tal como acontece com outras micotoxinas, apenas algumas espécies podem produzir ZEA, sendo associada principalmente com culturas de cereais e seus subprodutos. Ainda que seja considerada uma micotoxina de campo, há evidências de que ela também possa ser produzida em grãos já colhidos (GROMADZKA et al., 2008; ZINEDINE et al., 2007).

Os efeitos da ZEA parecem refletir sua capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio, levando a alterações no trato reprodutivo e uma variedade de sintomas, incluindo: diminuição da fertilidade, aumento da reabsorção embriotal e redução da ninhada em animais (ZINEDINE et al., 2007).

Vale ressaltar que, para humanos são poucos os dados disponíveis. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) concluiu em estudos efetuados que havia evidência limitada para avaliar a capacidade carcinogênica de ZEA classificando-a no grupo 3 (OSTRY et al., 2017). Contudo, a *Scientific Committee on Food* (SCF) da União Europeia observou a ocorrência de tumores em estudos clínicos devido às características estrogênicas da micotoxina (EFSA, 2004; ZINEDINE et al., 2007).

Além de contaminantes como fungos e micotoxinas supracitados, é importante comentar que, alguns fungos filamentosos dos filos Ascomycota e Basidiomycota são capazes de produzir proteínas denominadas hidrofobinas. Essas proteínas estão presentes na parede celular fúngica, onde estão envolvidas na formação do micélio e dos esporos. (SARLIN et al., 2005).

As hidrofobinas têm sido estudadas nos últimos anos por estarem presentes na matéria prima contaminada e por causarem “*gushing*”, fenômeno que consiste na formação excessiva de espuma na abertura da garrafa. Tal problema vem sendo reportado frequentemente e pode comprometer a qualidade da cerveja e, por conseguinte, a reputação da cervejaria.

Gushing é considerado um fenômeno complexo e largamente estudado, com pesquisas publicadas ainda no século XX. Contudo, o seu mecanismo ainda não foi completamente elucidado. De acordo com um estudo realizado na Alemanha, aproximadamente 50% das cervejarias presenciaram *gushing* pelo menos uma vez (SARLIN et al., 2012)

Esse fenômeno pode ser causado tanto por anormalidades na matéria prima utilizada na produção de cerveja, induzida por metabólitos de fungos que estão presentes (hidrofobinas), como discutido acima, o qual é considerado como *gushing* primário, como por outros fatores associados a partículas sólidas com bolsas de ar aprisionadas, caracterizando o *gushing* secundário.

Notem, portanto, que além das complexidades inerentes ao processo de produção da cerveja, diversos outros aspectos associados à matéria prima usada em sua produção são cada vez mais relevantes. Nesse sentido, na sequência do documento são apresentadas as justificativas, bem como os objetivos, materiais e métodos que serão adotados na pesquisa a ser desenvolvida, seus resultados e conclusões. Nos apêndices foram incluídos 3 trabalhos já publicados em periódicos internacionais.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Cevada (*Hordeum vulgare* L.)

A cevada é considerada um cereal de inverno pertencente ao gênero *Hordeum*, e a espécie mais importante economicamente e que deve ser destacada é a *Hordeum vulgare* L (Figura 1)(FORSTER et al., 2007). Na indústria cervejeira, mesmo com a possibilidade da malteação de vários cereais como sorgo, trigo e milho, tradicionalmente, a cevada é o grão mais utilizado para a produção de malte para cerveja, devido à produção de enzimas de forma equilibrada e a utilização da sua casca no processo de filtração do mosto (ULLRICH, 2011).

Figura 1. Cevada cervejeira



As características composicionais desejáveis da cevada cervejeira são: alto conteúdo de amido (61 %), baixo teor de proteínas (<11,5 %) e β -glucanas (3,3-4,5 %). A eficiência da malteação e do processamento da cerveja depende basicamente dos padrões desses compostos (BAMFORTH; BARCLAY, 1993). Além disso, fatores como clima e manejo também são determinantes para a produção de cevada com padrão adequado para malteação, destacando principalmente o poder germinativo, tamanho do grão e a presença de contaminantes.

No Brasil, os locais produtores de cevada para fins cervejeiros estão concentrados principalmente em regiões dos três estados da região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), devido ao clima propício que essa região apresenta para o cultivo. Levando isso em consideração, é necessário que os produtores sigam as indicações técnicas da comissão de pesquisa de cevada, no que diz respeito às práticas de manejo da cultura para obtenção de um produto com a qualidade necessária (EMBRAPA, 2017).

1.2.2 Malteação

Após a colheita, a cevada é preparada para o armazenamento e posterior conversão a malte. Os grãos passam pelo processo de secagem, onde ocorre diminuição da umidade (<15 %) para evitar problemas de contaminação por fungos e infestação de insetos (BRIGGS, 1998).

A primeira etapa do processo de malteação é a maceração, que consiste basicamente em alternância de períodos onde os grãos são imersos na água e períodos de descanso em ar (Figura 2). Essa combinação, juntamente com controle de umidade (42 a 46 %) e temperatura (15 – 20 °C) durante o processo promove e mantém a eficiência da germinação. Geralmente a etapa de maceração perdura entre 2 a 3 dias, com uma umidade final de 45 % sem nenhum sinal de crescimento do embrião (BRIGGS, 2002).

A germinação é a próxima etapa da malteação e é caracterizada pelo crescimento do embrião do grão, que se manifesta pelo crescimento das radículas, com concomitante modificação do endosperma. O objetivo principal da germinação é obter a modificação necessária do grão com o mínimo de perda de peso consequente da atividade do embrião (BRIGGS, 1998).

A taxa de germinação e a intensidade de modificação são controlados pela regulação da umidade e temperatura do grão (14 a 20 °C). Um grande aumento nas quantidades de algumas enzimas hidrolíticas presentes do grão é considerado essencial nessa modificação. Essas enzimas hidrolíticas são derivadas principalmente do escutelo e da camada de aleurona. No estágio inicial da germinação, o escutelo libera enzimas que iniciam a degradação das paredes celulares, proteínas e grânulos de amido do endosperma. Adicionalmente, o escutelo libera giberelinas, a qual estimula a produção e liberação de inúmeras enzimas hidrolíticas pela camada de aleurona. Aproximadamente 85 % das enzimas são liberadas da camada de aleurona e 15 % do escutelo. As enzimas liberadas para hidrólise de componentes do grão são basicamente as α -amilases, proteases, carboxipeptidases, β -glucanases (GUIDO; MOREIRA, 2016).

Após a modificação necessária do endosperma, a germinação é interrompida por meio da etapa de secagem, que ocorre em dois estágios. No primeiro estágio, o malte verde, como é chamado, é seco com uma redução de umidade de 44 % para 12 %. Esse processo é realizado em fluxo de ar quente, a uma temperatura entre 55 e 75 °C, e demora cerca de 12 h. A segunda fase da secagem, onde o malte é seco de 12 % para 4 %, à uma temperatura de 80 °C, ocorre em um processo mais lento. Esse processo é seguido de um período de resfriamento para

armazenamento. O processo de secagem não é caracterizado somente pela diminuição de umidade do grão, como também pela remoção de sabores indesejáveis, inativação parcial de algumas enzimas hidrolíticas e desenvolvimento de cor e sabor no produto final. Além disso, o malte é seco para produzir um produto friável pronto para ser moído e também estável para ser armazenado por longos períodos (GUIDO; MOREIRA, 2016).

Figura 2. Processo de maceração em maltearias na República Tcheca.



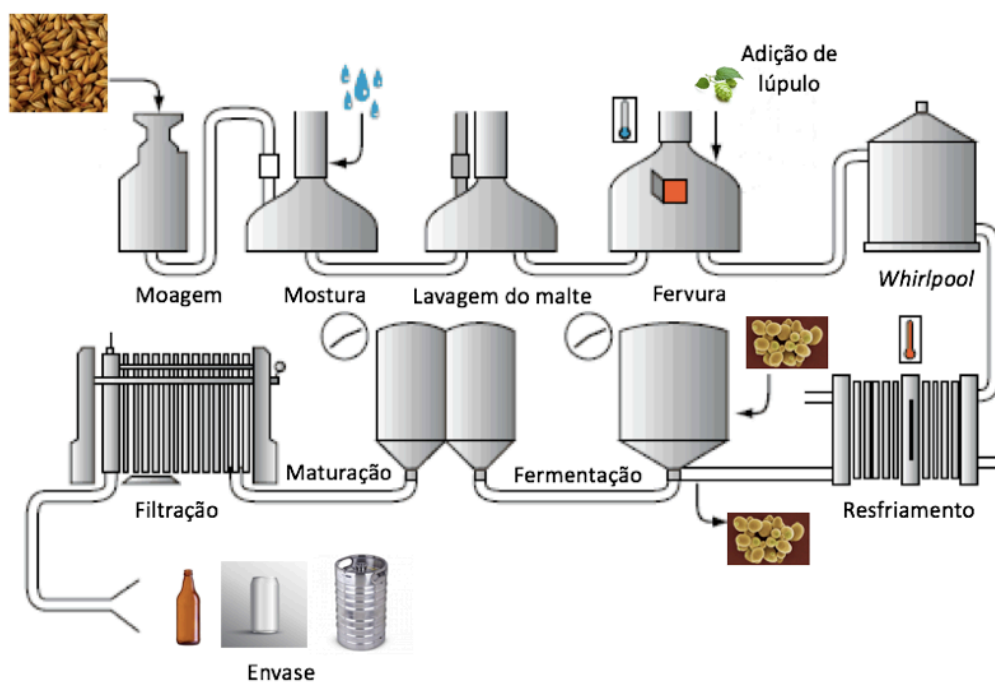
(a) Maltearia Bernard (b) Maltearia Soufflet

1.2.3 Produção de cerveja

A cerveja é resultante de um processo que vai muito além da simples transformação de moléculas de açúcar em etanol e gás carbônico (CO_2). O seu processamento é considerado uma técnica milenar e vem sendo aprimorada ao longo do tempo.

A seguir, estão descritas as etapas consideradas padrão para o processamento e produção de cerveja (Figura 3), e algumas delas serão analisadas quanto a estabilidade de contaminantes.

Figura 3. Processo de produção de cerveja.



1.2.3.1 Moagem do malte

A etapa de moagem do malte tem influência direta sobre a rapidez das transformações físico-químicas, rendimento, clarificação e qualidade do produto final (STEWART, 2016). O objetivo é a redução do grão de malte de modo uniforme para obter a desintegração total do endosperma, porção interna do grão, promovendo uma melhor atuação enzimática (BRIGGS et al., 2004; VENTURINI FILHO, 2016).

1.2.3.2 Mosturação

A etapa de mosturação consiste na adição do malte moído à água em temperatura controlada, e tem como objetivo a solubilização das substâncias do malte. Entre as temperaturas de 40 e 45 °C ocorre a ativação enzimática e os grãos de amido começam a se solubilizar favorecendo a sacarificação (VENTURINI FILHO, 2016).

A sacarificação se inicia entre 60 e 72 °C com a ação de duas enzimas principais, α -amilase e β -amilase. A escolha da temperatura e tempo de mosturação a ser aplicado durante a atuação enzimática vai depender da composição e do tipo de cerveja desejada, agregando, por exemplo, conhecimentos do quanto de açúcares fermentescíveis se deseja ou do quanto de substâncias proteicas de alto peso molecular almeja-se para o corpo da cerveja e consistência da espuma. A ação das enzimas produz um mosto que contém de 70-80 % de carboidratos fermentescíveis, incluindo glicose, maltose e maltotriose (BRIGGS et al., 2004).

Ao final da mosturação é realizado um teste com solução de iodo 0,2 N a fim de verificar a sacarificação do malte. Após a confirmação da completa hidrólise do amido, pela ausência da coloração roxo-azulada, característica da reação do iodo com o amido (em temperatura ambiente), a solução é aquecida entre 76 à 78 °C com o objetivo de inativar as enzimas presentes (BRIGGS, 1998; VENTURINI FILHO, 2016).

1.2.3.3 Filtração do mosto e fervura

Na etapa de filtração do mosto a casca do malte serve como camada filtrante. Após essa operação, a camada filtrante é lavada com uma quantidade de água a 75 °C, visando aumentar a extração do açúcar e conseqüentemente, elevar o rendimento do processo (BRIGGS et al., 2004).

Na etapa seguinte, o mosto é submetido à fervura (ocorre a adição do lúpulo), visando a inativação total das enzimas, esterilização, coagulação proteica, extração de compostos amargos e aromáticos do lúpulo, formação de substâncias constituintes do aroma e sabor, evaporação de água excedente e de componentes aromáticos indesejáveis ao produto final. O mosto é mantido em fervura até atingir a concentração desejada de açúcar para o início da fermentação, correspondendo a uma média de 60 a 90 min (KUNZE, 2014).

1.2.3.4 Separação do *trub* e resfriamento do mosto (*Whirlpool*)

Após a etapa de fervura, o mosto deve passar por etapas de retirada do precipitado e resfriamento. A primeira etapa pode ser realizada de diversas formas, mas o método mais utilizado é a sedimentação. São utilizadas forças centrípetas por meio de rotação forçada para que os complexos de proteína, resinas e taninos denominados de *trub*, se acumulem no fundo do tanque, sendo separados do mosto límpido. Posterior a retirada do *trub*, o mosto é resfriado até temperatura de fermentação (BRIGGS et al., 2004).

1.2.3.5 Fermentação

O processo fermentativo consiste no ponto central para a produção de qualquer bebida alcoólica, que tem como principal objetivo a conversão de açúcares em etanol e dióxido de carbono, pela levedura, sob condições anaeróbicas (BRIGGS et al., 2004; STEWART, 2017).

Durante essa etapa muitos outros compostos são formados, como subprodutos do metabolismo da levedura. Portanto, a fermentação é controlada de modo a favorecer a produção dos aromas desejáveis e eliminação dos indesejáveis. Os fatores mais importantes que

influenciam nesse processo são: temperatura de fermentação, duração, a escolha adequada da levedura e a quantidade dela a ser empregada (STEWART, 2017).

1.2.3.6 Maturação

A maturação é necessária e importante, pois é nessa fase que acontecem reações físico-químicas que transformam o aspecto visual e produzem alguns aromas e sabores. Tanto no processo industrial como artesanal, a maturação pode ocorrer durante um longo tempo, chegando a algumas semanas e até mesmo alguns meses para determinados estilos de cerveja. Em geral, essa etapa ocorre em temperaturas bem inferiores as de fermentação e ocasiona a precipitação das leveduras que contribuem na clarificação da cerveja (VENTURINI FILHO, 2005).

1.2.3.7 Carbonatação e envase

A carbonatação pode ser realizada de forma natural, que utiliza uma fonte de glicose para estímulo das leveduras restantes produzirem CO₂ na garrafa (cervejas artesanais), ou de forma forçada, com a injeção de gás carbônico de forma artificial (cervejarias de médio e grande porte). O envase que é a última etapa do processo, a assepsia do local, barris e garrafas é fundamental para qualidade e estabilidade da cerveja. Esse momento é considerado crítico, pois a cerveja deixa o ambiente controlado em que foi produzida, e é exposta ao ambiente externo (BRIGGS et al., 2004).

1.2.4 Contaminantes

1.2.4.1 Fungos

Os fungos são considerados uns dos maiores contaminantes em grãos e estão diretamente relacionados a fatores como: perda de qualidade nutricional, diminuição da habilidade germinativa, bem como de componentes do grão, produção de metabólitos secundários, etc (FLEURAT-LESSARD, 2017; MOHAPATRA et al., 2017). Atualmente, a contaminação por fungos em alimentos tem sido uma grande preocupação devido ao alto impacto econômico gerado pelas perdas.

A infecção fúngica em cereais pode acontecer em várias etapas, desde o cultivo, colheita, secagem, armazenamento, transporte e até mesmo no processamento. A micobiota se apresenta bem diversificada, contudo, alguns gêneros podem estar mais presentes no campo, como *Fusarium*, *Alternaria* e *Clamidosporum* e outros no armazenamento como *Aspergillus* e *Penicillium*.

Considerando a matriz cevada, o gênero *Fusarium* é uma grande preocupação para a agricultura e indústria. Espécies desse gênero ameaçam o rendimento e a qualidade dos cereais em todo o mundo devido à sua capacidade de causar doenças e produzir micotoxinas, metabólitos secundários que são tóxicos para humanos e animais (MA et al., 2013).

Dentre os complexos de espécies que pertencem a esse gênero, o complexo de espécies *F. graminearum* (CEFG) é o principal responsável pela giberela na cevada e trigo, uma doença de infecção floral, e devido aos surtos epidêmicos durante os últimos 20 anos, *F. graminearum stricto sensu* (s.s) foi considerado o principal patógeno de cereais no mundo (GOSWAMI; KISTLER, 2005; KAZAN; GARDINER; MANNERS, 2012). Este grupo é capaz de produzir tricotecenos do tipo B e, recentemente, tricotecenos do tipo A (VARGA et al., 2015). Vale comentar que, o CEFG é capaz também de produzir zearalenona, outra micotoxina de grande importância e vasta ocorrência em cereais (ZINEDINE et al., 2007).

No Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos considerando contaminação por fungos em cevada cervejeira. Porém, nos estudos já realizados, o gênero *Fusarium* foi o mais predominante, destacando espécies como *F. graminearum* e *F. verticillioides* como as mais frequentes (PIACENTINI et al., 2015a).

1.2.4.2 Micotoxinas

As micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular produzidos como metabólitos secundários por uma grande variedade de fungos filamentosos, que causam perdas nutricionais em alimentos e representam um risco significativo para humanos e a cadeia alimentar (BENNETT; KLICH, 2003; NEME; MOHAMMED, 2017). Desse modo, os cereais contaminados podem representar uma fonte direta de exposição humana, pelo seu consumo direto, ou uma fonte indireta através do consumo de produtos derivados de animais (rim, fígado, leite e ovos) alimentados com ração contaminada.

Os efeitos causados por esses metabólitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos quais está exposto. Muitas destas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso os mais frequentemente atingidos (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Além dos vários efeitos em humanos, as micotoxinas por sua vez, podem causar prejuízos econômicos por diversos fatores, tais como: perdas diretas de produtos agrícolas, mortalidade de animais, doenças em humanos, diminuição da produtividade agrícola e pecuária,

custos indiretos de sistemas de controle, rejeição ou desvalorização de produtos pelo mercado, queda na exportação e aumento da importação, entre outros.

A ocorrência mundial de micotoxinas em grãos de cevada é bem relatada na literatura (BĚLÁKOVÁ et al., 2014; BOLECHOVÁ et al., 2015; JUAN et al., 2017; MALACHOVA et al., 2010), contudo, no Brasil poucos estudos foram realizados considerando essa matéria prima (PIACENTINI et al., 2015a).

1.2.4.2.1 Tricotecenos

Os tricotecenos foram classificados em quatro grupos: os tipos A-D, de acordo com sua estrutura química (WHO, 1990), contudo, os mais importantes em cereais são os tipos A e B (DESJARDINS, 2007). Os tricotecenos do tipo B, incluem as micotoxinas desoxinivalenol (DON), seus derivados acetilados, 3-acetildeoxinivalenol (3ADON) e 15-acetildexonivalenol (15ADON) e nivalenol (NIV). As principais espécies fúngicas produtoras desses compostos pertencem ao CEEFG (*F. graminearum*, *F. meridionale*, *F. austroamericanum*, *F. asiaticum*, *F. butiae*).

DON, é o tricoteceno tipo B mais frequente e pode ser encontrado em todo o mundo. Esse metabólito inibe a síntese proteica por interferência com a função peptidiltransferase no ribossomo e tem sido associado à intoxicação de seres humanos e animais através do consumo de alimentos e ração contaminados (PESTKA, 2010). Os principais sintomas associados ao DON quando em doses baixas são: anorexia, aumento de peso prejudicado e imunotoxicidade. A exposição aguda a altas doses pode causar diarreia, vômitos, leucocitose, choque circulatório e, em alguns casos, morte (PESTKA; SMOLINSKI, 2005).

1.2.4.2.2 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica não-esteroidal, biossintetizada pela via poliquetida e é produzida por várias espécies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum*). É considerada um contaminante comum em milho, contudo também tem sido encontrada, porém em menor ocorrência, em aveia, cevada, trigo, sorgo, arroz e cerveja (ZINEDINE et al., 2007)

Alguns estudos têm reportado efeitos estrogênicos em animais como: diminuição da fertilidade, alterações no trato reprodutivo, diminuição do peso fetal e alteração dos níveis séricos de progesterona e estradiol. Além disso, pesquisas também relataram a presença de síndromes hiperestrogênicas em seres humanos (ZINEDINE et al., 2007).

A ZEA foi classificada no grupo 3 (não classificável devido à sua carcinogenicidade para os seres humanos) pelo IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, 2002).

1.2.5 Legislação nacional e internacional para micotoxinas

Os níveis máximos de micotoxinas previstos pela legislação brasileira foram estabelecidos devido aos efeitos graves que essas substâncias podem causar aos seres humanos e animais.

As micotoxinas mais encontradas em alimentos e que possuem limites máximos preconizados são as aflatoxinas (M₁, B₁, B₂, G₁, G₂), Ocratoxina A, DON, Fumonisinas (B₁ e B₂), ZEA e Patulina.

Na Tabela 1 são apresentados os limites máximos tolerados das micotoxinas que podem ser encontradas nos grãos de cevada.

Tabela 1. Limites para micotoxinas em cevada malteada e outros produtos.

MICOTOXINA	ALIMENTO	LMT (ug/kg)
Aplicação 2019		
Deoxinivalenol	Grão de cevada	1000
	Cevada malteada	750
Zearalenona	Cevada malteada	100

Fonte: Brasil, 2017.

No que diz respeito à legislação internacional para micotoxinas em cevada, os valores estabelecidos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Limites na legislação internacional para micotoxinas em cevada.

MICOTOXINA	PAÍS	ALIMENTO	LMT (ug/kg)
Deoxinivalenol	China	Cevada	1000
	União Europeia	Cevada	1250
Zearalenona	União Europeia	Cevada	100

Fonte: 401/2006/EC, 2006; CHINA, 2017

Vale ressaltar que, ainda não existem limites máximos toleráveis para micotoxinas em cerveja na legislação brasileira e internacional. Tal fato demonstra a necessidade de novos estudos e monitoramento dessas micotoxinas, tendo em vista principalmente a qualidade dos produtos e a saúde do consumidor.

1.2.6 Hidrofobinas

Como conceito geral, as hidrofobinas são proteínas anfifílicas, ou seja, possuem partes hidrofílicas, bem como, hidrofóbicas e são produzidas na parede celular de fungos filamentosos (LINDER et al., 2005). Uma característica dessas proteínas são seus 8 resíduos de cisteína conservados formando quatro pontes de dissulfureto na molécula, composto por aproximadamente 100 aminoácidos. Além disso, essas proteínas são consideradas relativamente pequenas com um tamanho de aproximadamente 10 kDa (WESSELS, 1996).

As hidrofobinas atuam como componentes estruturais, estão envolvidas da formação do micélio e conídios, e em interações entre os fungos e o seu ambiente. Elas podem ser encontradas nas partes estruturais dos fungos ou podem ser secretadas no meio de cultura (WESSELS, 1994).

Vale comentar que, essas proteínas tem a capacidade de diminuir a tensão superficial da água ou alterar a natureza de uma superfície de hidrofílica para hidrofóbica e vice-versa (WÖSTEN; WESSELS, 1997). Tais propriedades são úteis quando os fungos penetram nas interfaces ar-água ou se ligam às superfícies hidrofóbicas de hospedeiros (ceras cuticulares de tecidos vegetais). As hidrofobinas demonstraram desempenhar papéis importantes em interações patogênicas e mutualistas (TEMPLETON; RIKKERINK; BEEVER, 1994; WÖSTEN; WESSELS, 1997).

Baseada na comparação de sequências, as hidrofobinas podem ser divididas em duas classes diferentes, I e II. As hidrofobinas pertencentes a classe I foram observadas em ambos, Ascomycetos (Ia) e Basidiomycetos (Ib), enquanto as hidrofobinas de classe II foram observadas somente em Ascomycetos. A homologia da sequência geral de nucleotídeos das duas classes de hidrofobinas e entre as espécies é considerada pequena. Contudo, a semelhança da sequência de aminoácidos é mais expressa, embora não tão significativa (LINDER et al., 2005; WESSELS, 1994, 1996).

Essas proteínas têm sido encontradas em 84 espécies de Ascomycetos, como por exemplo em *F. verticillioides*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. graminearum* (FUCHS; CZYMMEK; SWEIGARD, 2004; SARLIN et al., 2012).

Ambas as classes de hidrofobinas formam agregados, no entanto na classe I, esses agregados são altamente insolúveis e podem ser dissociados com reagentes como ácido fórmico e ácido trifluoacético. Na classe II, os agregados são dissociados mais facilmente e são solúveis em 60 % de etanol e 2 % de dodecil sulfato de sódio. As membranas de hidrofobina formadas nas interfaces hidrofílicas-hidrofóbicas possuem uma superfície com alta elasticidade. Essa

propriedade está associada com a formação de espumas muito estáveis e conseqüentemente pode ser relacionada ao fenômeno *gushing*.

1.2.7 *Gushing*

Gushing (Figura 4) é um fenômeno que consiste na formação excessiva de espuma na abertura da garrafa e vem sido estudado por muitos anos e por vários grupos de pesquisa (DENSCHLAG; VOGEL; NIESSEN, 2012; MUNAR; SUBREE, 1997; SARLIN et al., 2007, 2012). Contudo, seu mecanismo ainda não foi totalmente elucidado.

Esse fenômeno pode ser causado tanto por anormalidades na matéria prima utilizada na produção de cerveja, induzida por proteínas produzidas por fungos que estão presentes (hidrofobinas), como discutido acima, o qual é considerado como *gushing* primário, como por outros fatores associados a partículas sólidas com bolsas de ar aprisionadas, caracterizando o *gushing* secundário (SARLIN, 2012).

A ocorrência da forma secundária do fenômeno acontece de forma esporádica e limitada a uma certa cervejaria ou mesmo a um determinado lote de cerveja, enquanto a primária (causada pela proteína produzida por fungos) é mais epidêmica e frequentemente afeta várias cervejarias ao mesmo tempo por um período prolongado.

No *gushing* primário, algumas espécies fúngicas do gênero *Fusarium* foram relatadas por o induzirem, tais quais: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. poae* e *F. sporotrichioides* (SHOKRIBOUSJEIN et al., 2011; ZHAO, 2010). Contudo, no *gushing* secundário, o fenômeno pode ser causado por cristais de oxalato de cálcio (ZEPF; GEIGER, 2000), íons de metais como ferro e metais pesados (GARDNER, 1972), polifenóis originados de lúpulo granulado (MÜLLER et al., 2010), entre outros.

Presume-se que os fatores do *gushing* primário sejam moléculas de atividade superficial, que estabilizam os núcleos de gás na cerveja formando uma camada, pele, ao redor das microbolhas (GARDNER, 1972). Esta camada pode impedir a quebra das microbolhas na cerveja dificultando a difusão do gás fora das bolhas, mas pode permitir que o dióxido de carbono dissolvido se difunda dentro das bolhas após a abertura da garrafa, levando à expansão das microbolhas e formação excessiva de espuma. A camada também fornece uma alta resistência mecânica em relação a tensões externas.

De acordo com estudos realizados por Amaha et al., (1973) a atividade de *gushing* demonstrou ser estável a valores de pH ácidos e neutros e após aquecimento por duas horas a 100 °C, sugerindo que fatores associados ao fenômeno podem resistir a etapa de fervura do mosto durante a produção da cerveja.

Figura 4. Formação do fenômeno *Gushing* em cerveja.



1.3 PROPOSIÇÃO E OBJETIVO GERAL

1.3.1 Proposição

Tendo em vista os aspectos citados nas seções anteriores e considerando a contínua ascensão da indústria cervejeira no Brasil, estudos no que diz respeito à presença de contaminantes e outros compostos na matéria prima (cevada cervejeira), assim como sua estabilidade durante o processamento, se tornam cada vez mais imprescindíveis. Além disso, no Brasil, estudos sobre a presença de hidrofobinas na cevada cervejeira, associados ao fenômeno *gushing*, ainda são inexistentes. Com base nesses dados, a presente investigação tem como objetivo geral avaliar a microbiota, a ocorrência de micotoxinas nos grãos de cevada, bem como a estabilidade desses contaminantes (micotoxinas). Visa, também, analisar o potencial hidrofóbico das cepas de *Fusarium* spp. isoladas das amostras de cevada.

**CAPÍTULO 2 –OCORRÊNCIA NATURAL DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM
GRÃOS DE CEVADA CERVEJEIRA**

2.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* inclui fitopatógenos que são de grande preocupação para a produção agrícola e segurança alimentar humana/animal (DESJARDINS, 2007). Esse gênero é capaz de produzir várias micotoxinas, incluindo fumonisinas, tricotecenos e zearalenona, que são considerados os contaminantes mais preocupantes em cevada, milho e trigo (FAO, 2013).

Os tricotecenos foram classificados em quatro grupos: tipos A – D, de acordo com sua estrutura química (WHO, 1990), contudo os mais importantes em cereais são os tipos A e B. Os tricotecenos do tipo B, incluem DON, seus derivados acetilados, 3-acetildeoxinivalenol (3ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15ADON) e nivalenol (NIV). DON é o tricoteceno tipo B mais frequente e apresenta uma ocorrência mundial. Essa micotoxina tem a característica de inibir a síntese protéica e tem sido associado à intoxicação de animais pelo consumo de ração contaminada (PESTKA, 2010).

A ZEA é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Fusarium* e é frequentemente encontrada em grãos de cereais. Os suínos são especialmente sensíveis aos efeitos estrogênicos da ZEA e, portanto, é frequentemente envolvida em distúrbios hormonais de animais. Além disso, tem sido relacionada a síndromes hipoestrogênicas em humanos (ZINEDINE et al., 2007). A ZEA foi classificada no grupo 3 (não classificável devido à sua carcinogenicidade para humanos) pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002).

Nos últimos anos, as micotoxinas atraíram a atenção internacional, não apenas pelo impacto percebido na saúde humana, mas também pelas perdas econômicas decorrentes de alimentos contaminados. Devido a crescente popularidade da cerveja e consumo, vários estudos realizados em outros países, relataram a contaminação por *Fusarium* e suas micotoxinas em cevada cervejeira (PASCARI et al., 2018).

O principal problema são as características que esses compostos têm. Algumas micotoxinas, como tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, são consideradas estáveis durante o processo de produção de cerveja (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007) e podem persistir até o produto final. A infecção por *Fusarium* causa um impacto negativo nas taxas de germinação da cevada, que resulta na diminuição da qualidade da malteação e redução de rendimento do mosto. Além disso, pode produzir *gushing* e ocasionar mudanças na cor e sabor da cerveja (PIACENTINI et al., 2015b).

Em condições favoráveis, a cevada possui boas características para contaminação por fungos. Fatores ambientais associados a diferentes variedades e práticas agrícolas influenciam a infecção por *Fusarium* e a produção de micotoxinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a micobiota de grãos de cevada provenientes dos estados da região Sul: Paraná e Rio Grande do Sul;
- Identificar as espécies de *Fusarium* por meio de caracteres morfológicos e técnicas moleculares (sequenciamento Sanger e análise filogenética);
- Determinar o potencial toxigênico de cepas de *Fusarium graminearum* isoladas;
- Avaliar a ocorrência de desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) nos grãos de cevada provenientes das regiões estudadas;

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Amostras de cevada cervejeira *

No ano de 2015, um total de 76 amostras de cevada cervejeira recém colhidas foram coletadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), provenientes de quatro regiões do Rio Grande do Sul (N= 19 cada região), a saber: Região 1: Vacaria, Região 2: Santo Augusto, Região 3: Passo Fundo, e Região 4: Não-me-Toque. As regiões foram diferenciadas pelos períodos preferenciais de semeadura e de acordo com o zoneamento de risco climático do sul do Brasil.

Adicionalmente, em 2016, foram coletadas 64 amostras de grãos de cevada cervejeira (BRS Brau) recém colhidas. As amostras foram procedentes dos estados do Rio Grande do Sul (N= 34) e Paraná (N= 30).

Os grãos foram coletados após as etapas de limpeza e secagem (até um máximo de 60 °C) na unidade de armazenamento. A coleta foi realizada em diferentes pontos dos lotes a granel com peso final mínimo de 10 kg. Cada amostra foi homogeneizada e reduzida em porções de aproximadamente 2 kg. Os grãos foram acondicionados em sacos de polietileno e armazenados a 4 °C para posterior análise.

*Nas amostras coletadas na safra de 2015 foram pesquisadas as micotoxinas DON e ZEA, porém, as amostras provenientes da safra de 2016, foram analisadas, além das micotoxinas, a presença de fungos.

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Atividade água (Aa), isolamento e identificação de fungos

As análises da Aa, nos grãos de cevada (2 g) foram realizadas em triplicata no equipamento Aqua-Lab CX-2 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EUA), de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005).

A contagem total da carga fúngica foi determinada de acordo com Silva et al., (2010) com a técnica de enumeração, expressa em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g). Vinte e cinco gramas de cada amostra foram adicionados a 225 ml de peptona a 0,1 % dissolvida em água sob condições estéreis. A mistura foi agitada num agitador rotativo durante 2 min obtendo-se então as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram colocadas na superfície do meio ágar batata dextrose (BDA) contendo cloranfenicol e incubadas em DBO (demanda bioquímica de oxigênio) no escuro por 7 dias, a 25 °C. A análise foi realizada em duplicata.

Os fungos foram identificados em nível de gênero utilizando metodologia clássica (macro e micro morfológica), de acordo com PITT e HOCKING, 2009; BURGESS et al., 1988 e LESLIE; SUMMERELL, 2006. Entretanto, os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* foram identificados até espécie por sequenciamento (O'DONNELL et al., 1998, 2007)

2.3.2.2 Obtenção de Massa Fúngica e Extração de DNA Genômico

As cepas de *Fusarium* foram cultivadas em ágar YES (YeastExtractSucrose) por 3 dias a 25 °C. O DNA foi extraído utilizando o kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante.

2.3.2.3 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

2.3.2.3.1 Seleção dos loci, amplificação e análises de sequenciamento Sanger

Sequências parciais dos genes fator de alongação (*EF-1 α*) e *RPB2* (7CF/11AR) foram selecionados com o intuito de confirmar a morfologia dos isolados de *Fusarium* (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997).

Os loci foram amplificados com o uso de iniciadores e condições de acordo com a descrição da literatura (AOKI et al., 2012; O'DONNELL et al., 2004; PROCTOR; DESJARDINS; MORETTI, 2010; SARLIN, 2012). Os produtos de PCR foram purificados com o kit ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, EUA) e as amostras analisadas pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

As sequências foram alinhadas através do programa ClustalW, presente no Geneious (Versão 7.1.) (DRUMMOND et al., 2011). O alinhamento foi editado manualmente utilizando o programa Geneious, e todas as mutações checadas através da visualização dos cromatogramas.

As similaridades das sequências dos genes detectadas no estudo foram verificadas de acordo com as sequências de nucleotídeos atuais disponíveis no NCBI (National Centre for Biotechnology Information) para identificação inicial dos isolados.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para PCR e sequenciamento.

Gene	Designação dos iniciadores	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Referências
<i>EF-1α</i>	EF1	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	(O'DONNELL et al., 1998)
	EF2	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT	
<i>RPB2</i>	7CF	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	(O'DONNELL et al., 2007)
	11AR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	

2.3.2.4 Análises filogenéticas

A identificação das linhagens filogenéticas para os genes (*EF-1α* e *RPB2*) foi realizada pelo programa *PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2002). Busca heurística com opção de 1000 sequências adicionais randômicas e algoritmo *tree-bisection-reconnection* para o *branch-swapping* foram utilizados para inferência da árvore mais parcimoniosa. Os índices de consistência e retenção foram calculados para verificar as homoplasias presentes. As árvores foram visualizadas através do programa FigTree e editadas no programa Corel Draw X8. As sequências dos isolados de referência para as diferentes linhagens de *Fusarium* foram obtidas pelo NCBI.

2.3.2.5 Metodologia analítica para análise de micotoxinas

2.3.2.5.1 Extração das micotoxinas em cevada

Para as análises de DON e ZEA, a extração foi realizada de acordo com o método proposto por Al-Taher et al., (2017), com algumas modificações. Resumidamente, 2 g de cevada foram moídos e homogeneizados em 8 ml de uma solução de acetonitrila/água (80:20 v/v) e agitados durante 60 min. A mistura foi então centrifugada durante 10 min a 3500 rpm. O sobrenadante foi transferido para um recipiente âmbar e seco usando um bloco de aquecimento sob fluxo de nitrogênio líquido. O extrato seco foi ressuscitado em 500 µl da fase móvel

composta por 70 % da solução de água: metanol: ácido acético (94:5:1, v/v/v) e 30 % da solução de água/metanol/ácido acético (2:97:1, v/v/v). Por fim, 5 µl da solução foram injetados no sistema LC-MS/MS para análise.

2.3.2.5.2 Otimização cromatográfica e condições da espectrometria de massas

As condições cromatográficas foram definidas de acordo com Njumbe Ediage; Van Poucke; De Saeger (2015). Resumidamente, os seguintes parâmetros instrumentais foram aplicados: o espectrômetro de massa de triplo quadrupolo TSQ Quantum Max foi operado em polaridade positiva e as condições de ionização foram 208 °C para temperatura capilar, 338 °C para temperatura de vaporização, 4500 V para a voltagem do spray e 60 bar para a pressão do gás de bainha. Para seletividade, o espectrômetro de massa foi operado no modo MRM (monitoramento de múltiplas reações), monitorando 3 transições por analito, utilizando a pressão do gás de colisão de 1,7 mTorr e energia de colisão (CE) variando de 11 a 40 eV.

As condições da espectrometria de massa foram otimizadas *re-tuning* diferentes analitos pela infusão direta individual de cada analito. As voltagens do cone, energias de colisão e os íons produto foram otimizados e escolhidos de forma cuidadosa.

A relação massa-carga mais abundante (m/z) foi selecionada para cada composto de interesse. As micotoxinas exibiram íons precursores e íons produto com intensidades de sinal consideravelmente elevadas em modo positivo ESI (ESI+), e moléculas protonadas [M + H] foram encontradas. A Tabela 4 mostra os tempos de retenção (TR), as transições MRM, bem como as voltagens cone e energias de colisão otimizadas para cada composto.

Tabela 4. Parâmetros de tempo de retenção e espectrometria de massas utilizados nas análises de micotoxinas.

Micotoxinas	Tempo de retenção (min.)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)*	CE (V)	TubeLens
DON	2,19	297 [M + H]	203 ^Q	17	71
			175 ^C	18	71
			91 ^C	39	71
ZEA	6,55	319 [M + H]	283 ^Q	11	79
			187 ^C	25	79
			185 ^C	20	79

* Q: transição de quantificação, C: transição de confirmação.

A separação dos compostos foi conduzida em uma coluna C8 Luna, com um tamanho de partícula de 3 µm, 150 x 2,0 mm de comprimento e diâmetro, respectivamente, Phenomenex (Torrance, EUA). Como fase móvel, solvente A (água:metanol:ácido acético (94:5:1, v/v/v)) e solvente B (água:metanol:ácido acético (2:97:1, v/v/v)) foram utilizados. O programa gradiente

foi aplicado em um fluxo de 0,2 ml /min nas seguintes condições: 0 - 1 min 55 % B; 1 - 3 min 55 - 100 % B; 3,01 - 7 min 100 % B e 7,01 - 12 min 55 % B. O tempo total de corrida analítica foi de 7,5 min para as duas toxinas.

2.3.2.5.3 Validação de metodologia analítica para detecção e quantificação de micotoxinas por LC/MS-MS

O método foi validado para detecção e quantificação de micotoxinas de acordo com o Regulamento da Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Para determinar o limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação, repetibilidade e seletividade/especificidade, amostras com níveis não detectáveis de micotoxinas foram submetidas aos experimentos de contaminação artificial.

Considerando linearidade, uma curva de calibração com 6 pontos foi construída com as seguintes concentrações da mistura de padrões das toxinas (DON e ZEA): 0,025; 0,0375; 0,0625; 0,125; 0,375; 0,500 µg/ml.

Os valores de LOD e LOQ foram determinados pela contaminação artificial da amostra com diferentes concentrações e os experimentos foram repetidos em 3 dias diferentes. O LOD foi definido como a concentração mínima do analito contaminado artificialmente que apresentou uma relação sinal-ruído igual a 3 e o LOQ com uma relação sinal-ruído igual a 10.

A precisão/recuperação foi determinada pela contaminação artificial da amostra com a mistura dos padrões em 3 diferentes concentrações para o grão e duas para as cepas em meio de cultura.

2.3.2.6 Produção de DON e ZEA pelas cepas de *F. graminearum* (Potencial toxigênico)

O método utilizado para produção de DON e ZEA pelas cepas de *F. graminearum* em meio de cultura foi realizada como segue: os isolados foram cultivados em meio BDA (3 *plugs* de ágar, 6mm de diâmetro) e o meio de cultura incubado à temperatura de 24 °C e 15 °C com umidade de 90 % e 80 %, por 20 dias para DON e ZEA, respectivamente (SAVI et al., 2013; SAVI; BORTOLUZZI; SCUSSEL, 2013). A cultura de cada meio foi transferida para um *Erlenmeyer* contendo 30 ml de clorofórmio e agitada por 60 min para extração de micotoxinas, seguida de filtração através de papel filtro com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). O extrato foi evaporado e ressuspenso com 500 µl da fase móvel. Por fim, o extrato foi filtrado com um filtro de seringa (membrana nylon de 0,22 µM). A amostra foi quantificada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) para DON e ZEA, como descrito no item 2.3.2.5.3.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Atividade de Água e Identificação de Fungos Isolados

Os níveis de atividade de água variaram entre 0,579 a 0,667 (média: $0,622 \pm 0,02$) para todas as 64 amostras de cevada analisadas. Fungos filamentosos foram isolados em 96,8 % das amostras, destacando o gênero *Fusarium* como predominante (46 %), seguido por *Alternaria* (28,8 %), *Phoma* (15 %), *Epicocum* (6,2 %), *Penicillium* (2 %), *Aspergillus*. (1,1 %) e *Rhizopus* (0,9 %). Espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* foram inicialmente identificadas através do sequenciamento dos genes *EF-1 α* e *RPB2*. As seqüências foram submetidas à ferramenta Blast (alinhamento local básico) no banco de dados do NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

Análises das 48 cepas de *Fusarium* spp. identificadas por metodologia clássica foram, posteriormente, submetidas a identificação molecular utilizando sequenciamento do DNA. Como resultado, 27 (56,25 %) dos isolados foram classificados como pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium sambucinum* (CEFSAM), 15 (31,25 %) ao complexo de espécies *Fusarium tricinctum* (CEFT), 4 (8,33 %) ao complexo de espécies de *Fusarium fujikuroi* (CEFF) e 1 (2 %) aos complexos de espécies de *Fusarium incarnatum-equiseti* (CEFIE) e *Fusarium oxysporum* (CEFO) (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência dos membros de cada complexo de espécies de *Fusarium* isolados de grãos de cevada.

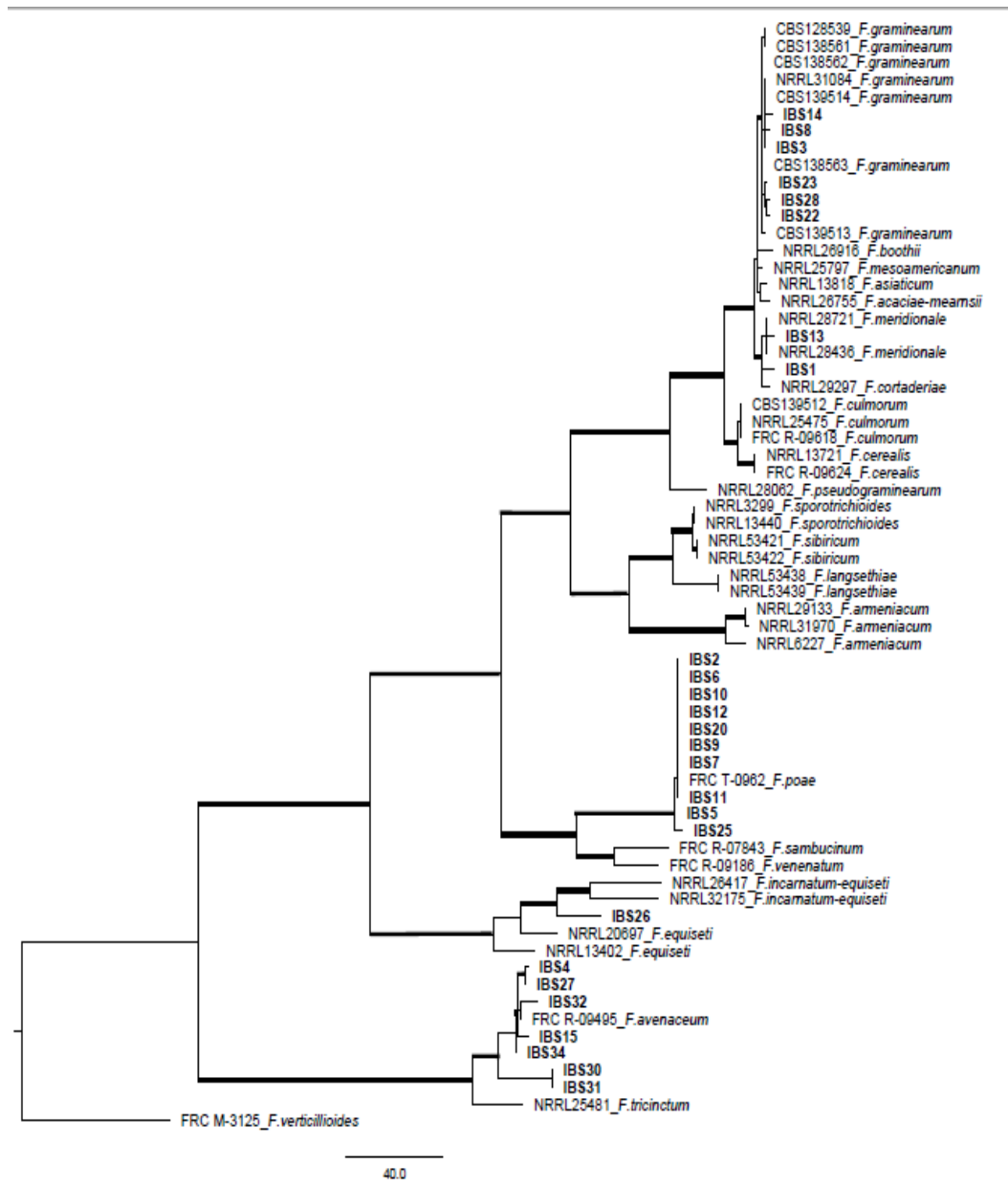
Complexo de espécies	Frequência %	Espécies de <i>Fusarium</i>	% Amostras contaminadas
CEFSAM	56,25	<i>F. graminearum</i>	23,4
		<i>F. poae</i>	17,2
		<i>F. meridionale</i>	1,6
CEFT	31,25	<i>F. avenaceum</i>	23,4
CEFF	8,33	<i>F. proliferatum</i>	3,1
		<i>F. verticillioides</i>	3,1
CEFIE	2	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	1,6
CEFO	2	<i>F. oxysporum</i>	1,6

2.4.2 Estudo filogenético

O estudo filogenético foi realizado com os isolados pertencentes aos complexos de espécies potencialmente produtores de tricotecenos e para as espécies estreitamente relacionadas ao CEFT. Os genes concatenados *EF-1 α* e *RPB2* foram utilizados para inferir a filogenia das espécies isoladas da cevada. O conjunto de dados consistiu de 65 taxa, 1292 nucleotídeos com 452 caracteres informativos de parcimônia (PICs) (Figura 1). A análise resultou em uma árvore mais parcimoniosa (IC = 0,69 RI = 0,94). A maioria dos isolados foram

agrupados dentro dos complexos de espécies de *F. graminearum*, *F. poae* e *F. avenaceum* com os suportes de probabilidade posterior e de *bootstrap* (Figura 5).

Figura 5. Filogenia obtida pelo método de máxima parcimônia inferido pelo locus *EF-1α* e *RPB2* isolados de grãos de cevada. Valores de *bootstrap* são indicados na base de cada clado (os ramos eram sustentados se o *bootstrap* fosse > 70 %). O *outgroup* está representado pela espécie *F. verticillioides*.



2.4.3 Validação de método para análises de micotoxinas

As análises de validação e recuperação estão resumidas na Tabela 6. Os LODs encontrados foram definidos em 5 e 10 µg/kg para DON e ZEA, respectivamente, e os LOQs em 25 µg/kg para ambas as toxinas. Os coeficientes de correlação (R^2) da curva de calibração foram 0,997 e 0,999 para DON e ZEA, respectivamente. Os experimentos de contaminação artificial foram realizados em triplicata em três concentrações nos grãos de cevada e em duas concentrações

para os meios de cultura. Adicionalmente, os parâmetros de linearidade, reprodutibilidade, repetibilidade e recuperação obtidos, também se mostraram adequadas.

Tabela 6. Características da performance do método para extração de DON e ZEA em grãos de cevada e meio de cultura.

Analitos	Matriz	LOD* ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ** ($\mu\text{g/kg}$)	Regressão linear (R^2)	Concentração de contaminação ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
DON	Grãos de cevada	5	25	0,997	0,0375	98	6,4
					0,375	99	5,2
	Cepas de fungo	5	25		0,500	99	3,3
					0,025	98	5,7
					0,125	99	2,9
ZEA	Grãos de cevada	10	25	0,999	0,0375	97	3,0
					0,375	98	2,3
	Cepas de fungo	10	25		0,500	99	0,4
					0,025	102	2,1
					0,125	98	1,5

*LOD: Limite de detecção; **LOQ: Limite de quantificação.

2.4.3.1 Análises de micotoxinas

Das 64 amostras de cevada avaliadas, provenientes da safra de 2016, 58 (90,6 %), apresentavam contaminação por DON com níveis variando entre 45,95 e 1155,21 $\mu\text{g/kg}$. Por sua vez, ZEA foi detectada em 56 (87,5 %) das amostras, com valores que variaram entre 82,41 e 423,71 $\mu\text{g/kg}$ (Tabela 7). As amostras que apresentaram níveis acima do LOQ foram consideradas positivas.

Em relação ao potencial toxigênico dos isolados de *F. graminearum*, a produção de DON foi observada em 12 (80 %) das cepas analisadas. Por sua vez, apenas 3 (20 %) foram produtoras de ZEA. Os níveis variaram entre 123,03 a 592,61 $\mu\text{g/kg}$ (DON) e 33,64 a 140,58 $\mu\text{g/kg}$ (ZEA).

Tabela 7. Contaminação de DON e ZEA em grãos de cevada cervejeira, safra de 2016.

	Número de amostras	DON			ZEA				
		Amostras positivas/% *	Varição das amostras positivas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Média \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mediana ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Amostras positivas /% *	Varição das amostras positivas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Média \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mediana ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Grãos de cevada	64	58/90,6	45,95–1155,21	147,65 \pm 167,16	98,68	56/87,5	82,41–423,71	123,24 \pm 45,29	119,26

* > LOQ de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Com relação a safra de 2015, das 76 amostras de cevada analisadas, 72 (94 %) estavam contaminadas com DON, com níveis que variaram entre 1700 e 7500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. ZEA apresentou uma porcentagem menor de contaminação (73,6 %) com níveis médios que variaram entre 300 e 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabela 8).

O estudo revelou a co-ocorrência de DON e ZEA em um grande número de amostras. Das provenientes de Vacaria, 19 (100 %) estavam contaminadas por ambas as toxinas, com concentrações médias de 3900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DON) e 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ZEA). Em Santo Augusto, 17 (89,4 %) das amostras estavam contaminadas, com níveis médios de 7500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DON) e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ZEA). Em Passo fundo, 13 (68,4 %) das amostras continham as toxinas, com níveis médios de 6900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DON) e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ZEA). Na Região de Não me Toque, 7 (36,8 %) amostras apresentaram contaminação por DON, com nível médio de 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e por ZEA, 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

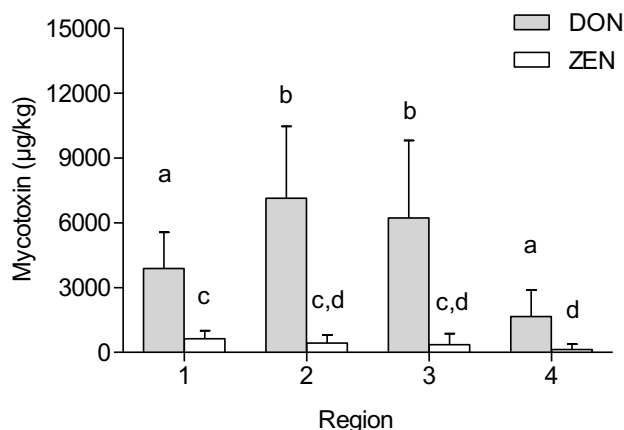
Tabela 8. Ocorrência e co-ocorrência de micotoxinas em grãos de cevada cervejeira de 4 diferentes regiões do Sul do Brasil, safra de 2015.

	Amostras		DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Samples		ZEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			DON-ZEA Co-ocorrência das amostras positivas **
	Analisadas /positivas	Range das amostras positivas (min-max)	Média	SD*	Mediana	Analisadas/ positivas	Range das amostras positivas (min-max)	Média	SD	Mediana	
Vacaria	19/19	900 - 7700	3900	1700	4000	19/19	160 - 1500	630	380	600	19
Santo Augusto	19/18	4100 -15500	7500	2900	6800	19/17	160 - 1700	500	370	400	17
Passo Fundo	19/17	2800 - 11100	6900	3000	6700	19/13	160 - 2300	500	550	300	13
Não me Toque	19/18	310 - 3800	1700	1200	1700	19/7	100 - 1000	350	320	200	7

*SD: Desvio Padrão; **Nota: A co-ocorrência foi demonstrada como o número de amostras com contaminação simultânea de ambas as micotoxinas.

A Figura 6 mostra que as regiões 2 e 3 revelaram níveis de DON significativamente maiores ($p < 0,05$) que as regiões 1 e 4. Por outro lado, diferenças significativas da contaminação por ZEA foram observadas apenas entre as regiões 1 e 4. As amostras da região 4 foram aquelas que apresentaram os níveis mais baixos de DON e ZEA.

Figura 6. Contaminação de DON e ZEA nas 19 amostras analisadas de cada região de cultivo (total: 76 amostras). Os dados são demonstrados em média \pm SD; a mesma letra indica que a contaminação pela micotoxina não são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



2.5 DISCUSSÃO

A presença de fusariotoxinas e de seus fungos produtores, em grãos de cereais, como cevada, trigo, milho e arroz, tem sido relatada em diversas regiões do mundo (CHOI et al., 2015; HOFER et al., 2016; KARLSSON et al., 2017; SILVA et al., 2017). Tal contaminação pode ser agravada pelas condições climáticas, como alta umidade e temperatura, que tendem a aumentar a infecção por *Fusarium* em plantas (GARCIA et al., 2012; LLORENS et al., 2004). A umidade é um fator ambiental importante e influencia a atividade de água dos grãos. Este fator intrínseco contribui para o crescimento fúngico e tem considerável associação com a produção de micotoxinas (FLEURAT-LESSARD, 2017).

Geralmente, o crescimento de *Fusarium* spp. bem como a produção de DON e ZEA, ocorre em substratos com níveis altos de atividade de água (0,90)(PITT; HOCKING, 2009). Em nossa pesquisa, a safra de 2016 mostrou uma baixa variação da atividade de água, com valor médio de $0,622 \pm 0,02$. Neste caso, tanto a germinação de esporos fúngicos como o crescimento de fungos de armazenamento não foram inibidos.

Considerando a contaminação fúngica, a maioria das amostras de cevada provenientes da safra de 2016, apresentaram contaminação por *Fusarium* pertencentes ao CEFSAM, sendo que a maioria das cepas submetidas ao estudo filogenético foram agrupadas e identificadas como pertencentes às espécies *F. graminearum*, *F. poae* e *F. avenaceum*. Estudos anteriores realizados por Stakheev; Khairulina; Zavriev (2016), na Rússia e Beccari et al., (2016), na Itália, mostraram uma alta incidência de *F. avenaceum* em cevada, bem como de outras espécies de *Fusarium*. Hietaniemi et al., (2016), analisando grãos de cevada cultivados na Finlândia entre

os anos de 2005 e 2014, observaram uma alta incidência de *F. avenaceum*, *F. graminearum* e *F. culmorum*, com altos níveis de contaminação por tricotecenos. Segundo Beccari et al., (2019), a presença de *F. avenaceum* na cevada pode indicar contaminação por enniatinas, moniliformina e beauvericina nas amostras. No Brasil, estudo realizado por Astolfi et al. (2011) em cevada demonstrou que a maioria dos isolados pertencia à espécie *F. graminearum*; entretanto, análises de micotoxinas não foram realizadas. Assim sendo, no Brasil, a presente investigação é o primeiro estudo empregando filogenia na identificação de espécies de *Fusarium* isolados e a contaminação por DON e ZEA em cevada.

Considerando as análises de micotoxinas, os dados obtidos nas safras de 2016 e 2015 demonstraram diferença relevante nos níveis de contaminação, tanto de DON, quanto de ZEA. No ano de 2016, os níveis de DON foram inferiores aos detectados nas amostras de 2015, porém, assemelham-se com aqueles encontrados em pesquisa realizada na Espanha, com um nível médio de 119,9 µg/kg (IBÁÑEZ-VEA et al., 2012). Resultados similares foram obtidos por Beccari et al., (2016), na Itália com um nível máximo de contaminação de 108,7 µg/kg. De forma contrária, estudo realizado por Juan; Ritieni; Mañes, (2013), também na Itália, revelou menor incidência de DON, com concentração máxima 35,5 µg/kg. Na Tunísia, Juan et al., (2017) detectaram a presença da toxina com nível máximo de 6,1 µg/kg.

O percentual de contaminação por ZEA nas amostras de 2016 foi elevado com valores médios de 123,24 µg/kg e mediana de 119,26 µg/kg. Estudo similar realizado por Bolechová et al., (2015), na República Tcheca, revelaram níveis de ZEA que variaram de 181,2 a 204,4 µg/kg. Adicionalmente, níveis elevados (máx. 985,9 µg/kg) de ZEA foram encontrados em outra pesquisa realizada na República Tcheca com amostras da safra de 2011 (BĚLÁKOVÁ et al., 2014).

Em relação as amostras da safra de 2015, os elevados percentuais de contaminação para DON (90,6 %) e ZEA (87,5 %), com níveis entre 310 e 15500 µg/kg, 160 e 2300 µg/kg, respectivamente, podem ser atribuídos aos altos níveis de precipitação (média= 95 mm) registrados no período de cultivo da cevada. Tais níveis de precipitação, provavelmente, influenciaram a umidade do ar nas regiões estudadas (CPTEC, 2015), com valores máximos de 70, 97, 84 e 65 %, para as regiões 1, 2, 3 e 4, respectivamente (INMET, 2015). A temperatura também pode ter influenciado a presença das micotoxinas visto que, durante o ano de 2015, a média registrada nas 4 regiões estudadas foi de 28 °C. De acordo com Beccari et al., (2019), as condições citadas são consideradas ideais para o crescimento de *Fusarium* spp. e produção de micotoxinas.

Em relação à legislação brasileira, apenas uma amostra da safra de 2016 apresentou concentração de DON acima dos níveis máximos estabelecidos (1000 µg/kg). No entanto, para ZEA, 55 amostras (86 %) estavam acima dos limites (100 µg/kg). Por outro lado, na safra de 2015, do total de amostras analisadas, 83 % e 68 % apresentaram níveis de DON e ZEA acima dos estabelecidos pela legislação, respectivamente (BRASIL, 2017).

No geral, devido aos altos níveis de contaminação encontrados na produção de cevada, é possível afirmar que as medidas preventivas, como o uso de fungicidas, cultivares resistentes e rotação de culturas, não foram capazes de reduzir efetivamente a contaminação por DON e ZEA na cevada cultivada no sul do Brasil. Os dados mostraram claramente que os esforços de mitigação são necessários para reduzir os níveis de toxinas para aqueles abaixo das regulamentações brasileira e internacional.

**CAPÍTULO 3 –ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE DON E ZEA NOS
PROCESSOS DE MALTEAÇÃO E PRODUÇÃO DE CERVEJA**

3.1 INTRODUÇÃO

A contaminação por *Fusarium* em cereais tem aumentado nos últimos anos, principalmente em cevada, trigo, milho e aveia (BOLECHOVÁ et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017; PIACENTINI et al., 2018; XU; HAN; LI, 2019). Conseqüentemente à contaminação fúngica, devido a fatores como temperatura e umidade, ocorre a produção de metabólitos secundários (micotoxinas).

As micotoxinas vem sendo amplamente estudadas por muitos grupos de pesquisa em todos os aspectos, como a ocorrência desses compostos em alimentos, efeitos em animais e em humanos, prevenção e mitigação (SAVI et al., 2014). A estabilidade desses compostos também é estudada, contudo alguns aspectos ainda precisam ser elucidados para que possam auxiliar no controle da contaminação.

A indústria cervejeira tem várias preocupações relacionado a contaminação por fungos e micotoxinas, como: perda de matéria-prima, impacto econômico e, um dos problemas mais significativos, perda de qualidade. Duas toxinas de *Fusarium* que geram atenção para toda indústria são DON e ZEA. Estas toxinas são muito comuns e podem ser encontradas em todo o processo de malteação e fabricação de cerveja (PASCARI et al., 2018).

DON, também chamado vomitoxina, é um tricoteceno do tipo B, que provoca um espectro complexo de efeitos tóxicos. A exposição crônica a baixas doses de DON pode levar à anorexia, ganho de peso prejudicado e imunotoxicidade. A exposição aguda a altas doses pode causar diarreia, vômitos, leucocitose, choque circulatório e, finalmente, morte (PESTKA; SMOLINSKI, 2005).

ZEA é outra micotoxina que deve ser levada em conta, devido à alta contaminação encontrada em estudos recentes de monitoramento em grãos (PIACENTINI et al., 2018; SAVI et al., 2018; TRALAMAZZA et al., 2016). É tratado como um composto estrogênico não esteroideal porque sua estrutura é semelhante ao hormônio estrogênio e compete com o 17 β -estradiol pela ligação do receptor de estrogênio, resultando em infertilidade e problemas reprodutivos (TAKEMURA et al., 2007).

Alguns estudos mostraram uma alta contaminação dessas duas micotoxinas na cerveja, mas nenhum estudo foi desenvolvido para controlar ou diminuir os níveis. Por esse motivo, há a necessidade de mais informações sobre a estabilidade desses compostos durante todo o processo.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a estabilidade de micotoxinas (DON e ZEA) nos processos de malteação e produção de cerveja;

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Amostras

Foram utilizadas 10 amostras de cevada (*Hordeum vulgare* L.), com peso de 500 g cada, coletadas na safra de 2015 e fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). As amostras utilizadas apresentavam contaminação natural por DON e ZEA e foram usadas em todos os processos de malteação e fabricação de cerveja (microescala). O fluxograma da amostragem dos processos de malteação e produção de cerveja encontra-se expresso na Figura 7.

3.3.2 Padrões de micotoxinas e reagentes

Os padrões de DON e ZEA foram adquiridos da Sigma Aldrich (Viena, Áustria), na concentração de 1 mg/ml. Os padrões de soluções estoque foram preparados em metanol/água (1/1 v/v) na concentração de 1 µg/ml.

Todos os reagentes utilizados nas análises foram grau PA (para análise) e grau LC / MS-MS. Para garantir a qualidade nas análises de micotoxinas, foram utilizados materiais de referência certificados (farinha de trigo) (Trilogy, Washington). As concentrações de DON e ZEA foram de 700 ± 100 µg/kg e $454,2 \pm 37,6$ µg/kg, respectivamente.

3.3.3 Métodos

3.3.3.1 Processo de malteação e produção de cerveja

Todos os ensaios de malteação e fabricação de cerveja foram realizados no Instituto de Pesquisa de Malteação e Produção de Cerveja, Brno, República Tcheca. Os procedimentos utilizados para a malteação foram, de acordo com a metodologia de Mebak, (2011), e as alterações foram aprovadas pela Convenção Europeia da Indústria de Cevada e Malte (EBC, 2009).

O primeiro passo da malteação foi o processo de maceração, realizado da seguinte forma: no primeiro dia de maceração, a água foi adicionada aos grãos e mantida por 5 horas, seguidos por 19 horas de *air rest* (fase seca em temperatura controlada máx. 20 °C). No 2º dia, os grãos foram submetidos a 4 horas na água, seguidos de 20 horas de *air rest*. Finalmente, no terceiro dia de maceração, os grãos foram submetidos a água por 20 min e depois foram dispostos a *air*

rest por 23 horas e 40 min. A etapa de germinação foi realizada durante 3 dias (72 horas), com uma etapa subsequente de processamento. Os grãos nos processos de maceração e germinação foram sempre mantidos à temperatura controlada (14 °C) e o teor de umidade dos grãos foi medido em cada etapa, sendo controlado em 45 %. O tempo total de secagem foi de 22 horas, com temperatura de pré-secagem de 55 °C por 12 horas e temperatura de 80 °C por 4 horas.

Além disso, a metodologia utilizada para a produção do mosto foi de acordo com EBC, (2009) e MEBAK, (2011), com algumas modificações. Em um recipiente, foram pesados cinquenta gramas de malte triturado e 200 ml de água (45 °C) adicionados. O recipiente foi colocado em um banho de esmagamento programado, com agitadores automáticos. A temperatura foi mantida durante 30 min sob agitação constante (100 rpm). Após este período, a temperatura do banho de esmagamento foi aumentada 1 °C por minuto durante 25 min. Assim que a temperatura atingiu os 70 °C, foram adicionados 100 ml de água a 70 °C e mantida a essa temperatura durante 1 hora. O recipiente foi então removido e resfriado à temperatura ambiente. O conteúdo do recipiente foi ajustado à 450 g com água, agitado e o conteúdo filtrado através de papel de filtro. Os grãos e o mosto foram utilizados para análises posteriores.

Os métodos realizados nas etapas finais do processo, como ebulição e fermentação, foram desenvolvidos pelo Instituto de Pesquisa em Malteação e Produção de Cerveja e também de acordo com a literatura disponível (EBC, 2009; MEBAK, 2011), na tentativa de simular o processo real de fabricação de cerveja. Em resumo, cada amostra com 200 ml de mosto foi fervida com 8 g de lúpulo por uma hora. É necessário mencionar que os lúpulos foram adicionados em dois momentos diferentes, no início (4 g) e após 30 min de fervura (4 g). O mosto fervido foi resfriado à 21 °C para a adição de levedura (levedura W 34/70 Starobrno, *Saccharomyces pastorianus*). O processo de fermentação foi realizado ao longo de 3 dias a uma temperatura controlada (18 °C).

A amostragem para as análises de micotoxinas foi realizada em 8 etapas do processo de malteação e 5 etapas no processo de produção de cerveja, como mostra a Figura 7.

3.3.3.2 Extração das Micotoxinas

Para realizar o procedimento de extração de DON e ZEA, foram utilizadas colunas de imunoafinidade (DZT MS-Prep-R. Biopharm, Glasgow, Escócia) para ambas as micotoxinas. Este processo foi realizado de acordo com o protocolo DZT MS-Prep com algumas modificações. Resumidamente, 10g de cevada moída, malte, radículas e restos de grãos foram agitados com metanol a 70% por 50 min, seguido por 15 min de centrifugação a 4500 rpm. Em seguida, 2 ml do extrato foram adicionados a 48 ml de tampão PBS (pH 7,4, ajustado com

NaOH 2 M) e agitados manualmente. Vinte ml do extrato diluído foram passados através da coluna em uma gota por segundo. Por conseguinte, para lavagem da coluna, foram adicionados 20 ml de água destilada. A eluição foi realizada com 2 ml de metanol à 100%. Para injeção, o extrato foi seco e depois ressuscitado com 1 ml de metanol:água (1/1 v/v). Para o extrato de levedura, o procedimento descrito acima foi aplicado com 2 g por amostra.

As colunas DZT MS-Prep também foram usadas para extração de micotoxinas a partir da matriz líquida. Em resumo, 2 ml de mosto ou cerveja foram adicionados a 18 ml de tampão PBS e depois adicionados a coluna. Para lavagem, 20 ml de água destilada foram utilizados, seguido de eluição com 2 ml metanol. Finalmente, o extrato foi seco e ressuscitado em 1 ml de metanol:água (1/1, v/v), para injeção.

3.3.3.3 Método LC / MS-MS para análise

Para realizar a detecção e quantificação das micotoxinas (DON e ZEA), o sistema LC/MS-MS, consistindo de HPLC Finnigan Surveyor acoplado ao espectrômetro de massas LCQ Advantage (Thermo-Fisher, EUA) com ionização química à pressão atmosférica (APCI), foi utilizado.

As condições cromatográficas foram adotadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Běláková et al., (2014). A separação cromatográfica foi realizada com a coluna SynergiHydro RP 80A (3,0 × 150 mm, tamanho de partícula de 4,0 µm) equipada com um cartucho Guardian™ C18 (4,0 × 3,0 mm, 4,0 µm) a 30 °C usando eluição gradiente. A fase móvel foi constituída pelo solvente A (água contendo 10 mM de acetato de amônia) e solvente B (metanol). O programa de gradiente foi aplicado a um caudal de 0,5 ml/min sob as seguintes condições: 0,1 min 90% A; 2 min 50% A; 10 min 20% A; 15 min 20% A; 16 min a 90%; 25 min 90% A. O tempo total de análise foi de 25 min para as duas toxinas.

A interface APCI foi operada em polaridade negativa e as seguintes condições de ionização foram utilizadas: temperatura capilar, 160 °C; temperatura do aquecedor de origem de 450 °C; fluxo de nitrogênio de bainha de 35 l/min; fluxo de gás nitrogênio auxiliar de 10 l/min; voltagem da fonte de 6,0 kV; e gás de colisão hélio. Para seletividade, o espectrômetro de massa foi operado no modo MRM e duas transições por analito foram monitoradas (Tabela 9).

As condições da espectrometria de massa foram otimizadas através do reajuste de diferentes analitos por meio da infusão direta de cada analito individualmente. As tensões do cone, energias de colisão e íons do produto foram otimizadas e cuidadosamente escolhidas.

Tabela 9. Tempo de retenção e parâmetros de espectrometria de massas utilizados na análise das micotoxinas.

Micotoxina	Tempo de retenção (min.)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)*	CE normalizado(%)	Tube Lens
DON	6.3	355	$\frac{295^C}{265^Q}$	34	15
ZEA	16.2	317	$\frac{273^C}{299^Q}$	64	15

* C: Transição de confirmação; Q: Transição de Quantificação.

3.3.3.4 Estimativa da Ingestão Diária Tolerável Média (IDT)

A estimativa da ingestão diária de micotoxinas foi calculada utilizando o nível médio de DON encontrado no final do processo (após fermentação/cerveja), que foi dividido por quatro, considerando que 1 kg de cevada é capaz de produzir 4 litros de cerveja (BRIGGS et al., 2004). O nível médio obtido foi multiplicado pelo consumo diário de cerveja de acordo com Renato Matos Lopes; Marin Morales; Nallin Montagnolli, (2018) e dividido por 60 kg (peso corporal). O cálculo do IDT foi baseado na ingestão tolerável 1 µg/kg de peso corporal/dia para DON (EFSA, 2013).

3.3.3.5 Análise Estatística

Os resultados referentes a DON e ZEA durante os processos de malteação e produção de cerveja foram reportados como média, máxima e mínima usando o Microsoft Office Excel 2007. Além disso, a análise de variância (ANOVA *repeated measures*) usando o teste de Tukey foi conduzida com base nos dados obtidos. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Método de validação

O método de extração de micotoxinas em matriz sólida e matriz líquida durante o processo de malteação e de produção de cerveja foram validados de acordo com o guia da Comissão de Regulamentação da União Européia (401/2006/EC, 2006). Para determinar os parâmetros de recuperação, repetibilidade e seletividade / especificidade, amostras sólidas e líquidas com níveis não detectáveis de micotoxinas foram submetidas a experimentos de contaminação artificial.

A amostra controle da matriz sólida utilizada não apresentava níveis de (malte produzido da variedade de cevada Kangoo) micotoxinas. Os níveis de contaminação artificial foram escolhidos considerando os níveis de contaminação das amostras examinadas. A amostra

líquida controle usada, foi o mosto produzido do malte acima mencionado, de acordo com a Seção 3.3.3.1. Os níveis de contaminação artificial da matriz líquida foram escolhidos considerando os níveis de contaminação previstos das amostras examinadas de mosto e cerveja produzidos. Os padrões foram aplicados à matriz em metanol: água (1/1 v/v). A recuperação média foi calculada usando análises em triplicata conduzidas para cada concentração. Os experimentos foram repetidos em três dias diferentes.

O limite de detecção (LOD) foi definido como a concentração mínima de um analito na amostra com uma relação sinal-ruído igual a 3 e o limite de quantificação (LOQ) com uma relação sinal-ruído igual a 10. Considerando linearidade, uma curva de calibração de sete pontos foi construída com as seguintes concentrações da mistura padrão de micotoxinas (DON e ZEA): 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 1000 ng/ml. Os coeficientes de correlação (r^2) para DON e ZEA foram de 0,9994 e 0,9992, respectivamente. Os parâmetros alcançados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros de validação do método.

Analitos	Matriz	Contaminação artificial (ng/ml)	Recuperação (%)	RSD ^c (%)	LOD ^{*d}	LOQ ^{*e}
DON ^a	Grãos (malt)	100	92,1	9,2	3,5	11,6
		500	92,9	2,9		
		1000	87,6	4,4		
	Líquido (wort)	50	90,6	1,4	0,5	1,6
		100	91,5	2,0		
		250	94,6	1,4		
ZEA ^b	Grãos(malt)	50	89,6	5,3	2,8	9,2
		250	99,8	2,9		
		500	105,7	0,4		
	Líquido(wort)	10	85,8	1,1	2,0	6,7
		50	89,2	0,9		
		100	97,9	0,8		

*Grãos: $\mu\text{g}/\text{kg}$; líquido: $\mu\text{g}/\text{l}$ ^aDON: desoxinivalenol ^bZEA: zearalenona ^cRSD: desvio padrão relativo ^dLOD: limite de detecção ^eLOQ: limite de quantificação

3.4.2 Estabilidade de DON e ZEA durante os Processos de Malteação e Fabricação de Cerveja

A estabilidade das micotoxinas foi avaliada nas etapas consideradas como as mais importantes (N= 13) dos processos de malteação e fabricação de cerveja (Figura 7). Como mencionado, a cevada utilizada para a análise estava naturalmente contaminada e os níveis entre as dez amostras continham uma média de 3835 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 1070 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para DON e ZEA, respectivamente (Tabela 11).

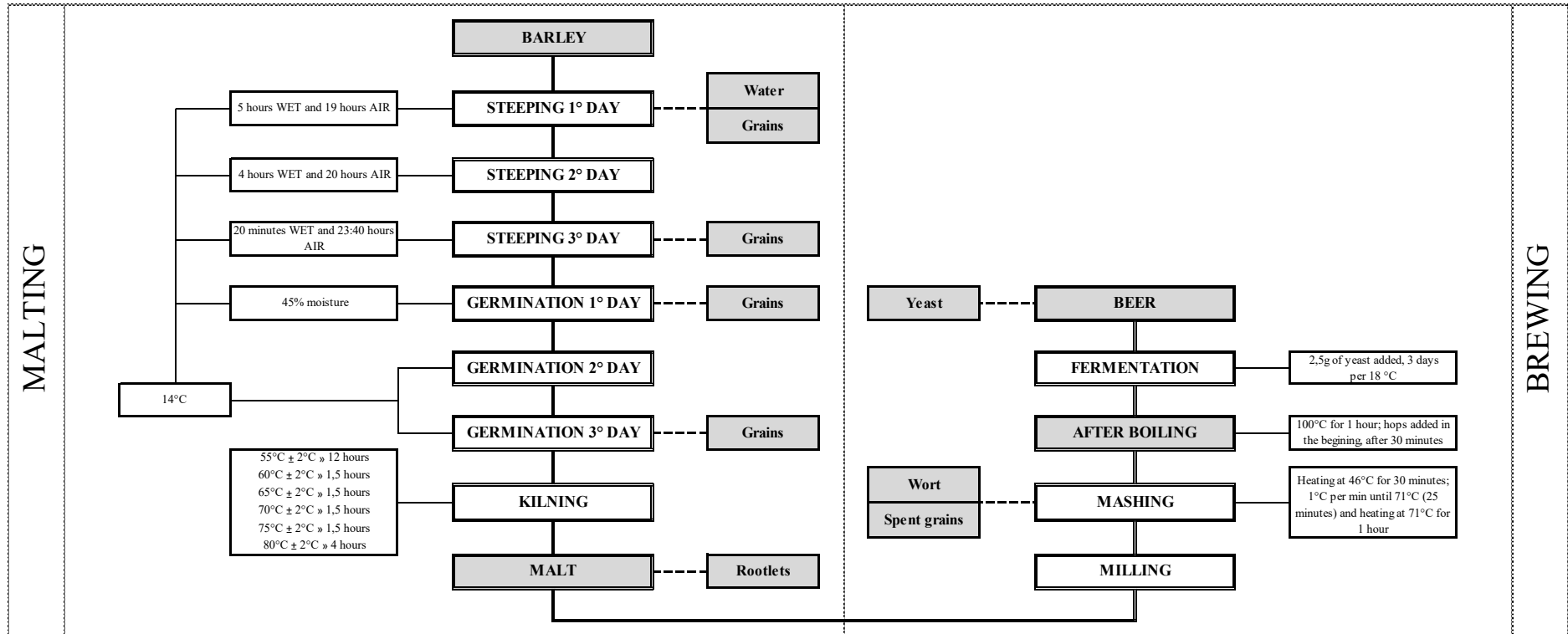


Figura 7. Fluxograma da amostragem dos processos de malteação e produção de cerveja (blocos em cinza) do estudo

Tabela 11. Valores médios, mínimos e máximos encontrados em todas as etapas da malteação e produção de cerveja.

Processo	Etapas	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			ZEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
		Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
Malteação	Cevada	3835	5204	2687	1070	3596	175
	Água 1º dia	599	851	470	12	21	3
	Maceração 1º dia	1319	2906	438	222	1045	53
	Maceração 3º dia	1442	2103	754	799	2602	15
	Germinação 1º dia	1308	2641	617	618	2385	57
	Germinação 3º dia	1858	2957	822	1172	2854	140
	Malte	1211	1780	728	392	1386	95
	Radículas	1797	2181	1431	1122	1735	206
Produção de cerveja	Mosto	1105	1505	808	25	64	9
	Resto de grãos	1068	1742	590	1429	3188	200
	Depois da fervura	1132	1483	840	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Depois da fermentação/cerveja	1089	1414	863	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Levedura	166	241	89	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Considerando DON no processo de malteação, a primeira água foi analisada e uma média de 599 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi encontrada. Neste experimento, o balanço de massa das micotoxinas DON e ZEA foi sempre recalculado a 1 kg da cevada original e os valores reportados em malte, mosto, mosto após a fervura e cerveja após fermentação foram recalculados de acordo com o balanço de peso, onde a cevada é 100 %.

Os níveis detectados nos subprodutos (leveduras, resto de grãos usados e radículas) foram relatados em $\mu\text{g}/\text{kg}$ e não foram incluídos no balanço de massa.

Comparando os níveis de DON encontrados na cevada com os níveis encontrados no primeiro e terceiro dia de maceração, no terceiro dia de germinação e malte, DON demonstrou uma diminuição de 66 %, 62 %, 51,5 % e 68 %, respectivamente, e foram significativamente diferentes (***) $p < 0,001$ (Figura 8). Além disso, DON diminuiu significativamente (38%) entre o terceiro dia de germinação e o malte (* $p < 0,05$).

Os níveis de ZEA durante o processo de malteação diminuíram significativamente (79%) quando a cevada foi comparada ao primeiro dia de maceração (* $p < 0,05$). No entanto, pode-se observar um aumento entre o primeiro dia de maceração e o terceiro dia de germinação (173%), com diferença significativa (** $p < 0,01$).

Considerando todo o processo (cevada até cerveja), DON apresentou uma diminuição significativa (***) $p < 0,001$ de 71,6 %. No mesmo contexto, quando os níveis de ZEA foram comparados, também foi observada uma diminuição significativa (** $p < 0,01$).

É necessário destacar que todos os resultados para a matriz líquida foram recalculados para 1 kg.

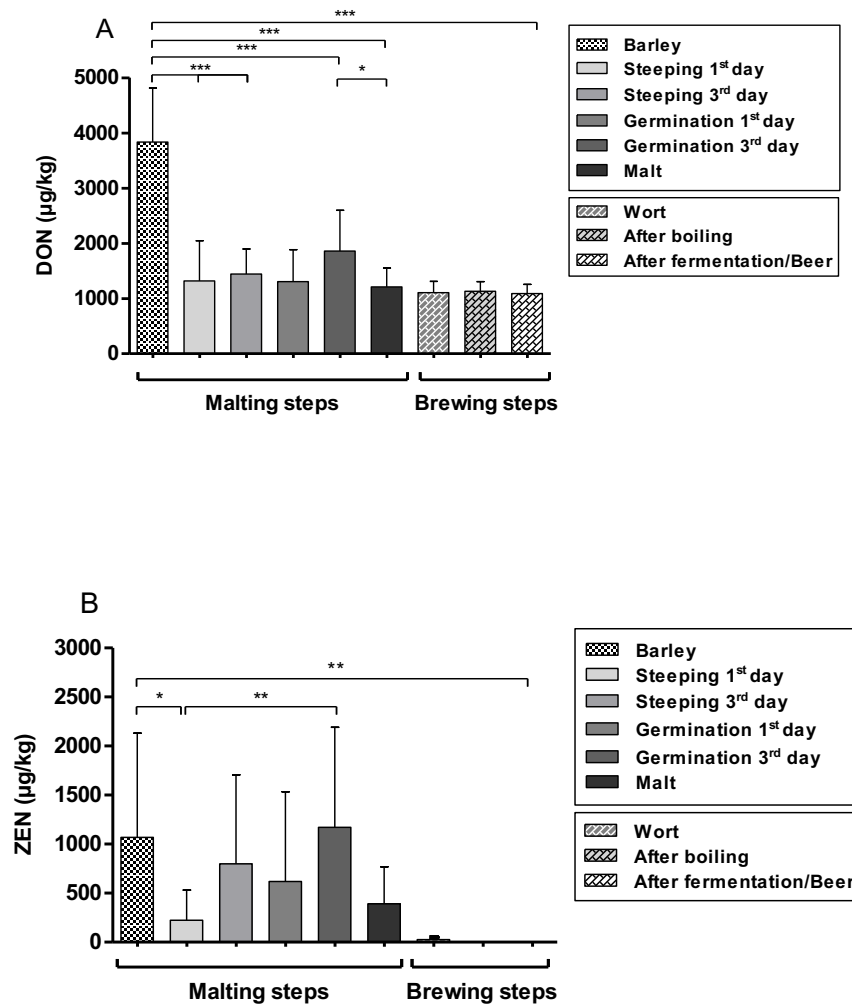


Figura 8. Etapas dos processos de malteação e produção de cerveja, demonstrando os níveis de (A) DON e (B) ZEA expressados em média \pm SD e diferenças significativas entre as etapas, de acordo com ANOVA seguido do teste de Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.4.3 Estimativa de ingestão diária de micotoxinas pelo consumo de cerveja

Utilizando um peso corporal médio adulto de 60 kg e os dados médios de micotoxinas (última etapa do processo) deste estudo, foi realizada uma estimativa da exposição diária a DON, seguido por uma estimativa considerando os níveis estabelecidos pela legislação (Tabela 12).

É importante mencionar que, o nível de DON na última etapa foi de 1089 μg , recalculado para 1 kg. Esse nível corresponde a uma redução de 71,6 % do teor de DON no produto final, onde a concentração média de DON inicial era de 3835 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Com base na literatura (BRIGGS et al., 2004), 1 kg de cevada é capaz de produzir 4 l de cerveja, ou seja, 1089 μg foi dividido por 4, resultando em 272,17 $\mu\text{g}/\text{l}$. Aplicando o mesmo modelo a cevada contaminada com 1250

$\mu\text{g}/\text{kg}$ DON (o limite máximo permitido), a concentração de DON resultante na cerveja será de $89 \mu\text{g}/\text{l}$.

Tabela 12. Estimativa da ingestão diária de micotoxina pelo consumo de cerveja.

	DON	
	Nível no estudo	Nível legislação
Média ($\mu\text{g}/\text{l}$)	272.17	88.75
Média da exposição diária ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{pc}$)	0.77	0.25
Consumo diário tolerável ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{pc}$)	1	1
% do consumo diário tolerável	77	25

3.5 DISCUSSÃO

Como demonstrado na literatura, as micotoxinas são compostos altamente estáveis (resistentes a altas temperaturas e níveis extremos de pH) (KABAK, 2009). Embora os processos de malteação e fabricação de cerveja tenham temperaturas máximas de operação abaixo daquelas capazes de destruir as micotoxinas, elas podem influenciar a concentração de micotoxinas, devido a mudanças físicas, químicas e bioquímicas que ocorrem (BRIGGS, 1998; BRIGGS et al., 2004).

No presente estudo, os níveis de micotoxinas foram determinados em sete etapas do processo de malteação. Primeiro, a cevada e a água foram analisadas e os resultados mostraram níveis para DON em ambas as matrizes (média de cevada $3835 \mu\text{g}/\text{kg}$, média de água de $599 \mu\text{g}/\text{kg}$). A quantidade de DON encontrada na água pode ser explicada pela característica solúvel desta micotoxina (PAUL B. SCHWARZ; CASPER; BEATTIE, 1995). Por outro lado, baixos níveis de ZEA foram encontrados na água.

Adicionalmente, quando os níveis de DON na cevada foram comparados ao primeiro e terceiro dia de maceração, foi observada uma diminuição nos níveis. Esses resultados também podem estar relacionados à perda de micotoxinas na água.

O próximo passo envolvido na malteação é a germinação. Neste estudo, as amostras foram retiradas do primeiro e terceiro dia deste processo. Os níveis de DON diminuíram significativamente entre a cevada e o terceiro dia de germinação. Uma possível razão para essa redução (glicosilação de DON) deve-se ao aumento do teor de glicose, que pode ativar enzimas na cevada responsáveis pela respectiva reação, transformando DON em DON-3-glicosídeo. Alguns estudos mostraram que 50 % do DON é convertido após alguns dias de germinação (MAUL et al., 2012). Até onde sabemos, não há estudo realizado considerando a glicosilação

de ZEA durante a germinação em cevada. No entanto, os resultados do presente estudo poderiam sugerir essa reação (entre cevada e o primeiro dia de germinação), transformando ZEA em α e β -zearalenol e outras toxinas mascaradas, embora a diminuição nos níveis seja considerada sem diferença significativa (SCHNEWEIS et al., 2002).

Além disso, durante a germinação, a biomassa fúngica e a produção de micotoxinas podem aumentar, provavelmente como resultado da contaminação cruzada da água residual ou por uma infecção latente de grãos de cevada, que pode ser ativada com o aumento da umidade durante esse processo (VEGI; SCHWARZ; WOLF-HALL, 2011). Isto pode ser visto no presente estudo quando os níveis de ZEA desde o primeiro dia de maceração e o terceiro dia de germinação são comparados.

O procedimento final na malteação é a secagem, onde a germinação é interrompida e o malte verde é preparado para armazenamento e transporte. Esta etapa é caracterizada por várias escalas de temperatura (55–100 °C) e é considerada crucial para a formação de cor e sabor do malte (BRIGGS et al., 2004). No presente estudo, os níveis de DON diminuíram significativamente entre o terceiro dia de germinação e o malte. Isso pode estar relacionado às altas temperaturas, mas também devido à separação das radículas do grão (crivagem).

O malte e as radículas foram analisados para ambas as toxinas sendo necessário destacar a quantidade eminente dos compostos encontrados nas radículas. Para a indústria cervejeira, foi considerado um bom resultado, pois a maioria das micotoxinas é liberada nessa parte do grão. Por outro lado, deve ser uma preocupação para a agricultura, já que essa matriz é frequentemente usada para alimentação animal (CAVAGLIERI et al., 2009; MASTANJEVIĆ et al., 2018; ZACHARIASOVA et al., 2014).

Após a malteação da cevada, os grãos são moídos e a água adicionada para iniciar o processo de mosturação. Na fase de mostura, a água é aquecida a cerca de 62-71 °C e enzimas, como α e β -amilases, são ativadas para permitir a conversão de amidos em açúcares fermentescíveis (WOLF-HALL, 2007). Com relação à influência sobre os níveis de micotoxinas nesta etapa, há uma possível liberação de DON conjugada às estruturas proteicas e, como resultado, há um aumento na concentração total de DON (HABLER et al., 2017). Este fato pode ser visto no estudo atual para ambas as micotoxinas, não apenas para DON. Sendo mais específico, DON e ZEA apresentaram um nível médio no malte de 1211 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 391 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Na mosturação, se os resultados do mosto e dos grãos utilizados forem somados, o valor é quase duas vezes maior para DON e quase quatro vezes maior para ZEA (DON: 2173 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ZEA: 1460 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Além disso, o processo de moagem poderia interferir

nos níveis, devido à dispersão homogênea de micotoxinas em todo o lote de malte e sua posterior solubilização em água da mostura (PASCARI et al., 2018).

A fervura é a próxima etapa e é caracterizada pela inativação enzimática, adição de lúpulo, isomerização de alfa ácidos do lúpulo, evaporação de água e volatilização de compostos indesejáveis na cerveja (dimetilsulfuretos), precipitação de proteínas, esterilização, reações de *Maillard* e modulação de sabor (BRIGGS et al., 2004). Considerando o impacto no conteúdo de micotoxinas na fervura do mosto, a temperatura nesse processo (acima de 100 °C) e o tempo médio de fervura (1 hora) podem causar uma diminuição na concentração das micotoxinas (MILANI; MALEKI, 2014; PASCARI et al., 2018). Essa instabilidade pode ser observada nos resultados do presente estudo, mesmo em baixas concentrações.

Por outro lado, alguns autores mostraram que DON e ZEA são compostos muito estáveis e os pontos de fusão no processamento de alimentos estão em torno de 153 °C e 165 °C, respectivamente (KABAK, 2009; MILANI; MALEKI, 2014). Outro aspecto que deve ser mencionado nesta fase é a adição de adjuntos, como milho, trigo e sorgo, que podem representar uma fonte adicional de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2017; PIACENTINI et al., 2017).

Após o processo de ebulição, o mosto é resfriado à 21 °C e a fermentação do mosto é iniciada pela levedura (gênero *Saccharomyces*). Em geral, a temperatura de fermentação varia de 2 °C a 30 °C, durante 7 a 9 dias (BASAROVA et al., 2017; EBC, 2009). DON demonstrou-se muito estável neste processo e os resultados não mostraram diferenças significativas (após a fervura: 1132 µg/kg; após a fermentação: 1089 µg/kg = 3,8 % de redução aparente). Em pesquisa realizada por Campagnollo et al., (2015), resultados semelhantes foram encontrados, onde houve uma redução de apenas 11,6 % de DON.

A adsorção de micotoxinas por leveduras tem sido estudada e ocorre devido à ligação das toxinas a β-glucanas encontrada na parede celular da levedura (JOUANY; YIANNIKOURIS; BERTIN, 2005). No presente estudo, as leveduras também foram analisadas após a fermentação e DON foi adsorvido. Para ZEA, somente níveis abaixo dos limites de quantificação foram detectados tornando essa determinação impossível nos experimentos. No entanto, estudo conduzido por Campagnollo et al., (2015), ZEA mostrou ter uma taxa muito alta de adsorção (75,1 %) nos resíduos de fermentação de cerveja.

Finalmente, um cálculo de exposição diária considerando os resultados da ingestão diária tolerável, o consumo de 62l/ano per capita (RENATO MATOS LOPES; MARIN MORALES; NALLIN MONTAGNOLLI, 2018) (0,17 l/dia de cerveja), e o peso médio para um adulto de 60 kg, foi realizado. Os dados resultaram em uma exposição de DON de 0,77 µg/kg/pc/dia com os resultados do presente estudo e 0,25 µg/kg/pc/dia utilizando os níveis estabelecidos pela

regulamentação. Ambos os resultados estimados de ingestão diária (DI) ainda são inferiores à ingestão diária tolerável máxima provisória (PMTDI) de 1 µg/kg pc/dia para DON (EFSA, 2013).

3.6 CONCLUSÃO

Os processos de malteação e fabricação de cerveja podem afetar a estabilidade de DON e ZEA. Os níveis das micotoxinas diminuíram durante todo o processo (cevada à cerveja), com diferenças significativas. É necessário ressaltar que as radículas e os restos de grãos mostraram descartar a maioria das micotoxinas produzidas nos processos anteriores. No entanto, deve ser uma preocupação à agricultura, devido a esta matriz ser destinada à alimentação animal.

De acordo com a estimativa da ingestão diária de micotoxinas, este estudo mostrou que, se a matéria-prima estiver abaixo dos limites estabelecidos pela legislação, os níveis podem diminuir durante o processo e tornar a cerveja segura para os consumidores.

Finalmente, a qualidade dos cinco ingredientes envolvidos (cevada, lúpulo, água, levedura e adjuntos) no processo da cerveja desempenha um papel decisivo na criação de um produto final seguro.

**CAPÍTULO 4– FENÔMENO GUSHING E O GENE HYD5 EM ESPÉCIES DE
FUSARIUM ISOLADAS DE AMOSTRAS DE CEVADA DO BRASIL**

4.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Fusarium* é considerado o fungo de maior ocorrência em grãos e esta contaminação pode levar a perdas de rendimento tanto na agricultura como na indústria, por vários motivos.

Nos últimos anos, muitos estudos foram realizados para conhecer a ocorrência das espécies de *Fusarium* e seus metabólitos (micotoxinas) em grãos. Contudo, outras substâncias produzidas por este gênero também têm sido amplamente estudadas. As hidrofobinas são proteínas produzidas na parede celular de fungos filamentosos e caracterizadas como proteínas de baixo peso molecular, capazes de alterar a superfície da água de hidrofílica para hidrofóbica (MASTANJAVIC et al., 2015).

Tais propriedades são úteis quando os fungos penetram nas interfaces ar-água ou se ligam às superfícies hidrofóbicas de hospedeiros (ceras cuticulares de tecidos vegetais). As hidrofobinas demonstraram desempenhar papéis importantes em interações patogênicas e mutualistas (TEMPLETON; RIKKERINK; BEEVER, 1994; WÖSTEN; WESSELS, 1997).

Além disso, a produção destas proteínas por *Fusarium* em cevada está correlacionada ao *gushing* na cerveja. *Gushing*, é um fenômeno que consiste na formação excessiva de espuma na abertura da garrafa (SHOKRIBOUSJEIN et al., 2011). É considerado um problema de qualidade da cerveja, associado principalmente à qualidade da matéria-prima. O fenômeno vem sendo estudado há décadas, porém seu mecanismo ainda não foi totalmente elucidado (SARLIN et al., 2012).

Os genes das hidrofobinas em *F. graminearum* foram previamente pesquisados. O genoma contém cinco genes diferentes (*HyD* 1-5) que os codificam, entretanto, o mais conhecido e estudado é o *HyD5* (QUARANTIN et al., 2019).

Alguns países como Alemanha e Bélgica, já conhecem o perfil da cevada e malte, no que diz respeito a presença de hidrofobinas, seus genes e *gushing* (CHRISTIAN et al., 2010; DECKERS et al., 2012). No entanto, a presença dessas proteínas associadas ao *gushing* nos grãos colhidos no Brasil nunca foi estudada/analísada.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o gene *Hyd5* em *Fusarium* spp. isolados das amostras de cevada, por meio da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e análise filogenética;
- Avaliar o potencial para o fenômeno *gushing* em amostras de cevada produzidas no Brasil.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Amostras

Um total de 21 amostras de cevada (variedade BRS Brau) foram obtidas a partir da colheita de 2016, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram coletadas de lotes a granel, após remoção de sujidades e secagem (até 60 °C) nas unidades de armazenamento. A amostragem foi realizada em diferentes pontos dos lotes, com peso final mínimo de 5 kg. Cada amostra foi homogeneizada e reduzida em porções de 1 kg. As amostras foram usadas para isolamento de espécies do gênero *Fusarium* e malteadas para os testes de *gushing*.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Isolamento das cepas de *Fusarium*, obtenção da massa fúngica e extração do DNA

As cepas de *Fusarium* utilizadas no estudo foram isoladas das amostras de cevada da safra de 2016. O método de isolamento, obtenção da massa fúngica e extração do DNA foram realizados de acordo com a seção 2.3.2.1 e 2.3.2.2.

4.3.2.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

4.3.2.2.1 Seleção dos loci, amplificação e análises de sequenciamento Sanger

As sequências parciais do gene *Hyd5* foram selecionadas com o intuito de avaliar a presença da proteína hidrofóbica nos isolados de *Fusarium*. Os loci foram amplificados com o uso de iniciadores desenhados para o gene da melhor sequência de hidrofóbica encontrada no banco de dados do genoma do *Fusarium* (Tabela 13).

As reações de PCR foram estabelecidas em um volume total de 25 ml. A mistura foi composta de 100 ng de DNA alvo por reação, com 5 × PCR buffer contendo 0,7 mM de cada primer, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 U / ml DNA polimerase Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água de grau PCR até volume final.

O programa de PCR consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 90 s, seguido por 94 °C por 30 s, anelamento de primers a 55 °C por 90 s, alongamento a 68 °C por 2 min, e extensão final a 72 °C durante 5 min. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 1,2 % (p/v) e visualizados utilizando luz UV.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, EUA) de acordo com as especificações do fabricante para posterior análise no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

As sequências foram alinhadas através do programa Clustal W, presente no Geneious (Versão 7.1.) (DRUMMOND et al., 2011). O alinhamento foi editado manualmente utilizando o programa Geneious, e todas as mutações checadas através da visualização dos cromatogramas.

As similaridades das sequências dos genes detectadas no estudo foram verificadas de acordo com as sequências de nucleotídeos atuais disponíveis no NCBI (National Centre for Biotechnology Information) para o gene *HyD5*.

Tabela 13. Primers utilizados para PCR e sequenciamento.

Gene	Designação do primer	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Referências
<i>HyD5</i>	HyD5 F	CACCATGMAGTTCTCACTCGC	(SARLIN et al., 2012)
	HyD5 R	TTCCTTAGTCCTGGACACCA	

4.3.2.3 Análises filogenéticas

O estudo filogenético para o gene *Hyd5* foi realizado de acordo com a metodologia descrita na seção 2.2.2.4.

4.3.2.4 Teste de *gushing*

O teste de *gushing* nas amostras de cevada cervejeira malteadas provenientes da safra de 2016 foi realizado de acordo com um teste modificado da Carlsberg (MEBAK, 2011). Para realizar os experimentos, 150 g de malte moídos foram adicionados à 400 ml de água destilada e cuidadosamente homogeneizados em um misturador laboratorial à 15000 rpm, por 60s para formação de uma suspensão. A suspensão foi transferida para um tubo e centrifugada por 10 minutos a uma RCF (força centrífuga relativa) de 4500g. Após a centrifugação, 300 ml do sobrenadante foram transferidos para um béquer e fervido (20-25 min) até que o volume reduzisse à 200 ml. Imediatamente após a fervura a solução foi filtrada com um filtro de papel para um balão volumétrico com tampa de borracha e resfriada até chegar à 20 °C. Cinco (5) ml da solução estoque de azida sódica foi adicionada, seguida de adição de água estéril a 20 °C até o volume final de 200 ml.

Em seguida, garrafas de Bonaça a 5 °C foram escolhidas com o mesmo *headspace*. Usando uma proveta graduada, foram removidos 50 ml de água das garrafas. A água removida foi substituída pela mesma quantidade do extrato de cada amostra. As garrafas foram imediatamente fechadas, rotacionadas uma vez à 180 ° ao longo do eixo longitudinal e pesadas. Depois, as garrafas foram fixadas horizontalmente em um agitador de laboratório e agitadas por 72 h em uma temperatura de 20 °C a 75 rpm.

Por fim, as garrafas foram removidas do agitador e foram dispostas na vertical por 10 min, seguidas por 3 rotações à 180 ° por 10s. As garrafas foram abertas e avaliadas considerando a produção excessiva de espuma. Então, as mesmas foram pesadas individualmente e os resultados calculados. A diferença entre os pesos antes e depois da abertura da garrafa correspondeu ao volume de *gushing* em g/garrafa.

O *gushing* no malte foi definido quando o volume de excesso de água gaseificada excedia 5 g. De acordo com MEBAK, (2011), 0 a 5 g de diferença de peso significa que não há potencial para *gushing*, 5-50 g possível potencial para *gushing* (50 % de probabilidade), > 50 g potencial para *gushing* (92 % de probabilidade).

4.4 RESULTADOS

Considerando a detecção da sequência do *HyD5* dos fungos isolados, todas as cepas (100 %) apresentaram o gene. O conjunto de dados do gene *HyD5*, obtido pelo estudo filogenético, foi composto por 25 taxa e 272 nucleotídeos, os quais 186 foram caracteres informativos de parcimônia (PICs). Análise filogenética resultou em 10 árvores mais parcimoniosas (IC = 0,78, RI = 0,89). Diferenças topológicas não foram detectadas entre as inferências de filiação vizinha e máxima parcimônia.

A filogenia foi composta por quatro linhagens principais e *Tricholoma* spp. como *outgroup*. A primeira linhagem foi subdividida em dois clados principais: um composto por *F. verticillioides* e outro por *F. proliferatum*. A segunda linhagem foi composta apenas por *F. avenaceum*. A terceira linhagem foi composta por *F. poae* e a quarta linhagem por *F. graminearum* e *F. meridionale*, estas últimas fazem parte do complexo de espécies de *F. graminearum* (Figura 9). Todas as principais linhagens apresentaram apoio da MPBS (*maximum parsimony bootstrap*).

A filogenia do *HyD5* parece ser congruente com a filogenia da espécie, já que cada espécie isolada se agrupava dentro de seus próprios grupos. Os resultados foram consistentes com a caracterização morfológica e com a filogenia composta pelos locos *EF-1a* e *RPB2* (PIACENTINI et al., 2019). No entanto, novos estudos contendo mais isolados de *Fusarium*

spp. devem ser conduzidos para verificar se este locus é ou não consistente com a árvore de espécies dentro do gênero mencionado acima.

Os dados obtidos nos testes de *gushing* demonstraram que das 21 amostras de malte analisadas, 9 delas foram positivas considerando a formação excessiva de espuma na abertura da garrafa. Os níveis variaram entre 3 e 124 g/garrafa de *gushing* (Tabela 14).

Os resultados de ambas as análises foram avaliados em conjunto, a fim de encontrar uma correlação entre a presença do gene *HyD5* e amostras positivas para *gushing*. No entanto, nenhuma conexão foi encontrada, porque os isolados positivos para *gushing* ficaram espalhados por toda a árvore filogenética, com todos os clados principais contendo pelo menos um isolado positivo. Como mencionado anteriormente, a filogenia de *HyD5* parece seguir a árvore de espécies (PIACENTINI et al., 2019), portanto, espera-se que as amostras positivas de *gushing* não se agrupem.

Tabela 14. Amostras positivas no teste de *gushing* e espécies de *Fusarium* isoladas.

Variedade	Amostra	Isolado	<i>Gushing</i> (g/garrafa)	Espécie de <i>Fusarium</i>
BRS Brau	1	33E	12	<i>F. graminearum</i>
	2	24A	24	<i>F. graminearum</i>
	3	63C	<5	<i>F. graminearum</i>
	4	30B	<5	<i>F. graminearum</i>
	5	60E	<5	<i>F. avenaceum</i>
	6	13A	<5	<i>F. graminearum</i>
	7	8A	<5	<i>F. graminearum</i>
	8	21B	<5	<i>F. graminearum</i>
	9	4A	124	<i>F. meridionale</i>
	10	2A	38	<i>F. graminearum</i>
	11	15A	<5	<i>F. poae</i>
	12	32A	<5	<i>F. poae</i>
	13	31A	117	<i>F. graminearum</i>
	14	23A	<5	<i>F. poae</i>
	15	7A	42	<i>F. poae</i>
	16	61B	10	<i>F. verticilioides</i>
	17	60F	8	<i>F. proliferatum</i>
	18	64A	<5	<i>F. avenaceum</i>
	19	58A	3	<i>F. avenaceum</i>
	20	63B	<5	<i>F. avenaceum</i>
	21	60B	<5	<i>F. avenaceum</i>

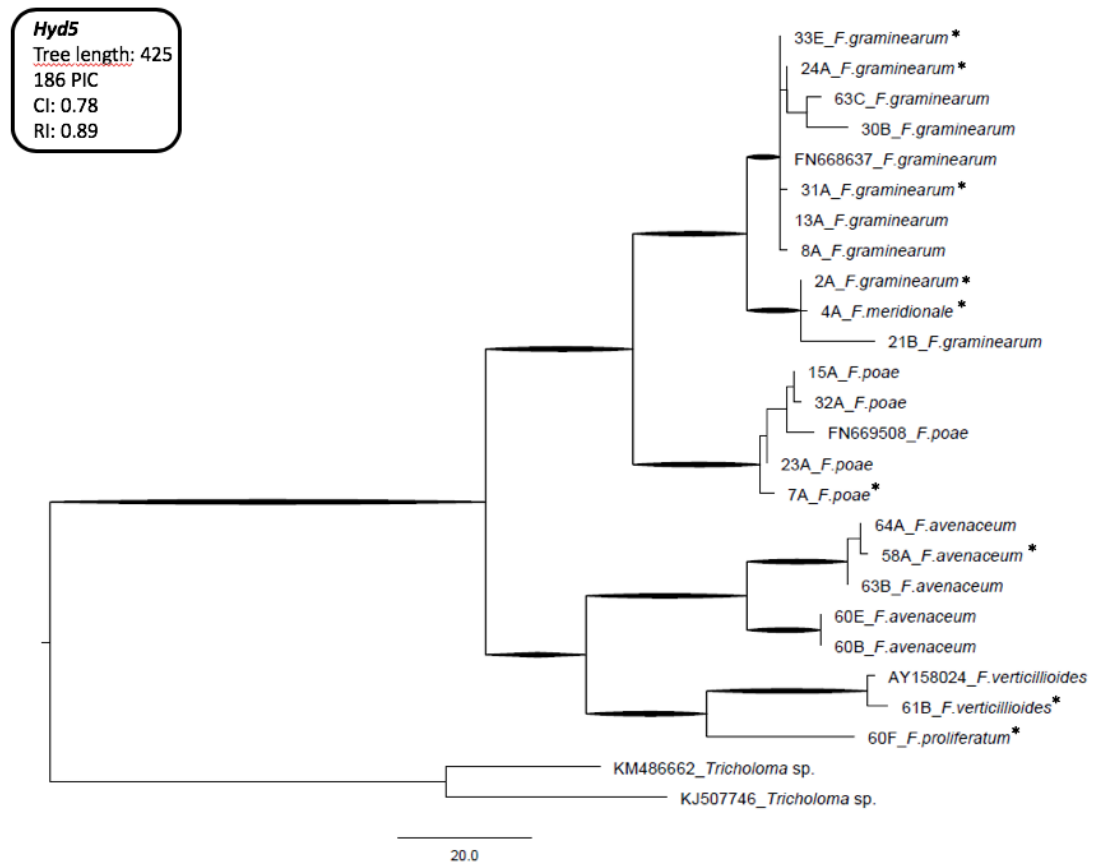


Figura 9. Filogenia obtida pelo método de máxima parcimônia inferido pelo locus *Hyd5* isolados de grãos de cevada. Valores de *bootstrap* são indicados na base de cada clado (os ramos eram sustentados se o *bootstrap* fosse > 70 %). O *outgroup* está representado pela espécie *Tricholomasp*.

4.5 DISCUSSÃO

Amostras de cevada colhidas no Brasil tem sido monitoradas por alguns anos, sempre considerando a contaminação fúngica e produção de micotoxinas (PIACENTINI et al., 2015a, 2018, 2019). Entretanto, essa contaminação fúngica também pode estar associada a presença de hidrofobinas na matéria-prima e, conseqüentemente, problemas como o *gushing* na cerveja.

O fenômeno *gushing* na cerveja é considerado uma questão de qualidade para a indústria cervejeira e que pode levar a perdas econômicas consideráveis. Várias cervejarias na Europa têm relatado tais problemas, contudo, no Brasil, o fenômeno *gushing* ainda não é conhecido. Problemas de formação excessiva de espuma sempre foram relatados como uma contaminação bacteriana ou outro problema relacionado ao processamento.

Como apresentado pela literatura, o *gushing* é causado principalmente por proteínas (hidrofobinas) produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, salientando-se que pequenas concentrações dessas hidrofobinas, níveis em ppm ou menores (0,4 ppm), são capazes de induzir a produção de *gushing* (SARLIN, 2012).

De acordo com Sarlin et al., (2007), o gênero *Fusarium* é capaz de se proliferar e produzir hidrofobinas durante o processo de malteação, especialmente durante as etapas de maceração e germinação. Os autores detectaram no malte quantidades de hidrofobinas 10 vezes maiores, em comparação com a da correspondente cevada. Tal fato, pode ser possivelmente explicado pelas alterações que ocorrem na malteação. Durante esta etapa, existem condições altamente favoráveis para o crescimento microbiano em termos de nutrientes disponíveis, temperatura, umidade e atmosfera gasosa (LAITILA, 2007).

Várias espécies de *Fusarium*, tais como *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, foram relatadas como produtoras de hidrofobinas, e também por induzirem *gushing* (SARLIN et al., 2012). No entanto, existem diferenças entre as espécies de *Fusarium* em termos de quão severamente elas afetam o potencial de *gushing* no malte. Haikara, (1983) observou que os isolados de *F. culmorum* induziram mais vigorosamente *gushing* do que os isolados de *F. avenaceum*.

No presente estudo, *F. meridionale*, foi a espécie que apresentou maior produção de *gushing*, fato ainda não citado na literatura. A espécie *F. graminearum* foi a segunda maior produtora de *gushing*. No entanto, esta última já foi relatada por vários autores como produtora de tal fenômeno na cerveja (SARLIN et al., 2012; VIRKAJÄRVI; SARLIN; LAITILA, 2017).

O estudo realizado por Denschlag; Vogel; Niessen, (2012) associou códigos genéticos para a hidrofobina classe II *Hyd5p* com *Fusarium* spp. como marcador genético específico do grupo para melhorar a detecção e identificação de fatores do *gushing* em malte. Na literatura, a sequência homóloga do gene *FcHyd5* já detectada em *F. graminearum* (ZAPF et al., 2006) faz com que *FcHyd5p* seja uma substância modelo interessante para o *gushing* na cerveja devido à presença do gene nessa espécie, que foram mais intimamente associados à indução do fenômeno. Por essa razão, o *FcHyd5p* pode ser um fator essencial para a indução de *gushing* em líquidos aquosos carbonatados (STÜBNER et al., 2010).

As amostras da safra de 2016 utilizadas nessa pesquisa, em relação ao *gushing*, mostraram um novo perfil da cevada produzida no país, sendo comparadas a outros estudos realizados em países que apresentaram esse problema por décadas.

Em pesquisa realizada por Christian et al., (2010), com amostras de malte da Alemanha, utilizando a mesma metodologia empregada na presente investigação, os níveis de *gushing* (máx. 250g/garrafa) obtidos foram maiores do que os encontrados em nossa pesquisa. Posteriormente, em 2012, Deckers et al., na Bélgica, empregaram diferente metodologia nos testes de *gushing*. Nos experimentos, utilizando amostras de malte da Cargill, os resultados do

mosto produzido foram apresentados em porcentagem e as amostras produziram uma quantidade máxima de 15% de espuma, considerando o volume total da garrafa.

Embora o presente estudo mostre a ocorrência de *gushing* em amostras de malte contaminadas com *Fusarium*, apenas a presença do gene não é um fator preditivo que a espécie produz o fenômeno. Isso pode depender das condições exigidas para que o gene seja expresso, bem como outras possibilidades de indução do fenômeno não relacionadas ao gene, que ainda precisam ser melhor elucidadas.

4.6 CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou um novo perfil da cevada colhida no Brasil, considerando a contaminação por fungos. Algumas das amostras foram capazes de produzir *gushing*, porém não estão associadas à presença do gene *HyD5*.

Mais pesquisas sobre hidrofobinas e *gushing* devem ser realizadas no futuro, devido à contaminação fúngica constatada nas amostras brasileiras. Os resultados serão um excelente suporte para a indústria cervejeira, evitando perdas econômicas e melhorando o controle de qualidade da matéria prima.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES GERAIS

5.1 CONCLUSÕES GERAIS

- Os resultados obtidos no presente trabalho contribuíram para demonstrar a importância da contaminação por fungos, micotoxinas e de outros compostos encontrados em cevada cervejeira cultivada no Brasil;
- As duas safras estudadas demonstraram níveis preocupantes de contaminação por micotoxinas, que variaram entre 45,95 e 7500 µg/kg e 82,41 e 630 µg/kg para DON e ZEA, respectivamente;
- Das amostras analisadas (safras 2016 e 2015), 48 % apresentaram níveis de DON acima do permitido pela legislação brasileira. Em relação a ZEA, 80 % das amostras ultrapassaram os limites permitidos;
- Considerando a estabilidade de DON e ZEA, durante os processos de malteação e produção de cerveja, foi possível constatar variações nos níveis de ambas as micotoxinas durante as etapas de cada processo. Entretanto, observou-se uma diminuição significativa de DON (71,6 %) entre o início do processo de malteação e o final da produção de cerveja;
- Subprodutos de cevada, como resto de grãos e radículas, apresentaram alta contaminação por ambas as toxinas produzidas nas etapas anteriores do processamento da cerveja. Contudo, esse resíduo deve ser uma preocupação para a agricultura, por estar destinado à alimentação animal;
- Os experimentos relacionados ao gene da hidrofobina e *gushing* demonstraram um perfil de qualidade desconhecido na cevada brasileira. Todavia, há a necessidade de mais estudos relacionados ao tema (análises de expressão gênica), que possam elucidar quais as espécies de *Fusarium* no Brasil, são realmente responsáveis por produzirem *gushing* na cerveja;
- Outras pesquisas aplicadas no que tange o fenômeno *gushing*, como testes de qualidade da matéria prima dentro da indústria cervejeira, devem ser aprofundadas;
- Nossos resultados revelaram uma expressiva contaminação por fungos, micotoxinas e hidrofobinas, comparativamente aos estudos realizados em outros países. Por esse motivo, há necessidade de um monitoramento constante desses grãos, com o intuito de mitigar os riscos à saúde do consumidor e evitar perdas econômicas à indústria.;
- Finalmente, análises envolvendo parâmetros climáticos das regiões e elementos genéticos das sementes de cevada devem ser realizadas, a fim de apontar quais as variedades de cevada mais apropriadas para cultivo, de modo a controlar a proliferação fúngica e a consequente produção de metabolitos.

REFERÊNCIAS

401/2006/EC. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. L70, p. 12–34, 2006.

AL-TAHER, F. et al. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Food Control**, 2017.

AMAHA, M. . et al. **Gushing inducers produced by some moulds strains**. Proceedings of the European Brewery Convention Congress. **Anais...**Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 1973

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. [s.l: s.n.].

AOKI, T. et al. Systematics, Phylogeny and Trichothecene Mycotoxin Potential of Fusarium Head Blight Cereal Pathogens. **Mycotoxins**, v. 62, n. 2, p. 91–102, 2012.

ASTOLFI, P. et al. Molecular survey of trichothecene genotypes of Fusarium graminearum species complex from barley in Southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 197–201, 2011.

BAMFORTH, C. W.; BARCLAY, A. H. . Malting Technology and the uses of malt. In: **Barley: Chemistry and Technology**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1993. p. 297–332.

BASAROVA, G. et al. **The Comprehensive Guide to Brewing: From Raw Materials to Packaging**. Nuremberg, Germany: Fachverlag Hans Carl, 2017.

BECCARI, G. et al. 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.

BECCARI, G. et al. Effect of wheat infection timing on Fusarium head blight causal agents and secondary metabolites in grain. **International Journal of Food Microbiology**, 2019.

BĚLÁKOVÁ, S. et al. The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in czech malting barley. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 93–98, 2014.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–

516, 2003.

BOLECHOVÁ, M. et al. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. **Food Control**, v. 47, p. 108–113, 2015.

BRASIL. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, v. 2017, p. 3, 2017.

BRIGGS, D. E. **Malts and malting**. 1st editio ed. London: London: Blackie Academic & Professional, 1998.

BRIGGS, D. E. **Malt modification - A century of evolving views** **Journal of the Institute of Brewing**, 2002.

BRIGGS, D. E. et al. **Brewing: Science and Practice**. 1st. ed. England: Woodhead Publishing, 2004.

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.

BURGESS, L. . et al. Distribution of *Fusarium* species in section *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum* and *Discolor* recovered from grassland, pasture and pine nursery soils of Eastern Australia. **Mycologia**, v. 80, n. 6, p. 815–824, 1988.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. **Food Research International**, 2015.

CAVAGLIERI, L. R. et al. Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. **Journal of Stored Products Research**, v. 45, n. 3, p. 147–150, 2009.

CERVBRASIL. **Anuário 2016**.

CHANNIAH, L. H.; MAIER, D. E. Best stored maize management practices for the prevention of mycotoxin contamination. **Mycotoxin Reduction in Grain Chains**, p. 78–88, 2014.

CHINA. **China NHFPC Issued Maximum Levels of Mycotoxins in Food (GB 2761-2017)**, 2017.

CHOI, S. et al. Behaviour of *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* on rice as affected

by degree of milling, temperature, and relative humidity during storage. **Food Microbiology**, v. 46, p. 307–313, 2015.

CHRISTIAN, M. et al. Cerevisia New cognitions on gushing in the wort production process and in quantifying the gushing potential of malt &. **Cerevisia**, v. 35, n. December 2009, p. 35–37, 2010.

CPTEC. **Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - CPTEC/INPE**. Disponível em: <<http://www.cptec.inpe.br/>>. Acesso em: 5 set. 2017.

DECKERS, S. M. et al. Doubly Modified Carlsberg Test combined with Dynamic Light Scattering allows prediction of the primary gushing potential of harvested barley and malt. **Cerevisia**, v. 37, p. 77–81, 2012.

DENSCHLAG, C.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium* spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 189–196, 2012.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. **Plant Pathology**, v. 56, p. 337–337, 2007.

DRUMMOND, A. . et al. **Geneious**, 2011.

EBC. **European Brewery Convention - Analytica EBC**. Nuremberg, Germany: Fachverlag Hans Carl, 2009.

EDITE BEZERRA DA ROCHA, M. et al. **Mycotoxins and their effects on human and animal health** **Food Control**, 2014.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. **EFSA Journal**, v. 89, p. 1–35, 2004.

EFSA. Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. **EFSA Journal**, 2013.

EMBRAPA. **Cultivo de cevada**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cevada/arvore/CONT000fyt381uk02wx5ok0vcihk68tas55r.html>>. Acesso em: 28 maio. 2018.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006. **Official**

Journal of the European Communities, v. L 269, n. September 2000, p. 1–15, 2006.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture**. [s.l.: s.n.].

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins – An update. **Journal of Stored Products Research**, v. 71, p. 22–40, mar. 2017.

FORSTER, B. P. et al. The barley phytomer. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 725–733, 2007.

FUCHS, U.; CZYMMEK, K. J.; SWEIGARD, J. A. Five hydrophobin genes in *Fusarium verticillioides* include two required for microconidial chain formation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 9, p. 852–864, 2004.

GARCIA, D. et al. Impact of cycling temperatures on *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins production in soybean. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 15, p. 2952–2959, 2012.

GARDNER, R. . Surface viscosity and gushing. **J. Inst. Brew**, v. 78, p. 391–399, 1972.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Pathogenicity and In Planta Mycotoxin Accumulation Among Members of the *Fusarium graminearum* Species Complex on Wheat and Rice. **Phytopathology**, v. 95, n. 12, p. 1397–1404, 2005.

GROMADZKA, K. et al. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 209–220, 2008.

GUIDO;, L. F.; MOREIRA;, M. M. Malting. In: **Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products**. 1 first ed ed. [s.l.: s.n.]. p. 367.

HABLER, K. et al. Fate of fusarium toxins during brewing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 190–198, 2017.

HAIKARA, A. **Malt and beer from barley artificially contaminated with Fusarium in the field**. (Oxford, Ed.)Proceedings of the European Brewery Convention Congress. **Anais...**London: 1983Disponível em: <IRL Press>

HIETANIEMI, V. et al. Updated survey of *Fusarium* species and toxins in Finnish cereal grains. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 33, n. 5, p. 831–848, 2016.

HOFER, K. et al. Influence of Fusarium isolates on the expression of barley genes related to plant defense and malting quality. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 17–24, 2016.

IBÁÑEZ-VEA, M. et al. Co-occurrence of mycotoxins in Spanish barley: A statistical overview. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 295–298, 2012.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. International Agency for Research on Cancer Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. **Iarc Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans**, v. 96, p. 1-390, 2002.

JOUANY, J.; YIANNIKOURIS, A; BERTIN, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. **Archiva Zootechnica**, n. Table 2, p. 26–50, 2005.

JUAN, C. et al. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p. 148–156, 2017.

JUAN, C.; RITIENI, A.; MAÑES, J. Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1747–1755, 2013.

KABAK, B. **The fate of mycotoxins during thermal food processing** **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2009.

KARLSSON, I. et al. Agricultural factors affecting Fusarium communities in wheat kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 252, p. 53–60, 2017.

KAZAN, K.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M. **On the trail of a cereal killer: Recent advances in Fusarium graminearum pathogenomics and host resistance** **Molecular Plant Pathology**, 2012.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 5th update ed. Berlin: VLB Berlin, 2014.

LAITILA, A. Microbes in the tailoring of barley malt properties. **VTT Publications**, 2007.

LARSEN, J. C. et al. **Workshop on trichothecenes with a focus on DON: Summary report**.

Toxicology Letters. **Anais**.2004

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The fusarium laboratory manual. p. 388, 2006.

LINDER, M. B. et al. Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 877–896, 2005.

LLORENS, A. et al. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 43–54, 2004.

MA, L.-J. et al. Fusarium pathogenomics. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 399–416, 2013.

MALACHOVA, A. et al. Fusarium mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 14, p. 2495–2505, 2010.

MASTANJAVIC, K. et al. Causes, consequences and prevention of beer gushing. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**, v. 10, n. 1- 2 PG-14–22, p. 14–22, 2015.

MASTANJEVIĆ, K. et al. Fusarium culmorum multi-toxin screening in malting and brewing by-products. **LWT**, 2018.

MAUL, R. et al. Germination induces the glucosylation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various grains. **Food Chemistry**, 2012.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. D. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.

MEBAK. **Raw Materials - Barley, adjuncts, malt, hops and hop products**. Freising-Weihenstephan: [s.n.].

MILANI, J.; MALEKI, G. **Effects of processing on mycotoxin stability in cereals**. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2014.

MOHAPATRA, D. et al. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. June, p. 162–182, 2017.

MÜLLER, M. P. et al. Impact of different hop compounds on the overfoaming volume of beer

caused by primary gushing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 4, p. 459–463, 2010.

MUNAR, M.; SUBREE, B. Gushing — a maltster's view. **J. Am. Soc. Brew. Chem**, v. 55, p. 119–122, 1997.

NEME, K.; MOHAMMED, A. **Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review** **Food Control**, 2017.

NJUMBE EDIAGE, E.; VAN POUCKE, C.; DE SAEGER, S. A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. **Food Chemistry**, v. 177, p. 397–404, 2015.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 5, p. 2044–2049, 1998.

O'DONNELL, K. et al. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 6, p. 600–623, 2004.

O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2235–2248, 2007.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103–116, 1997.

OLIVEIRA, M. S. et al. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. **Food Control**, v. 73, p. 127–132, 2017.

OSTRY, V. et al. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 65–73, 2017.

PASCARI, X. et al. **Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review** **Food Research International**, 2018.

PAUL B. SCHWARZ; CASPER, H. H.; BEATTIE, S. Fate and Development of Naturally Occurring Fusarium Mycotoxins During Malting and Brewing. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 53, n. 3, p. 101–127, 1995.

PESTKA, J. J. **Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance** *Archives of Toxicology*, 2010.

PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 8, n. 1, p. 39–69, 2005.

PIACENTINI, K. C. et al. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). **Food Chemistry**, v. 187, 2015a.

PIACENTINI, K. C. et al. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. **Food Control**, v. 50, p. 925–929, 2015b.

PIACENTINI, K. C. et al. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. **Food Chemistry**, 2017.

PIACENTINI, K. C. et al. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil. **Mycotoxin Research**, 2018.

PIACENTINI, K. C. et al. Assessment of Toxigenic *Fusarium* Species and Their Mycotoxins in Brewing Barley Grains. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2019.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. [s.l: s.n.].

PROCTOR, R. H.; DESJARDINS, A. E.; MORETTI, A. Biological and chemical complexity of *Fusarium proliferatum*. **The Role of Plant Pathology in Food Safety and Food Security**, p. 97–111, 2010.

QUARANTIN, A. et al. Different hydrophobins of *Fusarium graminearum* are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection. **Frontiers in Microbiology**, 2019.

RENATO MATOS LOPES, P.; MARIN MORALES, E.; NALLIN MONTAGNOLLI, R. Cerveja brasileira: do campo ao copo. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 1, n. 1, 16 jan. 2018.

SARLIN, T. et al. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. **Journal**

of the **Institute of Brewing**, v. 111, n. 2, p. 105–111, 2005.

SARLIN, T. et al. Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain. **Journal of the Institute of Brewing**, 2007.

SARLIN, T. et al. Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 184–194, 2012.

SARLIN, T. **Detection and characterisation of Fusarium hydrophobins inducing gushing in beer**. [s.l.] Aalto University School of Chemical Technology, 2012.

SAVI, G. D. et al. Effect of zinc compounds on *Fusarium verticillioides* growth, hyphae alterations, conidia, and fumonisin production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3395–3402, 2013.

SAVI, G. D. et al. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. **Journal of Stored Products Research**, 2014.

SAVI, G. D. et al. Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 2018.

SAVI, G. D.; BORTOLUZZI, A. J.; SCUSSEL, V. M. Antifungal properties of Zinc-compounds against toxigenic fungi and mycotoxin. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 9, p. 1834–1840, 2013.

SCHNEWEIS, I. et al. Occurrence of Zearalenone-4- β -D-glucopyranoside in Wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002.

SHOKRIBOUSJEIN, Z. et al. **Hydrophobins, beer foaming and gushing**. *Cerevisia*, 2011.

SILVA, J. J. et al. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations and occurrence of fumonisins in maize grown in Southern Brazil. **Crop Protection**, v. 99, p. 160–167, 2017.

SILVA, N. D. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4th. ed. Sao Paulo: [s.n.].

STAKHEEV, A. A.; KHAIRULINA, D. R.; ZAVRIEV, S. K. Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on

partial phosphate permease gene sequences. **International Journal of Food Microbiology**, v. 225, p. 27–37, 2016.

STEWART, G. Chapter 2 – Adjuncts. In: **Brewing Materials and Processes**. [s.l: s.n.].

STEWART, G. G. Fermentation. In: **Handbook of Brewing, Third Edition**. [s.l: s.n.].

STÜBNER, M. et al. Heterologous expression of the hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* in *Pichia pastoris* and evaluation of its surface activity and contribution to gushing of carbonated beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1–2, p. 110–115, 2010.

SWOFFORD, D. L. PAUP* phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. **Sinauer Associates**, 2002.

TAKEMURA, H. et al. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 2, p. 170–177, 2007.

TEMPLETON, M. D.; RIKKERINK, E. H. A.; BEEVER, R. E. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 320–325, 1994.

TRALAMAZZA, S. M. et al. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v. 196, p. 445–456, 2016.

ULLRICH, S. E. **Barley: Production, Improvement, and Uses**. [s.l: s.n.].

VARGA, E. et al. New tricks of an old enemy: Isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 2588–2600, 2015.

VEGI, A.; SCHWARZ, P.; WOLF-HALL, C. E. Quantification of Tri5 gene, expression, and deoxynivalenol production during the malting of barley. **International Journal of Food Microbiology**, 2011.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas**. 1. ed. [s.l.] Blucher, 2005.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas**. 2. ed. [s.l.] Blucher, 2016.

VIRKAJÄRVI, V.; SARLIN, T.; LAITILA, A. Fusarium Profiling and Barley Malt Gushing Propensity. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 3, p. 181–192, 2017.

WESSELS, J. G. H. Developmental Regulation of Fungal Cell Wall Formation. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 413–437, 28 set. 1994.

WESSELS, J. G. H. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 1, p. 9–15, 1996.

WHO. International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental health criteria 105 selected mycotoxins: Ochratoxins, trichothecenes, ergot. trichothecenes. **World health organization**, p. 71–164, 1990.

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

WÖSTEN, H. A. B.; WESSELS, J. G. H. **Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development** *Mycoscience*, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1340354097709689>>

XU, W.; HAN, X.; LI, F. Co-occurrence of multi-mycotoxins in wheat grains harvested in Anhui province, China. **Food Control**, 2019.

ZACHARIASOVA, M. et al. Occurrence of multiple mycotoxins in european feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. **Animal Feed Science and Technology**, 2014.

ZAPF, M. W. et al. Cloning of wheat LTP1500 and two Fusarium culmorum hydrophobins in Saccharomyces cerevisiae and assessment of their gushing inducing potential in experimental wort fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, 2006.

ZEPF, M.; GEIGER, E. Gushing problems caused by the calcium oxalate. **Brauwelt Int**, p. 473–475, 2000.

ZHAO. Identification of Beer Gushing Caused by Microbial Infection of Schooner Barley. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, p. 1–5, 2010.

ZINEDINE, A. et al. **Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin** *Food and Chemical*

Toxicology, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A – Artigo publicado em periódico internacional: Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil

Mycotoxin Research (2018) 34:173–178
<https://doi.org/10.1007/s12550-018-0311-8>



ORIGINAL ARTICLE



Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil

Karim C. Piacentini¹ · L. O. Rocha² · G. D. Savi³ · L. Carnielli-Queiroz⁴ · F. G. Almeida⁵ · E. Minella⁶ · B. Corrêa^{1,4}

Received: 12 July 2017 / Revised: 27 February 2018 / Accepted: 2 March 2018 / Published online: 9 March 2018
 © Society for Mycotoxin Research and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is an important cereal crop for food and represents one of the main ingredients in beer production. Considering the importance of barley and its derived products, the knowledge about the mycotoxin contamination in the barley production is essential in order to assess its safety. In this study, the levels of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) in brewing barley were determined using a LC-MS/MS method. A survey was conducted in 2015 to estimate the mycotoxin levels in these products ($n = 76$) from four crop regions in Brazil. The results showed high levels of DON and ZEN in the analyzed samples, with contamination levels of 94 and 73.6%, respectively. The mean levels of DON and ZEN ranged from 1700 to 7500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and from 300 to 630 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Barley samples from regions 1 and 2 presented higher levels of ZEN and DON, respectively, and those from region 4 presented lower levels of both. Co-occurrence of DON and ZEN was seen in the majority of the barley grain samples, and the mycotoxin content was above the maximum levels established by the Brazilian and European regulations.

Keywords Mycotoxins · *Fusarium* · Trichothecenes · Cereals · LC-MS/MS · Contamination

Introduction

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most important cereals in the world, along with maize, wheat, and rice. This cereal is cultivated as a winter crop in tropical areas for malt production and has significant economic importance.

Therefore, efforts have been made to improve barley grains for the global brewing industry. The research in this area includes not only the study of the grain composition but also the resistance of the grains to insects and fungi (Ryan 1990; Kumaraswamy et al. 2011).

Damage caused by fungi is responsible for losses of more than 20% of the harvested grain. Tropical conditions, such as those in Brazil, may contribute to fungal dissemination, and consequently, mycotoxin production (Bergvinson and García-Lara 2004).

The genus *Fusarium* is composed of several species that can produce a wide range of mycotoxins, including fumonisins, fusarins, moniliformin, trichothecenes, and zearalenone (ZEN) (O'Donnell et al. 2013).

Trichothecenes are products of the sesquiterpenoid metabolism of some genera in the order Hypocreales (Rocha et al. 2015), and among them, deoxynivalenol (DON) is notorious for its worldwide occurrence. This mycotoxin is mainly produced by phylogenetic species within the *Fusarium graminearum* species complex, which includes the *F. graminearum sensu strictu*. This species is encountered on barley, maize, and wheat causing *Fusarium* head blight, and important disease that leads to yield losses in small grain cereals (Tralamazza et al. 2016).

✉ Karim C. Piacentini
karim.piacentini@hotmail.com

¹ Biotecnology Department, Biomedics Science Institute, ICB III, University of Sao Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 2415, Sao Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil

² Food Engineering Faculty, University of Campinas, Av. Monteiro Lobato, 80, Campinas, Brazil

³ University of the Extreme Southern Santa Catarina, Av. Universitaria, 1105, Criciúma, Santa Catarina, Brazil

⁴ Microbiology Department, University of Sao Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 1374, Sao Paulo, Brazil

⁵ Facility Center for Research Biomedical Science Institute, Av. Prof. Lineu Prestes 1730, Sao Paulo, Brazil

⁶ Embrapa Trigo, Brazilian Agricultural Research Corporation, Rodovia BR-285, Km 294, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

Deoxynivalenol, also known as vomitoxin, is a commonly encountered trichothecene type-B mycotoxin. Laboratory and farm animal studies have shown that DON elicits a complex spectrum of toxic effects. Chronic exposure to low doses of DON can lead to anorexia, impaired weight gain, and immunotoxicity. Acute exposure to high doses can cause diarrhea, vomiting, leukocytosis, circulatory shock, and ultimately death (Pestka and Smolinski 2005; JECFA 2011).

Zearalenone is another mycotoxin frequently found in grains and is defined as a non-steroidal estrogenic compound produced by *Fusarium*. ZEN is structurally similar to the hormone estrogen, and it competes with 17 β -estradiol for binding to the estrogen receptor, resulting in infertility and reproductive problems (Takemura et al. 2007; EFSA (European Food Safety Authority) 2011). It has also been classified as group 3 (not classifiable as to its carcinogenicity to humans) by the International Agency for Research on Cancer (IARC 2002).

Many countries have implemented regulations on the mycotoxin levels in food and feed to protect human and animal health and in the economic interest of producers and traders (Ibáñez-Vea et al. 2012). The Brazilian regulation has established maximum permitted levels for the mycotoxins of concern in unprocessed cereals. For example, the maximum permitted levels for DON and ZEN in brewing barley are 1000 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively (Brasil 2017). Similarly, the limits for DON and ZEN fixed by the European Commission (2006) are 1250 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively, for unprocessed cereals.

The detection of multiple toxins present in food can be challenging due to the chemical difference between the different groups of mycotoxins and the complexity of food matrices. High-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry is the method of choice for the separation and detection of mycotoxins in food as it is a highly sensitive, specific, and reliable tool, particularly for the development of multi-mycotoxin detection methods (Zöllner and Mayer-Helm 2006).

Matrix effects due to food components such as carbohydrates, proteins, or fats can be minimized by using internal or matrix-matched standards during the LC-MS/MS analysis of mycotoxins. The matrix effects can be compensated by stable isotope-labeled internal standards because their chemical and chromatographic properties are identical to those of the target toxins. The stable isotope dilution assay LC-MS/MS method has been successfully used in mycotoxin analysis (Varga et al. 2012; Habler and Rychlik 2016; Al-TaHER et al. 2017; Habler et al. 2017).

For the reasons stated above, the aim of the current study is to use an LC-MS/MS system for evaluating the presence of DON and ZEN in brewing barley cultivated in different regions of Brazil. The data from this research is significant due to the increasing production of the cereal in the country and its widespread application in the beer industry.

Materials and methods

Chemical and reagents

Both standards (DON and ZEN) were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Stock solution standards were prepared in methanol at concentrations of 1 mg/ml for DON and ZEN. From the individual stock standard solutions, a standard mixture was prepared at the following concentrations: 0.025, 0.0375, 0.0625, 0.125, 0.375, and 0.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The standard mixture was prepared in methanol and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Methanol and acetonitrile (LC-MS/MS grade) were supplied by J.T Baker (Sao Paulo, SP, Brazil). Acetic and formic acids were obtained from Biotec (Pinhais, PR, Brazil). High-purity Milli-Q water (18.2 M Ω /cm) was obtained from a Millipore Synergy system (MA, USA).

Brewing barley samples

A total of 76 brewing barley samples were collected by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) from four regions of the Rio Grande do Sul State (Region 1: Vacaria, Region 2: Santo Augusto, Region 3: Passo Fundo, and Region 4: Não-me-Toque), the largest brewing barley producer in Brazil. The regions were differentiated by the preferred periods for sowing and according to the climatic risk zoning of the map of southern Brazil (Brasil 2014). The grains were gathered from the 2015 harvests and were obtained after the cleaning and drying stages (up to a maximum of 60 $^{\circ}\text{C}$) in the storage unit. Collection was performed using a grain auger from different points of the bulk batches with a minimum final weight of ca 10 kg. Each sample was homogenized and reduced in portions varying around 2 kg. The grains were packed in polyethylene bags and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for immediate mycotoxin analysis.

Mycotoxin extraction procedure for LC-MS/MS

For DON and ZEN analysis, extraction was carried out according to the method proposed by Al-TaHER et al. (2017) with some modifications. In brief, 2 g of brewing barley was ground and homogenized in 8 ml of an acetonitrile/water (80:20 v/v) mixture and shaken for 60 min. The mixture was then centrifuged for 10 min at 3500 rpm. The supernatant was transferred to an amber vessel and dried using a heating block under a nitrogen stream. The dried extract was re-suspended in 500 μl of a mobile phase comprising 70% of a water:methanol:acetic acid (94:5:1, v/v/v) mixture and 30% of a water:methanol:acetic acid (2:97:1, v/v/v) mixture. Finally, 5 μl of the solution was injected into the LC-MS/MS system for analysis.

Optimization of chromatography and mass spectrometry conditions

Detection and quantification were accomplished with an LC-MS system from Thermo Scientific® (Bremen, Germany) composed of an ACCELA 600 quaternary pump, an ACCELAAS auto-sampler, and a triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Max.

The chromatographic conditions were adopted according to the procedure developed by Njumbe Ediage et al. (2015). A triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Max was operated at positive polarity, and the following ionization conditions were used: capillary temperature, 208 °C; vaporizer temperature, 338 °C; spray voltage, 4500 V; and sheath gas pressure, 60 bar. For selectivity, the mass spectrometer was operated in MRM mode; three transitions per analyte were monitored at a collision gas pressure of 1.7 mTorr and collision energy (CE) ranging from 11 to 40 eV.

The mass spectrometry conditions were optimized by re-tuning different analytes via direct infusion of each analyte individually. The cone voltages, collision energies, and product ions were optimized and carefully chosen (Table 1).

The most abundant mass-to-charge ratio (m/z) was selected for each compound of interest. The mycotoxins gave precursor ions and product ions with reasonably high signal intensities in positive ESI mode (ESI+), and protonated molecules $[M + H]$ were found. Table 1 shows the retention times (t_R), MRM transitions, and optimized cone voltages and collision energies for each compound.

Separation was performed on a C8 Luna column, with a particle size of 3 μm and a length and diameter of 150 and 2.0 mm, respectively (Phenomenex, Torrance, USA). The mobile phase comprised solvent A (water/methanol/acetic acid, 94:5:1, $v/v/v$) and solvent B (water/methanol/acetic acid, 2:97:1, $v/v/v$). The gradient program was applied at a flow rate of 0.2 ml/min under the following conditions: 0–1 min 55% B; 1–3 min 55–100% B; 3.01–7 min 100% B; and 7.01–12 min 55% B. The total analytical run time was 7.5 min for both toxins (Table 1).

Table 1 Retention time and mass spectrometric parameters used in the analysis of the mycotoxins

Mycotoxin	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (V)	TubeLens
DON	2.19	297 $[M + H]$	203Q	17	71
			175C	18	71
			91C	39	71
ZEN	6.55	319 $[M + H]$	283Q	11	79
			187C	25	79
			185C	20	79

Q, quantification transition; C, confirmation transition

LC-MS/MS method validation

The method was validated for brewing barley using the Commission Regulation (2006) guideline. To determine the limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), recovery, repeatability, and selectivity/specificity, samples with non-detectable levels of mycotoxins were analyzed via spiking experiments.

Considering linearity, a six-point calibration curve was constructed with the following concentrations of the mycotoxin standard mixture (DON and ZEN): 0.025, 0.0375, 0.0625, 0.125, 0.375, and 0.500 $\mu\text{g/ml}$.

The LOD and LOQ were determined by fortifying blank samples with different concentration levels, and the experiments were repeated on three different days. The LOD and LOQ are defined as the minimum concentration of an analyte in the spiked sample with a signal noise ratio of 3 and 10, respectively.

Statistical analysis

The obtained data was analyzed by analysis of variance (ANOVA) using the Tukey test. The results are presented as mean \pm standard deviation, and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

This method was effective in the determination of mycotoxins in barley, as displayed by the results of the study. The reported LODs were in the range of 5–10 $\mu\text{g/kg}$, and the LOQs were 25 $\mu\text{g/kg}$ for both toxins (Table 2). The coefficients of correlation (R^2) of the calibration curve were 0.997 and 0.999 for DON and ZEN, respectively, confirming the method linearity. Spiking was performed in triplicate at three different levels in the barley matrix. The experiments were considered adequate with 98.6 and 98% of recovery for DON and ZEA, respectively. Each spiked level was conducted in triplicate to obtain good

Table 2 Characteristics of the method performance for the deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley samples

Analytes	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Linear regression (R^2)	Spiking level (µg/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
DON	5	25	0.997	0.0375	98	6.4
				0.375	99	5.2
				0.500	99	3.3
ZEN	10	25	0.999	0.0375	97	3.0
				0.375	98	2.3
				0.500	99	0.4

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification

precision, and they were performed on the same day and with the same system.

Most of the evaluated samples were contaminated with high levels of both toxins. Ninety-four percent (94%, $n = 72$) of the samples, which were collected from all the analyzed regions, were contaminated with DON. Taking all samples into account, the mean levels of DON ranged from 1700 to 7500 µg/kg. ZEN had a smaller percentage of contamination (73.6%, $n = 56$), with mean levels ranging from 300 to 630 µg/kg (Table 3).

The data was compared with the maximum levels established by the Brazilian regulation (Brasil 2017); DON levels in the 66 samples (83%) were above the established limits. Fifty-four samples (68%) had ZEN content that was higher than expected based on the recognized maximum permitted levels (Brasil 2017).

DON-ZEN co-occurred in a large number of barley grain samples, with concentrations above the maximum levels established by the Brazilian regulation (Table 3), raising concerns about the toxic effects of these mycotoxins, due to human exposure.

Figure 1 shows that the regions 2 and 3 present significantly higher DON levels ($p < 0.05$) than regions 1 and 4. On the other hand, the ZEN contamination showed significant differences only between regions 1 and 4. Region 4 presented samples with the lowest DON and ZEN levels.

Discussion

Brazilian barley samples harvested in 2014 for the brewing industry were previously analyzed by Piacentini et al. (2015), and the results demonstrated contamination levels of DON between 200 and 15,000 µg/kg, which were lower than the 2015 harvest. Indeed, climatologic conditions such as temperature and precipitation increased during the last year, highlighting the importance of monitoring these conditions during plant development (CPTEC 2015; INMET 2015).

In the current study, most of the evaluated samples were contaminated with higher levels of both toxins when compared to those in other studies. Běláková et al. (2014) conducted a research on 325 barley samples collected from various regions in the Czech Republic and recorded the highest levels of DON and ZEN in 2009 (2213 and 59.4 µg/kg, respectively). Co-occurrence of *Fusarium* toxins was also recently evidenced in a study performed by Habler and Rychlik (2016), with mean DON levels ranging from 12 to 279 µg/kg in barley malt samples collected in various German federal states over 3 years (2012 to 2014). The ZEN levels varied between 1.41 and 42.4 µg/kg.

Additionally, DON and ZEN levels found in barley from Lithuania ranged from 100 to 231 µg/kg and from 10 to 41.4 µg/kg, respectively, emphasizing that a 100% of the analyzed samples were contaminated by these mycotoxins

Table 3 Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in brewing barley from four different regions of Brazil

Regions	Mycotoxins										
	DON (µg/kg)					ZEN (µg/kg)					DON-ZEN
	Samples	Range of the positive samples (min-max)	Mean	SD	Median	Samples	Range of the positive samples (min-max)	Mean	SD	Median	
Vacaria	19/19	900–7700	3900	1700	4000	19/19	160–1500	630	380	600	19
Santo Augusto	19/18	4100–15,500	7500	2900	6800	19/17	160–1700	500	370	400	17
Passo Fundo	19/17	2800–11,100	6900	3000	6700	19/13	160–2300	500	550	300	13
Não-me-Toque	19/18	310–3800	1700	1200	1700	19/7	100–1000	350	320	200	7

Co-occurrence was expressed as the number of samples with simultaneous contamination of both mycotoxins

SD standard deviation

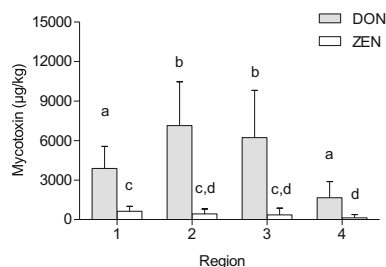


Fig. 1 DON and ZEN contamination of 19 samples for each crop region (total 76 samples). Data expressed as mean \pm SD; the same letter indicates that the mycotoxin contamination are not different significantly according to Tukey test ($p < 0.05$)

(Mankeviciene et al. 2011). In 2013, 34 barley samples from Croatia were analyzed for both toxins, and the mean levels were found to be 342 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for DON and 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for ZEN (Pleadin et al. 2013).

Weather is one of the most important factors affecting the occurrence of *Fusarium* and its toxins. Warm and humid conditions during the flowering season are crucial for the development of some pathogenic species within the genus *Fusarium*, including *F. graminearum*, which is able to cause FHB and produce high levels of trichothecenes and ZEN, compromising the quality of small cereals, such as barley (Xu 2003).

Samples from the current study were sowed in May 2015 and harvested in December 2015. During this period, high precipitation levels were registered (mean = 95 mm), therefore, influencing the air humidity in the studied regions (CPTEC 2015), with maximum values of 70, 97, 84, and 65%, for regions 1, 2, 3, and 4 respectively (INMET 2015). Temperature may also have influenced the occurrence and levels of the studied mycotoxins in barley during this year, as the recorded average was 28 $^{\circ}\text{C}$ for all of the regions, which is considered suitable for *F. graminearum* growth and mycotoxin production.

In addition, it is important to mention that trichothecenes can resist the brewing process and persist in the final product. Studies have shown that the amount of these mycotoxins were even higher in beer than in barley due to mycotoxin carryover from the brewing process (Lancova et al. 2008). This fact raises the hypothesis that high levels of DON could possibly be recovered from Brazilian beer, as these barley samples are destined for the brewing industry.

Modified mycotoxin such as deoxynivalenol-3-glucoside (D3G) can be cleaved in human and animal gastrointestinal tracts in glucose and DON which can increase the DON levels in the samples. They can be formed by plant metabolism (Rychlik et al. 2014); however, it is not detectable using standard approaches. In the study of Habler and Rychlik (2016), DON and its modified metabolite, D3G, were found in barley

malt at frequencies of up to 73 and 53%, respectively. The amount of DON ranged between 31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 10 mg/kg and the amount of D3G between 28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 19 mg/kg. DON and ZEN have derivatives that are also produced by *Fusarium*, such as the acetyl derivatives 3-acetyl-deoxynivalenol (3-Ac-DON) and 15-acetyl-deoxynivalenol (15-Ac-DON) and also glucosides of ZEN, as ZEN-14 Glc (Rychlik et al. 2014). ZEN-14-Glc may be cleaved during digestion and release its active parent compound as demonstrated in pigs (Gareis et al. 1990). These toxins are designated masked mycotoxins and are undetectable by conventional analytical techniques.

Overall, because of the high contamination levels found in brewing barley, it is possible to state that the preventive measures, such as the use of fungicides, resistant cultivars, and crop rotations, were not able to effectively reduce DON and ZEN contamination in barley samples from the south of Brazil. These findings have clearly shown that mitigation efforts are required to reduce the toxin levels to those below the Brazilian and international regulations.

Source of funding The authors thank the Research support foundation of the state of Sao Paulo (FAPESP/Project 2016/01798–4) for the financial support.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None.

References

- Al-Tajer F, Cappozzo J, Zweigenbaum J, Lee HJ, Jackson L, Ryu D (2017) Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Food Control* 72:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.027>
- Běláková S, Benešová K, Čáslavský J, Svoboda Z, Mikulíková R (2014) The occurrence of the selected *Fusarium* mycotoxins in czech malting barley. *Food Control* 37:93–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.033>
- Bergvinson D, García-Lara S (2004) Genetic approaches to reducing losses of stored grain to insects and diseases. *Curr Opin Plant Biol* 7:480–485. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.001>
- Brasil (2014) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 178, de 20 de novembro de 2014. Aprova o zoneamento agrícola para a cultura de cevada de sequeiro no estado do Rio Grande do Sul, ano-safra 2014/2015. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 nov. 2014. Seção 1 Accessed 21 Feb 2018
- Brasil (2017) Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017. In: Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0. Accessed 21 Feb 2018
- CPTEC (2015) Centro de previsão de tempo e estudos climáticos - CPTEC/INPE. <http://www.cptec.inpe.br/>. Accessed 5 Sep 2017


- EFSA (European Food Safety Authority) (2011) Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. EFSA J 9:1–124. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2197>
- European Commission (2006) Commission regulation (EC) no 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Off J Eur Union L70:12–34
- Garcis M, Bauer J, Thiem J, Plank G, Grabley S, Gedek B (1990) Cleavage of zearalenone-glycoside, a “masked” mycotoxin, during digestion in swine. J Vet Med Ser B 37:236–240. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1990.tb01052.x>
- Habler K, Gotthardt M, Schüller J, Rychlik M (2017) Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC–MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. Food Chem 218:447–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.100>
- Habler K, Rychlik M (2016) Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC–MS/MS method for *Fusarium* toxins in cereals. Anal Bioanal Chem 408:307–317. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9110-7>
- Ibáñez-Vea M, González-Peñas E, Lizarraga E, López de Cerain A (2012) Co-occurrence of mycotoxins in Spanish barley: a statistical overview. Food Control 28:295–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.046>
- INMET (2015). Instituto nacional de meteorologia. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - MAPA, Brasil <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Accessed 4 Dec 2017
- IARC (2002) International agency for research on cancer iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Iarc Monogr Eval Carcinog Risks To Humans 96:1–390. <https://doi.org/10.1002/food.19940380335>
- JECFA (2011) Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Safety evaluation of certain contaminants in food - deoxynivalenol (addendum) (pages 317–485). WHO food additives series 63, FAO JECFA MONOGRAPHS 8. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2011. <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=2947>. Accessed 27 Feb 2018
- Kumaraswamy GK, Bollina V, Kushalappa AC, Choo TM, Dion Y, Rioux S, Mamer O, Faubert D (2011) Metabolomics technology to phenotype resistance in barley against *Gibberella zeae*. Eur J Plant Pathol 130:29–43. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9729-3>
- Lancova K, Hajslova J, Poustka J, Krplova A, Zachariasova M, Dostalek P, Sachambula L (2008) Transfer of *Fusarium* mycotoxins and “masked” deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. Food Addit Contam Part A 25:732–744. <https://doi.org/10.1080/02652030701779625>
- Mankeviciene A, Butkutė B, Gaurilickienė I, Dabkevičius Z, Supronienė S (2011) Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. Food Control 22:970–976. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.004>
- Njumbe Ediage E, Van Poucke C, De Saeger S (2015) A multi-analyte LC–MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: the forgotten sample matrix. Food Chem 177:397–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.060>
- O’Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJN, Lysøe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DM (2013) Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. Fungal Genet Biol 52:20–31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.004>
- Pestka JJ, Smolinski AT (2005) Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. J Toxicol Environ Heal Part B 8:39–69. <https://doi.org/10.1080/10937400590889458>
- Piacentini KC, Savi GD, Pereira MEV, Scussel VM (2015) Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.) Food Chem 187:204–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.101>
- Pleadin J, Vahčić N, Peršič N, Ševelj D, Markov K, Frece J (2013) *Fusarium* mycotoxins’ occurrence in cereals harvested from Croatian fields. Food Control 32:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.002>
- Rocha LO, Laurence MH, Proctor RH, McCormick SP, Summerell BA, Liew ECY (2015) Variation in type a trichothecene production and trichothecene biosynthetic genes in *Fusarium goulgardii* from natural ecosystems of Australia. Toxins (Basel) 7:4577–4594. <https://doi.org/10.3390/toxins7114577>
- Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu Rev Phytopathol 28:425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>
- Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N (2014) Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. Mycotoxin Res 30:197–205. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0203-5>
- Takemura H, Shim JY, Sayama K, Tsubura A, Zhu BT, Shimoi K (2007) Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. J Steroid Biochem Mol Biol 103:170–177. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.08.008>
- Tralamazza SM, Bemvenuti RH, Zorzete P, De Souza Garcia F, Corrêa B (2016) Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. Food Chem 196:445–456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.063>
- Varga E, Glauner T, Köppen R, Mayer K, Suljok M, Schuhmacher R, Krska R, Berthiller F (2012) Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC–MS/MS. Anal Bioanal Chem 402:2675–2686. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5757-5>
- Xu X (2003) Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. Eur J Plant Pathol 109:683–689
- Zöllner P, Mayer-Helm B (2006) Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. J Chromatogr A 1136:123–169. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.055>

Apêndice B – Artigo publicado em periódico internacional: Assessment of toxigenic *Fusarium* species and their mycotoxins in brewing barley grains



Article

Assessment of Toxigenic *Fusarium* Species and Their Mycotoxins in Brewing Barley Grains

Karim C. Piacentini ^{1,*}, Liliana O. Rocha ², Geovana D. Savi ³ , Lorena Carnielli-Queiroz ⁴, Livia De Carvalho Fontes ⁴ and Benedito Correa ^{1,4}

¹ Biotechnology Department, University of Sao Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, Sao Paulo 2415, Brazil; correabe@usp.br

² Department of Food Science, Food Engineering Faculty, University of Campinas, Av. Monteiro Lobato, 80, Campinas 13083862, Brazil; l.rocha@unicamp.br

³ Department of Materials Sciences and Engineering, University of the Extreme Southern Santa Catarina, Av. Universitaria, 1105 Criciuma, Santa Catarina 88807-400, Brazil; geovanasavi@gmail.com

⁴ Microbiology Department, University of Sao Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, Sao Paulo 1374, Brazil; carnielli@usp.br (L.C.-Q.); livia.fontes@usp.br (L.D.C.F.)

* Correspondence: karim.piacentini@hotmail.com

Received: 14 November 2018; Accepted: 29 December 2018; Published: 10 January 2019



Abstract: *Fusarium* species threaten yield and quality of cereals worldwide due to their ability to produce mycotoxins and cause plant diseases. Trichothecenes and zearalenone are the most economically significant mycotoxins and are of particular concern in barley, maize and wheat. For this reason, the aim of this study was to characterize the *Fusarium* isolates from brewing barley and to assess deoxynivalenol and zearalenone contamination in grains. Characterization of the *Fusarium* strains was carried out by the phylogeny based on two loci (EF-1 α and RPB2). Mycotoxin detection and quantification were performed by LC-MS. The results show that *Fusarium* was the predominant genus. Phylogenetic study demonstrated that the majority of the strains clustered within the *Fusarium sambucinum* species complex followed by the *Fusarium tricinctum* species complex. The results revealed high incidence of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) contamination (90.6% and 87.5%, respectively). It was observed that 86% of the samples contaminated with ZEA were above the limits set by the EU and Brazilian regulations. These results may highlight the importance of controlling *Fusarium* toxins in barley, mainly because of its use in the brewing industry and the resistance of various mycotoxins to food processing treatments.

Keywords: cereals; mycotoxigenic fungi; phylogeny; deoxynivalenol; zearalenone

Key Contribution: High contamination of deoxynivalenol and zearalenone was found in barley analyzed. Most of the samples contaminated were above to the limits set by the regulations.

1. Introduction

The *Fusarium* genus includes plant pathogens which are of great concern to agricultural production and food/feed safety worldwide [1], threatening yield and quality of cereals and producing mycotoxins, secondary metabolites that are toxic to humans and other animals [2]. *Fusarium* genus is capable of producing several mycotoxins, including fumonisins, trichothecenes and zearalenone. These are the most economically significant *Fusarium* mycotoxins and are of particular concern in barley, maize and wheat [3].

Trichothecenes have been classified into four groups: types A–D, according to their chemical structure [4], the most important in cereals are types A and B [1]. The B-trichothecenes include

the mycotoxins deoxynivalenol (DON), its acetylated derivatives, 3-acetyldeoxynivalenol (3ADON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15ADON) and nivalenol (NIV). DON is the most frequent type-B trichothecene and can be found worldwide. Furthermore, DON inhibits protein synthesis and it has been associated with intoxication of animals through consumption of contaminated feed [5].

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin with estrogenic effects produced by several *Fusarium* species and is usually found in cereal grains. Swine are especially sensitive to the estrogenic effects of ZEA. This toxin has been shown to bind to the estrogenic receptors and to inhibit ovulation. It is, therefore, often involved in hormonal disorders of farm animals and it is also related to hypoestrogenic syndromes in humans [6]. ZEA has been classified into group 3 (non-classifiable due to its carcinogenicity to humans) by IARC (International Agency for Research on Cancer) [7].

During recent years, mycotoxins have attracted international attention not only for their perceived impact on human health but also because of the economic losses accruing from contaminated foods. Considering barley matrix, several international studies have reported on *Fusarium* and its mycotoxins contamination due to the beer gaining increased popularity [8]. The main problem is the characteristics that these compounds have. Some mycotoxins such as trichothecenes, zearalenone and fumonisins are considered stable during the brewing process [9] and can persist to the final product, the beer. Furthermore, *Fusarium* infection causes a negative impact on barley germination rates which results in malting quality and yield reduction. Additionally, this produces gushing and changes in color and flavor of the beer [10].

Barley is considered to have good characteristics for fungi contamination under favorable conditions. In addition, environmental factors associated with barley varieties and agronomic practices influence the *Fusarium* infection and the mycotoxin production. The climate conditions during critical phases of barley plant growth could lead to noticeable difference between the mycotoxin diversity. Tropical conditions, such as those found in Brazil contribute to fungi dissemination and consequently mycotoxin production in barley. For example, 2015 demonstrated a high rainfall average and high levels of humidity, which prompted worse contamination levels found until now [11]. It is necessary to mention that only two *Fusarium* mycotoxins were analyzed. Other fungi mycotoxins should be evaluated along with their masked toxins.

All of the barley harvested in Brazil is destined for the brewing industry and the production continues to increase. Southern Brazil has the largest number of barley-producing regions, therefore, the quality of the grains needs to be monitored and studies about the fungi profile should be taken into account. The knowledge of the current contamination of barley in the region, as well as the constant monitoring, is necessary in order to evaluate if agronomic practices are being duly effective to control the contamination in grain production. The irrigation management, resistant cultivars, harvesting strategies, chemical and biological control and disease forecasting could minimize the loss of grain quality and avoid the disease caused by mycotoxigenic fungi [12].

The current occurrence of mycotoxins in barley could lead to the necessity of developing new strategies or improving those currently in place for more effective management of mycotoxins in the future. This fact is even more relevant when taking into account that the Brazilian regulation for DON in barley will be updated by 2019 [13] and therefore, the information on the occurrence of this toxin is still discussed in the country often.

The regulations have set maximum levels for mycotoxin contamination in grains, in order to avoid further accumulation of mycotoxins in processed food and to control mycotoxin of major concern in unprocessed cereals, such as brewing barley, with 1.250 µg/kg being the maximum permitted for DON and 100 µg/kg for ZEA. From January 2019, DON limits for brewing barley will be set at 1000 µg/kg [13]. Similarly, the limits for DON and ZEA fixed by the European Commission [14] are equal to 1.250 µg/kg and 100 µg/kg for unprocessed cereals.

For the reasons stated above, the aim of the present research was to characterize the *Fusarium* isolates and to assess DON and ZEA contamination in brewing barley grains. These findings provide

new insights into the diversity of *Fusarium* species isolated from Brazilian barley and add information to the mycotoxin profile in a source (raw material) destined for the food industry.

2. Results

2.1. Water Activity and Identification of Isolated Fungi

Water activity levels ranged from 0.579 to 0.667 (mean: 0.622 ± 0.02) for all of the 64 brewing barley samples analyzed. Filamentous fungi were isolated from 96.8% of the samples, highlighting that *Fusarium* was the predominant genus (46%), followed by *Alternaria* (28.8%), *Phoma* (15%), *Epicoccum* (6.2%), *Penicillium* (2%), *Aspergillus* (1.1%) and *Rhizopus* (0.9%). Species belonging to *Fusarium* genus were initially identified through the sequencing of the *EF-1 α* locus. Sequences were submitted to Blast (basic local alignment) tool on NCBI database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

The identification analysis was carried out with 48 *Fusarium* strains and sequencing analysis determined 56.26% of the *Fusarium* species isolated in this study, were within the *Fusarium sambucinum* species complex (FSAMSC), 31.25% within the *Fusarium tricinctum* species complex (FTSC), 8.33% within the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC) and 2% within both, *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) and *Fusarium oxysporum* species complexes (FOSC) (Table 1).

Table 1. Frequency of the members of each *Fusarium* species complex isolated from brewing barley grains.

Species Complex *	Frequency %	<i>Fusarium</i> Species	% Samples Contaminated
FSAMSC	56.25	<i>F. graminearum</i>	23.4
		<i>F. poae</i>	17.2
		<i>F. meridionale</i>	1.6
FTSC	31.25	<i>F. avenaceum</i>	23.4
FFSC	8.33	<i>F. proliferatum</i>	3.1
		<i>F. verticillioides</i>	3.1
FIESC	2	<i>F. incarnatum-equiseti</i>	1.6
FOSC	2	<i>F. oxysporum</i>	1.6

* FSAMSC: *F. sambucinum* species complex, FTSC: *F. tricinctum* species complex, FFSC: *F. fujikuroi* species complex, FIESC: *F. incarnatum-equiseti* species complex, FOSC: *F. oxysporum* species complex.

2.2. Phylogenetic Study

The phylogenetic study was conducted for the species complexes that have the potential to produce trichothecenes and for the closely related species complex *F. tricinctum*. The concatenated loci *EF-1 α* and *RPB2* were used to infer the phylogeny of the species isolated from barley. The data set consisted of 65 taxa, 1292 nucleotides with 452 parsimony-informative characters (PICs) (Figure 1). The analysis resulted in a one most parsimonious tree (CI = 0.69 RI = 0.94). The majority of the isolates clustered within *F. graminearum*, *F. poae* and *F. avenaceum* species complexes with both posterior probability and bootstrap supports (Figure 1).

The method validation and recovery experiments are summarized in Table 2 and Table S2. The reported LODs were set at 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for DON and ZEA, respectively and LOQs 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for both toxins. The coefficients of correlation (R^2) of the calibration curve were 0.997 and 0.999 for DON and ZEA, respectively. Spiking was performed in triplicates at three levels in the barley matrix. In addition, the spiking experiments for the *F. graminearum* strains grown in culture media were carried out at two levels.

The method is suitable for the determination of mycotoxins in barley as the given LOQ's are lower than the maximum limit set by the Brazilian and EU regulations for the content of DON and ZEA. The parameter linearity, reproducibility, repeatability and recovery obtained were also shown to be adequate.

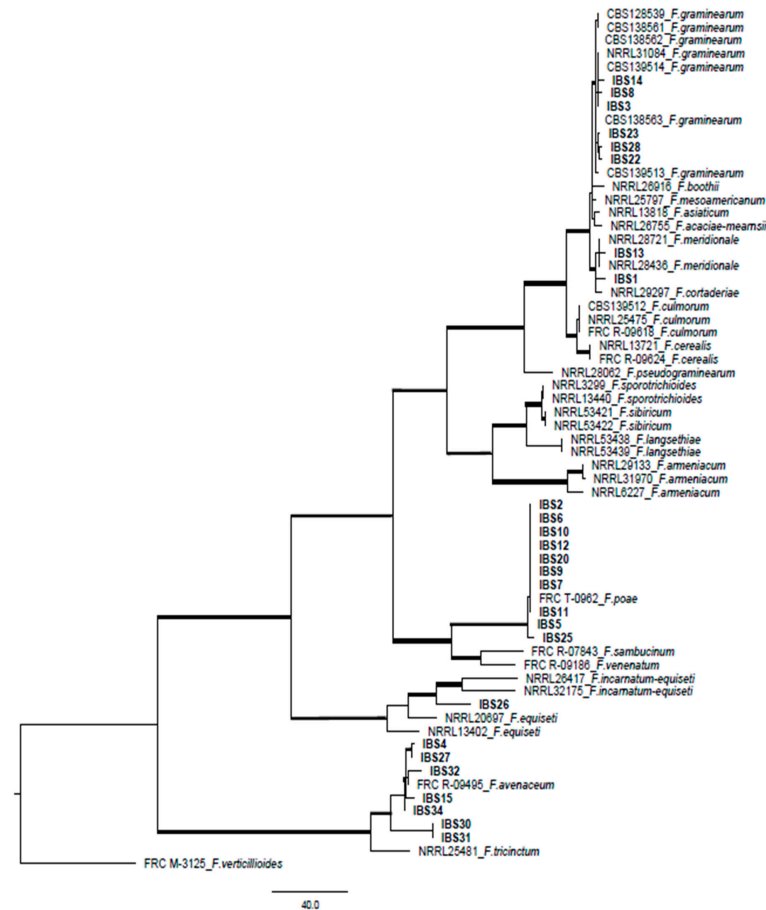


Figure 1. LC-MS/MS method performance.

2.3. Mycotoxins Analysis

The analysis carried out in the present research revealed the occurrence of the two mycotoxins most commonly found in barley. Grain samples that presented levels above the LOQ were considered positive. Mean calculations were performed using Microsoft® Excel 2007 only including positive samples. Deoxynivalenol showed the highest incidence (90.6%) with levels ranging from 45.95 to 1155.21 µg/kg. ZEA also had a high occurrence (87.5%) with values ranging from 82.41 to 423.71 µg/kg. Regarding the Brazilian regulation for DON, only one sample was above the established maximum levels (1000 µg/kg). Nevertheless, for ZEA, 55 samples (86%) were above the regulation (100 µg/kg) (Table 2).

Additionally, the mycotoxin production from toxigenic potential *F. graminearum* strains was observed. The frequency of the DON strain producers was 80% (12 strains) and only 20% (3 strains) for ZEA. The levels ranged from 123.03 to 592.61 µg/kg and 33.64 to 140.58 µg/kg, respectively.

Table 2. DON and ZEA contamination in barley grains.

	Number Samples	Deoxynivalenol			Zearalenone				
		Positive Samples/% *	Range of Positive Samples (µg/kg)	Mean ± SD (µg/kg)	Median (µg/kg)	Positive Samples/% *	Range of Positive Samples (µg/kg)	Mean ± SD (µg/kg)	Median (µg/kg)
Barley grains	64	58/90.6	45.95–1155.21	147.65 ± 167.16	98.68	56/87.5	82.41–423.71	123.24 ± 45.29	119.26

* > LOQ of 25 µg/kg.

3. Discussion

This study has shown that the majority of the *Fusarium* species isolated from brewing barley grains belonged to the FSAMSC, whereas the main trichothecene producing species are clustered. Mycotoxins analysis demonstrated that most of the samples were contaminated with DON (90.6%) and ZEA (87.5%), highlighting the importance of this investigation.

Fusarium species are found in cereal grains, such as barley, wheat, maize and rice worldwide, where mycotoxins can be found in high concentrations [15–18]. This fact, may be worsened by weather conditions, such as high humidity and temperatures that tend to increase *Fusarium* infection in plants [19,20]. Humidity is an important environmental factor and it influences the water activity of the grains. This intrinsic factor is important for fungal growth and has considerable association with mycotoxin production [21].

Generally, *Fusarium* development as well as DON and ZEA production can be seen with higher levels of water activity (0.90) [22]. Nevertheless, the current research showed a low variation of the water activity that was observed among the 64 brewing barley samples, with mean value of 0.622 ± 0.02 . In this case, both the germination of fungal spores and the growth of storage fungi are inhibited. However, the grain analyses were carried out after the cleaning and drying stages, explaining the levels found. For safe storage of grain, the grain moisture content must be compatible with the period of time the grain will be stored in order to avoid the fungi growth and therefore, the water activity should be less. To associate *Fusarium* mycotoxins found in this study it is necessary to assume that the DON and ZEA production could be correlated to the fungi presence and high water activity in the growing plant stages. This fact could be explained in our recent study with rice grains, where the levels of ZEA found are associated with the presence of *Fusarium* during pre-harvest, in grains freshly harvested with high levels of moisture content and water activity. After the food processing steps were completed in the industry, there was not any *Fusarium* growth in the grains, however, the ZEA levels remained in the parboiled rice (water activity: 0.64 ± 0.02), resisting the degradation [23].

The phylogenetic study showed that the majority of the strains clustered with *F. graminearum*, *F. poae* and *F. avenaceum*. *Fusarium poae* can produce high levels of nivalenol; therefore, further analyses should be done to investigate the degree of nivalenol contamination in Brazilian barley. Previous studies carried out by [24] in Russia and [25] in Italy have shown a high incidence of *F. avenaceum* in barley as well as other *Fusarium* species. [26] observed a high incidence of *F. avenaceum*, *F. graminearum* and *F. culmorum* in Finnish barley grains between the years of 2005–14, with high levels of trichothecene contamination. The presence of *F. avenaceum* in barley may indicate the presence of enniatins, moniliformin and beauvericin in the samples. In Brazil, another study in barley has demonstrated that the majority of the isolates belonged to the *F. graminearum* lineage; however, mycotoxin analysis was not performed in that study [27]. To our knowledge, this is the first report of phylogenetic identification of the *Fusarium* species in Brazilian barley and the first correlation with DON and ZEA contamination.

With respect to DON contamination, the current study showed similarities with those found in a survey carried out in Spain with a mean level of $119.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ [28]. In addition, the highest results were obtained by [25] reporting incidence and a maximum contamination level of $108.7 \mu\text{g}/\text{kg}$. Also, [29] in Italy, a study reported lower incidence and concentrations of DON with a maximum level of $35.5 \mu\text{g}/\text{kg}$; and [30] in Tunisia evaluated its presence with a maximum level of $6.1 \mu\text{g}/\text{kg}$. In the current study, only one sample presented a high level of DON ($1155.21 \mu\text{g}/\text{kg}$) and was above the established maximum level set by the Brazilian regulation. The samples showed mean values of $147.65 \mu\text{g}/\text{kg}$ and median values of $98.68 \mu\text{g}/\text{kg}$ that also demonstrated low levels.

In contrast, the ZEA contamination found in the present study were of significance, considering the maximum levels established by the Brazilian and international regulation, where 86% of the samples were above [13,31]. The samples showed mean values of $123.24 \mu\text{g}/\text{kg}$ and median values of $119.26 \mu\text{g}/\text{kg}$. In a study performed by [32] in the Czech Republic, a few samples were contaminated

with ZEA with values ranging from 181.2 to 204.4 µg/kg, which is quite similar to the results of our study. Furthermore, high levels (max 985.9 µg/kg) of ZEA were found in another survey carried out in the Czech Republic with samples from the 2011 crop [33].

Two other studies were conducted in Brazil by the current author and can be compared to this study. The first one was from the 2014 crop and low levels of DON were found ranging from 200 µg/kg to 15,000 µg/kg [34]. The other one was from the 2015 crop and higher levels were found for both toxins, DON and ZEA. The last study was considered an issue for the industry due to the levels exceeding the regulation levels established. The mean levels ranged from 1700 to 7500 µg/kg and from 300 to 630 µg/kg for DON and ZEA, respectively.

It is necessary to mention that not only the large-scale brewing industry is increasing but that the craft breweries in Brazil are expanding. These small brewing groups always look for the best sources and have the characteristic of “German beer purity law,” meaning that just barley is used for beer production. For these reasons, barley needs to be of higher quality. On the other hand, the large-scale industry in Brazil uses other grains such as corn, rice and sorghum for beer production which are considered low quality grains [35]. Some studies were carried out and they showed contamination with fumonisin B₁ [36] that is commonly found in corn and its derivatives [37].

In the last years the stability of these metabolites has been studied. Deoxynivalenol showed to be a mycotoxin that persists through the process and demonstrated stability in some industry processes, such as cleaning, milling, brewing and extrusion [9]. Zearalenone has had some studies published about it which showed lower stability. However, its levels are high when they are found. A research conducted by [38] showed a considerable reduction of ZEA levels in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The main point is even if there is a significant reduction of these metabolites, sometimes they still offer a risk, especially when in beer, which is considered one of the most consumed beverages in the world.

Another aspect that should be taken into account is the masked toxins. ZEN-14-sulfate and DON-3-glucoside are most commonly observed in grains. They could be present in the matrix, however masked toxins are either bound to carbohydrates or proteins and, therefore, are not extractable with existing protocols aimed at the extraction of the toxin, or they are not detectable using established chromatography routines; hence their name “masked” mycotoxins [39]. Further studies are being planned to gain more knowledge on these metabolites in barley and also in beer.

The *Fusarium* mycotoxins found in barley grains and the toxigenic potential analysis of the *F. graminearum* strains isolated in this study reinforce the importance of these genera in this relevant commodity. Furthermore, the identification of *F. poae*, *F. avenaceum* and the genus *Alternaria* in barley samples highlights the importance of further research on other mycotoxins in barley and its by-products. *Alternaria* species were recovered from 28% of the barley samples. This may have important implications on other mycotoxins that may be found in high concentrations, such as tenuazonic acid. Further studies should be conducted in order to evaluate the co-occurrence of the mycotoxins produced by this genus [25,40].

In this study, the toxigenic potential of the *F. graminearum* strains isolated in the brewing barley was evaluated and both toxins detected in the samples were produced by them. In total, 80% and 20% of the strains produced DON (mean: 297.02 µg/kg and median: 268.74 µg/kg) and ZEA (mean: 79.7 µg/kg and median: 64.86 µg/kg), respectively. The toxins levels found were lower when compared to that of a study performed by Wu et al. (2017), in which the strains exhibited a production of 1405.05 µg/kg for DON and 4118.31 µg/kg for ZEA. The parameter temperature is crucial for DON production and some studies showed a variation of the optimal value, that varies between 20 and 28 °C [19,20,41]. On the other hand, temperature negatively affected ZEA production. The optimized condition for ZEA production was cultivation at 15 °C [41]. The toxin combination can be related to several mycotoxigenic fungi that contaminate barley in the field. However, the mycotoxin occurrence in Brazilian barley suggests high prevalence of toxigenic *F. graminearum* and related species, which could explain the DON and ZEA levels in almost 85% of the samples.

4. Conclusions

The DON and ZEA contamination in brewing barley grains were detected in 90.6% and 87.5% of the samples. The phylogenetic study showed that the majority of the strains clustered with *F. graminearum*, *F. poae* and *F. avenaceum*. Toxigenic species of *F. graminearum* isolates presented a higher percentage in the samples (31.25%) and can explain the DON and ZEA contamination found in the barley samples. Taking into account the Brazilian regulation of ZEA levels in barley, 86% of the samples were significantly higher than the current maximum limit, while for DON, only one sample was above the established maximum levels. The Brazilian regulation for mycotoxins will be updated by 2019 and therefore, the new maximum limits are still under discussion, based on the analysis of the largest amount of data available of the occurrence of mycotoxins in the grains produced in Brazil. This monitoring data of the toxigenic *Fusarium* and its mycotoxins could lead to greater knowledge of the current situation of the barley contamination in the industry, which can assist Brazilian regulation and the programming of management strategies in order to avoid the toxic effects on human and animal health.

Fungal infection and the presence of mycotoxins in cereals is natural and the prevention of these occurrences is difficult even if good agricultural practices are maintained. The data provided in this study was important for the knowledge on *Fusarium* diversity and toxin contamination. Furthermore, the results highlight the importance of monitoring DON and ZEA contamination in barley grains during pre, post-harvest and in processed food, such as beer, mainly for the development of management strategies. Consequently, serious economic losses and health problems could potentially be avoided.

5. Materials and Methods

5.1. Barley Samples

A total of 64 brewing barley (BRS Brau variety) samples were obtained from the 2016 harvest, from the States of Paraná and Rio Grande do Sul, the largest barley-producing regions in Brazil. Samples were collected from bulk batches, after dirt removal and drying (up to 60 °C) in the storage units. Sampling was performed using a grain auger from different points of the bulk batches, with a minimum final weight of 5 kg. Each sample was homogenized, reduced into portions of 1.0 kg to be representative of the overall sample and further was milled for each analysis. Samples were packed in polyethylene bags and stored at 4 °C and different amounts were used for mycobiota and mycotoxin analyses.

5.2. Water Activity

To perform water activity (aw) analysis, 2 g of each barley sample were submitted to Aqua-Lab 4TE equipment Aqua-Lab 4TE, Decagon Devices (Sao Jose dos Campos, SP, Brazil). Samples were analyzed in triplicate according to the Association of Official Analytical Chemists—[42].

5.3. Mycobiota and Identification of Fungi

The dilution technique was used for fungal isolation, as described by [43]. To summarize briefly, twenty-five grams of each sample were added to 225 mL of 0.1% peptone dissolved in water in sterile conditions. The mixture was stirred on a rotary shaker for 2 min., dilutions of 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} were obtained, 0.1 mL aliquots of each dilution were spread on the PDA medium [9,10] containing chloramphenicol (100 mg/L) (in duplicate). These were incubated for 5 days, at 25 °C in the dark. The results were expressed into colony forming units per gram (CFU/g) in the dilution 10^{-1} , as the colonies were easily distinguished in this dilution factor. The isolates were identified morphologically according to Pitt and Hocking, (2009).

5.4. Identification of the *Fusarium* Species

The strains were grown in yeast extract sucrose (YES) agar [44] for 3 days at 25 °C. The DNA was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The partial sequences of elongation factor (*EF-1 α*) and the second fragment of *RPB2* (*7CF/11AR*) were selected in order to identify the *Fusarium* isolates. The amplification of the *EF-1 α* and *RPB2* loci were performed according to [45,46]. Amplicons were purified with ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and sent to the Centre of Human Genome Studies, University of Sao Paulo, Brazil for sequencing in ABI PRISM 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sequences were aligned using the multiple alignment software ClustalX v. 1.83 plug-in in the software Geneious v. 5.3.6 (Biomatters, Auckland, New Zealand). The alignments were edited using the sequence alignment-editing program Geneious v. 1.83 and each polymorphism was re-examined by checking the chromatograms. The sequences generated in this study were deposited in the GenBank (Table 1 and Table S1).

5.5. Phylogenetic Analysis

Phylogenetic analysis was performed based on the *EF-1 α* and *RPB2* combined datasets using the PAUP 4.0b10 (Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA) [47]. Phylogenies were obtained by using Unweighted Parsimony analysis and heuristic search option with 1000 random addition sequences and tree bisection reconnection branch swapping in PAUP 4.0b10 [48]. Gaps were treated as missing data. The Consistency Index (CI) and the Retention Index (RI) were calculated to indicate the amount of homoplasy present. Clade stability was assessed via bootstrap analysis in PAUP 4.0b10, using 1000 heuristic search replications with random sequence addition. The data sets were rooted with *Fusarium* sp. as it is considered a suitable out-group [49]. The reference sequences for the *Fusarium* species used in this study were obtained from NCBI (Table S1).

5.6. Mycotoxin Analysis

5.6.1. Chemicals and Reagents

Both standards (DON and ZEA) were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Stock solution standards were prepared in methanol at concentrations of 1 mg/mL for DON and ZEA. From the individual stock standard solutions, a standard mixture was prepared at the following concentrations: 0.025, 0.0375, 0.0625, 0.125, 0.375, 0.500 μ g/mL. The standard mixture was prepared in methanol and stored at -18 °C. Methanol and acetonitrile (LC-MS/MS grade) were supplied by J.T Baker (Sao Paulo, SP, Brazil). Acetic acid was obtained from Biotec (Pinhais, PR, Brazil). High-purity Milli-Q water (18.2 M Ω /cm) was obtained from the Millipore Synergy system (Billerica, MA, USA).

5.6.2. DON and ZEA Extraction

Mycotoxin extraction was carried out according to [50], with some minor modifications. Briefly, 2 g of brewing barley were ground and homogenized in 8 mL of acetonitrile:water (80:20 *v/v*) and shaken for 60 min. The mixture was then centrifuged for 10 min at 3500 rpm. The supernatant was transferred to an amber vessel and dried using a heating block and a nitrogen stream. The dried extract was resuspended in 500 μ L of a mobile phase consisted of 70% of water:methanol:acetic acid (94:5:1, *v/v/v*) and 30% of water:methanol:acetic acid (2:97:1, *v/v/v*). Finally, 5 μ L was injected in the LC-MS/MS system for analysis.

5.7. Production of DON and ZEA by the Strains

The isolates of *F. graminearum* were grown onto PDA (three agar plugs, 6 mm in diameter) and tested for DON and ZEA production. The culture media was incubated at 24 °C and 15 °C with a

moisture content of 90% and 80% for 20 days for DON and ZEA, respectively [51,52]. The mycelium was transferred into an Erlenmeyer flask containing 30 mL of chloroform and shaken for 60 min for mycotoxin extraction, followed by filtration through anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4). The extract was dried and re-suspended with 500 μL of mobile phase. Finally, the extract was filtered with a syringe filter (nylon membrane 0.22 μM). The sample was quantified by liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) for DON/ZEA.

5.8. Chromatography Conditions

Detection and quantification were carried out using an LC-MS system from Thermo Scientific® (Bremen, Germany) composed of an ACCELA 600 quaternary pump, an ACCELAAS auto-sampler and a triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Max.

The chromatographic conditions were performed according to [53]. In short, the following instrumental settings were applied: the triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Max was operated at positive polarity and the ionization conditions were 208 °C for capillary temperature, 338 °C for vaporizer temperature, 4500 V for spray voltage and 60 arbitrary units for sheath gas pressure. For selectivity, the mass spectrometer was operated at MRM mode monitoring, three transitions per analyte, using a collision gas pressure of 1.7 mTorr and collision energy (CE) ranging from 11 to 40 eV.

The mass spectrometric conditions were optimized by re-tuning different analytes by direct infusion of each analyte individually. The tube lens potential, collision energies and product ions were optimized and carefully chosen. The most abundant mass-to-charge ratio (m/z) was selected for each compound of interest. The mycotoxins exhibited precursor ions and product ions with reasonably high signal intensities in positive ESI mode (ESI+) and protonated molecules [M + H] were found. Table S2 shows the retention times (tR), MRM transitions as well as the tube lens potential and collision energies optimized for each compound.

Separation was performed on a C8 Luna column, with a particle size of 3 μm , 150 \times 2.0 mm, length and diameter, respectively, Phenomenex (Torrance, CA, USA). In the mobile phase, solvent A (water:methanol:acetic acid, 94:5:1, $v/v/v$) and solvent B (water:methanol:acetic acid, 2:97:1, $v/v/v$) were used. The gradient program was applied at a flow rate of 0.2 mL/min under the following conditions: 0–1 min 55% B; 1–3 min 55–100% B; 3.01–7 min 100% B and 7.01–12 min 55% B. The total analytical run time was 7.5 min for the 2 toxins (Table 3).

Table 3. Retention time and mass spectrometric parameters used in the analysis of the mycotoxins.

Mycotoxin	Retention Time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) *	CE (V)	TubeLens
DON	2.19	297 [M + H]	203Q	17	71
			175C	18	71
			91C	39	71
ZEA	6.55	319 [M + H]	283Q	11	79
			187C	25	79
			185C	20	79

* Q, Quantification transition C, Confirmation transition.

Method Validation

The methods for extraction of mycotoxins in brewing barley and in culture media with *Fusarium* growth were validated according to the Commission Regulation [54] guideline. To determine the limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), recovery, repeatability and selectivity/specificity, samples with non-detectable levels of mycotoxins were submitted to spiking experiments.

Considering linearity, a six-point calibration curve was constructed with the following concentrations of the mycotoxin standard mixture (DON and ZEN): 0.025, 0.0375, 0.0625, 0.125, 0.375, 0.500 µg/mL. The LOD and LOQ methods were determined by fortifying blank samples with different concentration levels and the experiments were repeated on three different days. The LOD was defined as the minimum concentration of an analyte in the spiked sample with a signal noise ratio equal to 3 and LOQ with a signal noise ratio equal to 10.

5.9. Data Analysis

Results regarding DON and ZEA in brewing barley samples and *F. graminearum* strains were reported as the mean ± standard deviation and median, using Microsoft office Excel 2007.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6651/11/1/31/s1>, Table S1: Fusarium species references used in this study for phylogenetic analysis, Table S2: Characteristics of the method performance for extraction of deoxynivalenol and zearalenone in barley grains and culture media.

Author Contributions: The authors' responsibilities were as follows—K.C.P. and L.O.R. designed the research; K.C.P., L.D.C.F. and L.C.-Q.: conducted the research; G.D.S.: guided and performed the statistical analysis; B.C.: Oversight and leadership responsibility for the research activity planning and execution, K.C.P. wrote the manuscript and hold primary responsibility for the final content; and all authors: read and approved the final manuscript.

Funding: The authors thank to the Research support foundation of the state of Sao Paulo (FAPESP/Project 2016/01798-4) for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Desjardins, A.E. Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. *Plant Pathol.* **2007**, *56*, 337. [[CrossRef](#)]
- Ma, L.-J.; Geiser, D.M.; Proctor, R.H.; Rooney, A.P.; O'Donnell, K.; Trail, F.; Gardiner, D.M.; Manners, J.M.; Kazan, K. Fusarium pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67*, 399–416. [[CrossRef](#)]
- FAO. *FAO Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture*; FAO: Rome, Italy, 2013; ISBN 9789251073964.
- WHO. *International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental Health Criteria 105 Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. Trichothecenes*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1990; pp. 71–164.
- Pestka, J.J. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 663–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zinedine, A.; Soriano, J.M.; Moltó, J.C.; Mañes, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; International Agency for Research on Cancer: Lyon CEDEX, France, 2002; Volume 96. [[CrossRef](#)]
- Pascari, X.; Ramos, A.J.; Marin, S.; Sanchis, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Res. Int.* **2018**, *103*, 121–129. [[CrossRef](#)]
- Bullerman, L.B.; Bianchini, A. Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 140–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Piacentini, K.C.; Savi, G.D.; Olivo, G.; Scussel, V.M. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control* **2015**, *50*, 925–929. [[CrossRef](#)]
- Piacentini, K.C.; Rocha, L.O.; Savi, G.D.; Carnielli-Queiroz, L.; Almeida, F.G.; Minella, E.; Corrêa, B. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil. *Mycotoxin Res.* **2018**. [[CrossRef](#)]
- Wegulo, S.N.; Baenziger, P.S.; Hernandez Nopsa, J.; Bockus, W.W.; Hallen-Adams, H. Management of Fusarium head blight of wheat and barley. *Crop Prot.* **2015**, *73*, 100–107. [[CrossRef](#)]

13. *Brasil Limites Máximos Tolerados (LMT) Para Micotoxinas*; Agência Nacional Vigilância Sanitária: ANVISA, Brazil, 2017.
14. European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L364*, 5–24.
15. Karlsson, I.; Friberg, H.; Kolseth, A.K.; Steinberg, C.; Persson, P. Agricultural factors affecting Fusarium communities in wheat kernels. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *252*, 53–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hofer, K.; Geißinger, C.; König, C.; Gastl, M.; Hüchelhoven, R.; Heß, M.; Coleman, A.D. Influence of Fusarium isolates on the expression of barley genes related to plant defense and malting quality. *J. Cereal Sci.* **2016**, *69*, 17–24. [[CrossRef](#)]
17. Silva, J.J.; Viaro, H.P.; Ferranti, L.S.; Oliveira, A.L.M.; Ferreira, J.M.; Ruas, C.F.; Ono, E.Y.S.; Fungaro, M.H.P. Genetic structure of Fusarium verticillioides populations and occurrence of fumonisins in maize grown in Southern Brazil. *Crop Prot.* **2017**, *99*, 160–167. [[CrossRef](#)]
18. Choi, S.; Jun, H.; Bang, J.; Chung, S.H.; Kim, Y.; Kim, B.S.; Kim, H.; Beuchat, L.R.; Ryu, J.H. Behaviour of *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* on rice as affected by degree of milling, temperature, and relative humidity during storage. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 307–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Garcia, D.; Barros, G.; Chulze, S.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S. Impact of cycling temperatures on Fusarium verticillioides and Fusarium graminearum growth and mycotoxins production in soybean. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 2952–2959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Llorens, A.; Mateo, R.; Hinojo, M.J.; Valle-Algarra, F.M.; Jiménez, M. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 43–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Fleurat-Lessard, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins—An update. *J. Stored Prod. Res.* **2017**, *71*, 22–40. [[CrossRef](#)]
22. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; ISBN 9780387922065.
23. Savi, G.D.; Piacentini, K.C.; Rocha, L.O.; Carnielli-Queiroz, L.; Furtado, B.G.; Scussel, R.; Zandoni, E.T.; Machado-de-Ávila, R.A.; Corrêa, B.; Angioletto, E. Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *270*. [[CrossRef](#)]
24. Stakheev, A.A.; Khairulina, D.R.; Zavriev, S.K. Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *225*, 27–37. [[CrossRef](#)]
25. 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. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4390–4399. [[CrossRef](#)]
26. Hietaniemi, V.; Rämö, S.; Yli-Mattila, T.; Jestoi, M.; Peltonen, S.; Kartio, M.; Sieviläinen, E.; Koivisto, T.; Parikka, P. Updated survey of Fusarium species and toxins in Finnish cereal grains. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2016**, *33*, 831–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Astolfi, P.; dos Santos, J.; Schneider, L.; Gomes, L.B.; Silva, C.N.; Tessmann, D.J.; Del Ponte, E.M. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *148*, 197–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ibáñez-Vea, M.; González-Peñas, E.; Lizarraga, E.; López de Cerain, A. Co-occurrence of mycotoxins in Spanish barley: A statistical overview. *Food Control* **2012**, *28*, 295–298. [[CrossRef](#)]
29. Juan, C.; Ritieni, A.; Mañes, J. Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chem.* **2013**, *141*, 1747–1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Juan, C.; Berrada, H.; Maes, J.; Oueslati, S. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *103*, 148–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. 401/2006/EC Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L70*, 12–34.

32. Bolechová, M.; Benešová, K.; Běláková, S.; Čáslavský, J.; Pospíchalová, M.; Mikulíková, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control* **2015**, *47*, 108–113. [[CrossRef](#)]
33. Běláková, S.; Benešová, K.; Čáslavský, J.; Svoboda, Z.; Mikulíková, R. The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in czech malting barley. *Food Control* **2014**, *37*, 93–98. [[CrossRef](#)]
34. Piacentini, K.C.; Savi, G.D.; Pereira, M.E.V.; Scussel, V.M. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chem.* **2015**, *187*. [[CrossRef](#)]
35. Poreda, A.; Czarnik, A.; Zdaniewicz, M.; Jakubowski, M.; Antkiewicz, P. Corn grist adjunct—Application and influence on the brewing process and beer quality. *J. Inst. Brew.* **2014**, *120*, 77–81. [[CrossRef](#)]
36. Piacentini, K.C.; Rocha, L.O.; Fontes, L.C.; Carnielli, L.; Reis, T.A.; Corrêa, B. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. *Food Chem.* **2017**, *218*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Oliveira, M.S.; Rocha, A.; Sulyok, M.; Krska, R.; Mallmann, C.A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control* **2016**, 1–6. [[CrossRef](#)]
38. Zhang, H.; Dong, M.; Yang, Q.; Apaliya, M.T.; Li, J.; Zhang, X. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: Possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. *J. Proteom.* **2016**, *143*, 416–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gareis, M.; Bauer, J.; Thiem, J.; Plank, G.; Grabley, S.; Gedek, B. Cleavage of Zearalenone-Glycoside, a “Masked” Mycotoxin, during Digestion in Swine. *J. Vet. Med. Ser. B* **1990**, *37*, 236–240. [[CrossRef](#)]
40. Efsa Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J.* **2011**, *9*, 97. [[CrossRef](#)]
41. Wu, L.; Qiu, L.; Zhang, H.; Sun, J.; Hu, X.; Wang, B. Optimization for the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* using response surface methodology. *Toxins (Basel)* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC: Rockville, MD, USA, 2005; ISBN 0935584544.
43. Silva, N.D.; Junqueira, V.C.; Silveira, N.F.; Taniwaki, M.; Santos, R.F.; Gomes, R.A. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*, 4th ed.; Português: Sao Paulo, Barzil, 2010.
44. Degola, F.; Berni, E.; Dall’Asta, C.; Spotti, E.; Marchelli, R.; Ferrero, I.; Restivo, F.M. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *203*, 409–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Geiser, D.M.; Jiménez-Gasco, M.D.M.; Kang, S.; Makalowska, I.; Veeraraghavan, N.; Ward, T.J.; Zhang, N.; Kuldau, G.A.; O’Donnell, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2004**, *110*, 473–479. [[CrossRef](#)]
46. O’Donnell, K.; Ward, T.J.; Geiser, D.M.; Kistler, H.C.; Aoki, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* **2004**, *41*, 600–623. [[CrossRef](#)]
47. Swofford, D.L. PAUP* phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. *Sinauer Assoc.* **2002**. [[CrossRef](#)]
48. Swofford, D.L. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. *Options* **2002**, *42*, 294–307. [[CrossRef](#)]
49. O’Donnell, K.; Rooney, A.P.; Proctor, R.H.; Brown, D.W.; McCormick, S.P.; Ward, T.J.; Frandsen, R.J.N.; Lysoe, E.; Rehner, S.A.; Aoki, T.; et al. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet. Biol.* **2013**, *52*, 20–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Al-Taher, F.; Cappozzo, J.; Zweigenbaum, J.; Lee, H.J.; Jackson, L.; Ryu, D. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Food Control* **2017**, *72*, 27–35. [[CrossRef](#)]
51. Savi, G.D.; Vitorino, V.; Bortoluzzi, A.J.; Scussel, V.M. Effect of zinc compounds on *Fusarium verticillioides* growth, hyphae alterations, conidia, and fumonisin production. *J. Sci. Food Agric.* **2013**, *93*, 3395–3402. [[CrossRef](#)]
52. Savi, G.D.; Bortoluzzi, A.J.; Scussel, V.M. Antifungal properties of Zinc-compounds against toxigenic fungi and mycotoxin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 1834–1840. [[CrossRef](#)]

53. Njumbe Ediage, E.; Van Poucke, C.; De Saeger, S. A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties: The forgotten sample matrix. *Food Chem.* **2015**, *177*, 397–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. EC Commission regulation (EC) 401/2006 of 23 february 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Communities* **2000**, *L269*, 1–15.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials: Assessment of toxigenic *Fusarium* species and their mycotoxins in brewing barley grains

Karim C. Piacentini, Liliana O. Rocha, Geovana D. Savi, Lorena Carnielli-Queiroz, Livia De Carvalho Fontes and Benedito Correa

Table S1. *Fusarium* species references used in this study for phylogenetic analysis.

Accessionnumber	<i>Fusarium</i> species	NCBI accessionnumber	
		EF-1 α	RPB2
NRRL26755	<i>F.acaciae-mearnsii</i>	AF212449	KM361658
NRRL29133	<i>F.armeniicum</i>	HM744659	HQ154448
NRRL31970	<i>F.armeniicum</i>	HM744664	HQ154453
NRRL6227	<i>F.armeniicum</i>	HM744692	HQ154480
NRRL13818	<i>F.asiaticum</i>	AF212451.1	JX171573.1
FRC R-09495	<i>F.avenaceum</i>	GQ915502	GQ915486
NRRL26916	<i>F. boothii</i>	GQ915503.1	GQ915487
FRC R-09624	<i>F.cerealis</i>	GQ915505	GQ915489
NRRL13721	<i>F.cerealis</i>	AF212464	KM361656
NRRL29297	<i>F.cortaderiae</i>	AY225885.1	KM361662.1
CBS139512	<i>F.culmorum</i>	KT855186	KT855212
FRC R-09618	<i>F.culmorum</i>	GQ915506	GQ915490.1
NRRL25475	<i>F.culmorum</i>	AF212463	JX171628
NRRL13402	<i>F.equiseti</i>	JX171566.1	GQ505592.1
NRRL20697	<i>F.equiseti</i>	JX171595.1	GQ505594.1
CBS128539	<i>F.graminearum</i>	KT855182	KT855208
CBS138561	<i>F.graminearum</i>	KT855183	KT855209
CBS138562	<i>F.graminearum</i>	KT855184	KT855210
CBS138563	<i>F.graminearum</i>	KT855185	KT855211
CBS139513	<i>F.graminearum</i>	KT855187	KT855213
CBS139514	<i>F.graminearum</i>	KT855188	KT855214
NRRL31084	<i>F.graminearum</i>	HM744693	HQ154481
NRRL26417	<i>F.incarnatum-equiseti</i>	GQ505598	JX171635
NRRL32175	<i>F.incarnatum-equiseti</i>	GQ505609	JX171645
NRRL53438	<i>F.langsethiae</i>	HM744690	HQ154478
NRRL53439	<i>F.langsethiae</i>	HM744691	HQ154479
NRRL28436	<i>F.meridionale</i>	AF212435	KM361660
NRRL25797	<i>F.mesoamericanum</i>	AF212441	KM361657
FRC T-0962	<i>F.poa</i>	GQ915511	GQ915495
NRRL28062	<i>F.pseudograminearum</i>	AF212468	JX171637
FRC R-07843	<i>F.sambucinum</i>	GQ915512	GQ915496
NRRL53421	<i>F.sibiricum</i>	HM744675	HQ154463
NRRL53422	<i>F.sibiricum</i>	HM744676	HQ154464
NRRL54149*	<i>Fusarium</i> sp.	HM068337	HM068359
NRRL13440	<i>F.sporotrichioides</i>	HM744650	HQ154439
NRRL3299	<i>F.sporotrichioides</i>	HM744665	HQ154454
NRRL25481	<i>F.tricinctum</i>	HM068307	JX171629
FRC R-09186	<i>F.venenatum</i>	GQ915515	GQ915499

^a *Fusarium* sp. NRRL54149: currently described as *Fusarium torreyae* (O'Donnell et al., 2013).

Table S2. Characteristics of the method performance for extraction of deoxynivalenol and zearalenone in barley grains and culture media.

Analytes	Matrix	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linear regression (R^2)	Spiking level ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Recovery (%)	RSD (%)
DON	Barley grains	5	25	0.997	0.0375	98	6.4
					0.375	99	5.2
	Fungi strains	5	25		0.500	99	3.3
					0.025	98	5.7
ZEA	Barley grains	10	25	0.999	0.125	99	2.9
					0.0375	97	3.0
	Fungi strains	10	25		0.375	98	2.3
					0.500	99	0.4
					0.025	102	2.1
					0.125	98	1.5

Apêndice C– Artigo publicado em periódico internacional: *Fusarium* mycotoxins stability during the malting and brewing processes



Article

Fusarium Mycotoxins Stability during the Malting and Brewing Processes

Karim C. Piacentini ^{1,*}, Sylvie Běláková ², Karolína Benešová ², Marek Pernica ², Geovana D. Savi ³, Liliana O. Rocha ⁴, Ivo Hartman ², Josef Čáslavský ⁵ and Benedito Corrêa ¹

- ¹ Biotechnology Department, University of Sao Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, Sao Paulo 2415, Brazil; correabe@usp.br
- ² Research Institute of Brewing and Malting, Malting Institute Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic; belakova@beerresearch.cz (S.B.); benesova@beerresearch.cz (K.B.); pernica@beerresearch.cz (M.P.); hartman@beerresearch.cz (I.H.)
- ³ University of the Extreme Southern Santa Catarina, Av. Universitaria, Criciuma 1105, Santa Catarina, Brazil; geovanasavi@gmail.com
- ⁴ Department of Food Science, Food Engineering Faculty, University of Campinas, Av. Monteiro Lobato, 80., Campinas 13083-862, Brazil; lrocha@unicamp.br
- ⁵ Institute of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; caslavsky@fch.vut.cz
- * Correspondence: karim.piacentini@hotmail.com; Tel.: + 55-11-3091-7728

Received: 15 April 2019; Accepted: 4 May 2019; Published: 7 May 2019



Abstract: Mycotoxins are widely studied by many research groups in all aspects, but the stability of these compounds needs further research for clarification. The objective of this study is to evaluate deoxynivalenol and zearalenone stability during all steps of the malting and brewing processes. The levels of these compounds decreased significantly during the production process (barley to beer). During the malting process, the DON levels decreased significantly in the steeping, germination, and malting steps (62%, 51.5%, and 68%, respectively). Considering ZEN, when the levels were compared between barley and the last step of the process, a significant decrease was observed. Most of the mycotoxins produced were transferred to the rootlets and spent grains, which is advantageous considering the final product. Furthermore, the mycotoxin dietary intake estimation was included in this study. The results proved that if the concentrations of target mycotoxins in raw material are under the limits established by the regulations, the levels decrease during the malting and brewing processes and make the beer secure for consumers. The quality of the five commodities involved in the beer process plays a decisive role in the creation of a safe final product.

Keywords: mycotoxins; stability; malting; brewing; beer

Key Contribution: Deoxynivalenol and Zearalenone shown to decrease in levels over the entire process with significant difference. This study showed that if the raw material is under the limits established by the regulations, the levels can decrease during the process and make the beer safe for consumers.

1. Introduction

Fusarium contamination in cereals has increased in recent years, mainly in barley, wheat, corn, and oats [1–5]. This can be related to changes in climate condition, but is also due to problems during cultivation and harvest. Along with fungi contamination, temperature, and changes in forecast, the production of secondary metabolites occurs.

Mycotoxins are being widely studied by many research groups in all aspects, such as the occurrence of these compounds in food, effects on animals and also on humans, prevention, and mitigation [2,6,7]. The stability of mycotoxins is also studied, but all aspects need further research for clarification and perhaps help in the control of contamination.

In this context, the beer industry has several concerns about fungi and mycotoxin contamination due to the loss of raw material, economic impact, and, one of the most significant issues, loss of quality.

Two *Fusarium* toxins that are considered hazardous to the entire industry are deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN). These toxins are very common and can be found throughout the entire malting and brewing processes [8].

DON, also named vomitoxin, is a trichothecene B-type that elicits a complex spectrum of toxic effects. Chronic exposure to low doses of DON can lead to anorexia, impaired weight gain, and immunotoxicity. Acute exposure to high doses can cause diarrhea, vomiting, leukocytosis, circulatory shock, and, ultimately, death [9].

Trichothecenes are products of the sesquiterpenoid metabolism of some genera in the order Hypocreales [10] and, among them, deoxynivalenol (DON) is notorious for its worldwide occurrence. This mycotoxin is mainly produced by phylogenetic species within the *Fusarium graminearum* species complex, which includes the *F. graminearum sensu stricto* [11]. This species is encountered on barley, maize, and wheat causing *Fusarium* head blight, a disease that leads to yield losses in small grain cereals.

ZEN is another mycotoxin that should be taken into account due to the high contamination found in recent monitoring studies in grains [2,3,12]. It is treated as a non-steroidal estrogenic compound because its structure is similar to the hormone estrogen and it competes with 17 β -estradiol for binding of the estrogen receptor, resulting in infertility and reproductive problems [13].

Regulations have been established worldwide to fix the maximum levels allowed of mycotoxins in grains. In Europe, the levels for DON and ZEN in barley are set at 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively [14]. In Brazil, the regulations are being updated and in 2019 the DON levels for barley will be set at 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for barley and 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for malt. Considering ZEN, the levels will be maintained at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [15].

Some studies have shown a high contamination of these two mycotoxins in beer, but no studies have been developed to control or decrease the levels. The beer industry requires more information about the stability of these compounds during the entire process.

For the reasons stated above, the objective of the current study is to evaluate the stability of DON and ZEN during all steps of the malting and brewing processes, considering that barley grains constantly pass through different conditions, which can increase or decrease the levels of these metabolites. To our knowledge, this will be the first study carried out considering mycotoxins in the entire beer chain.

2. Results

2.1. Method Validation

The methods for extraction of mycotoxin grains and liquid matrices during the malting and brewing process were validated according to the Commission Regulation [16] guidelines. To determine the recovery, repeatability, and selectivity/specificity, solid and liquid samples with non-detectable levels of mycotoxins were submitted to spiking experiments.

The blank solid malt control sample was used (produced from the barley variety Kangoo) with no targeted mycotoxins detected. The spiking levels were chosen considering the contamination levels of examined samples. The blank liquid sample used was wort (from the above-mentioned malt, according to Section 4.3). The spiking levels of the liquid matrix were chosen considering the predicted contamination levels of examined samples of produced wort and beer. The standards were applied to the matrix in methanol:water (1:1 v:v). Average recovery was calculated using triplicate analyses conducted for each level. The experiments were repeated on three different days.

The limit of detection (LOD) was defined as the minimum concentration of an analyte in the spiked sample with a signal–noise ratio equal to 3 and limit of quantification (LOQ) with a signal–noise ratio equal to 10. Considering linearity, a seven-point calibration dependence was constructed with the following concentrations of the mycotoxin standard mixture (DON and ZEN): 5, 10, 20, 50, 100, 200, and 1000 ng/mL. The coefficients of determination (r^2) for DON and ZEN were 0.9994 and 0.9992, respectively. The parameters achieved are shown in the Table 1.

Table 1. Validation parameters of the method.

Analytes	Matrix	Spiking Level (ng/mL)	Recovery (%)	RSD ^c (%)	LOD ^{*d}	LOQ ^{*e}
DON ^a	Grains (malt)	100	92.1	9.2	3.5	11.6
		500	92.9	2.9		
		1000	87.6	4.4		
	Liquid (wort)	50	90.6	1.4	0.5	1.6
		100	91.5	2.0		
		250	94.6	1.4		
ZEN ^b	Grains (malt)	50	89.6	5.3	2.8	9.2
		250	99.8	2.9		
		500	105.7	0.4		
	Liquid (wort)	10	85.8	1.1	2.0	6.7
		50	89.2	0.9		
		100	97.9	0.8		

* grain: µg/kg; liquid: µg/L; ^a DON: deoxynivalenol; ^b ZEN: zearalenone; ^c RSD: relative standard deviation; ^d LOD: limit of detection; ^e LOQ: limit of quantification.

2.2. DON and ZEN Stability during the Malting and Brewing Processes

The stability of the mycotoxins was evaluated in the steps considered as the most important ($N = 13$) of the malting and brewing processes (Figure 1). First of all, as aforementioned, the barley used for the analysis was naturally contaminated and the levels among ten samples had an average of 3835 µg/kg and 1069 µg/kg for DON and ZEN, respectively (Table 2).

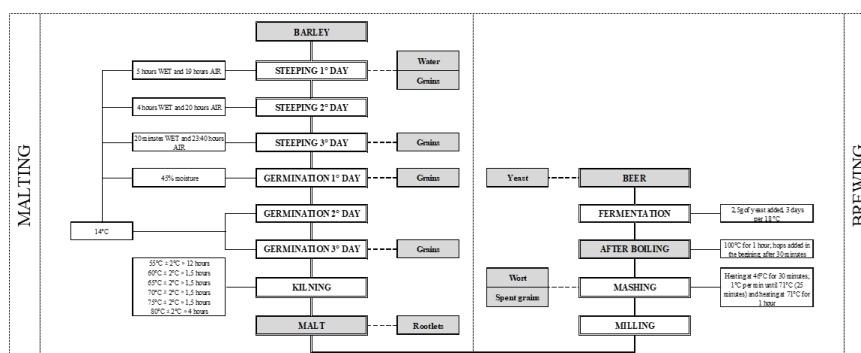


Figure 1. Map of malting and brewing process sampling (blocks in gray) carried out in the study.

Table 2. Average, minimum, and maximum values for all of the steps of the malting and brewing processes.

Process	Steps	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			ZEN ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
		Average	Maximum	Minimum	Average	Maximum	Minimum
Malting	Barley	3835	5204	2687	1070	3596	175
	Water 1st day	599	851	470	12	21	3
	Steeping 1st day	1319	2906	438	222	1045	53
	Steeping 3rd day	1442	2103	754	799	2602	15
	Germination 1st day	1308	2641	617	618	2385	57
	Germination 3rd day	1858	2957	822	1172	2854	140
	Malt	1211	1780	728	392	1386	95
Brewing	Rootlets	1797	2181	1431	1122	1735	206
	Wort	1105	1505	808	25	64	9
	Spent grains	1068	1742	590	1429	3188	200
	After boiling	1132	1483	840	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	After fermentation/beer	1089	1414	863	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Yeast	166	241	89	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Considering DON in the malting process, water was analyzed first and an average of 599 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was found. In this experiment, the mass balance of mycotoxins DON and ZEN was always related to 1 kg of the original barley and the reported values in malt, wort, beer after boiling, and beer after fermentation were recalculated according to the weight balance, where barley is 100%.

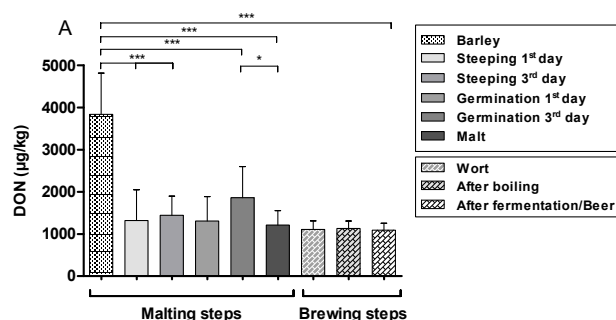
Detected levels in byproducts (yeasts, spent grains, and rootlets) were reported in $\mu\text{g}/\text{kg}$ and were not included in the mass balance.

Comparing DON levels found in barley with levels found on the first and third day of steeping and the third day of germination and malt, DON had a decrease of 66%, 62%, 51.5%, and 68%, respectively, and were significantly different ($*** p < 0.001$) (Figure 2). On the other hand, DON decreased significantly (38%) between the third day of germination and malt ($* p < 0.05$).

The ZEN levels during the malting process decreased significantly (79%) when barley was compared to the first day of steeping ($* p < 0.05$). Nevertheless, an increase could be seen between the first day of steeping and the third day of germination (173%), with a significant difference ($** p < 0.01$).

Further analyses were completed in brewing. Considering the entire process (barley to beer), DON showed a significant ($*** p < 0.001$) decrease of 71.6%. In the same context, when ZEN levels were compared, a significant decrease was also observed ($** p < 0.01$).

It is necessary to highlight that all of the results for the liquid matrix were recalculated to 1 kg.

**Figure 2.** Cont.

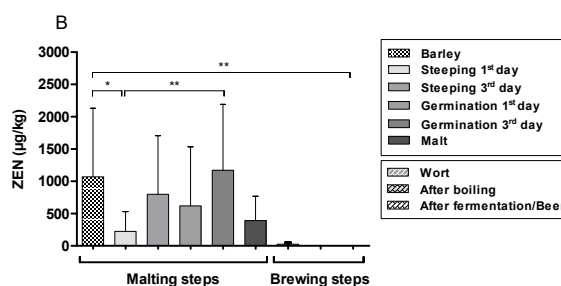


Figure 2. Steps of the malting and brewing processes showing (A) DON and (B) ZEN levels expressed as mean \pm SD and different significance between the steps, according to ANOVA followed by Tukey test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

2.3. Mycotoxin Dietary Intake Estimation from Beer Consumption

Using an average adult body weight of 60 kg and the mean mycotoxin data from this study, an estimation of dietary exposure to DON from the last step of the process while following the levels established by the regulation was carried out (Table 3).

Table 3. Mycotoxin dietary intake estimation from beer consumption.

	DON	
	Level Study	Level Regulation
Mean ($\mu\text{g/L}$)	272.17	88.75
Daily average exposure ($\mu\text{g/kg/bw}$)	0.77	0.25
Tolerable daily intake ($\mu\text{g/kg/bw}$)	1	1
% of tolerable daily intake	77	25

It is important to mention that the level of the mycotoxin in the last step was 1089 μg , recalculated to 1 kg. Based on the literature [17], 1 kg of barley is able to produce 4 L of beer. 272 $\mu\text{g/L}$ of DON in beer is equivalent to 1088 $\mu\text{g/kg}$ DON in barley. This corresponds to a 71.6% reduction of DON content in the final product, whereas the average DON concentration in the original barley was 3835 $\mu\text{g/kg}$. Applying the same model to barley contaminated with 1250 $\mu\text{g/kg}$ DON (the maximum allowable limit), the resulting DON concentration in beer will be 89 $\mu\text{g/L}$.

3. Discussion

As the literature shows, mycotoxins are highly stable compounds (resistant to high temperatures and extreme pH levels) [18]. Although the malting and brewing processes have maximum operation temperatures below the ones able to destroy the mycotoxins, they may influence mycotoxin concentration due to physical, chemical, and biochemical changes that take place [17,19]

In the current study, mycotoxin levels were determined in seven steps of the malting process. First, barley and water were analyzed and the results showed levels for DON in both matrices (barley average 3835 $\mu\text{g/kg}$, water average 599 $\mu\text{g/kg}$). The amount of DON found in the water can be explained by the soluble characteristic of this mycotoxin; for this reason, it was eluted from the matrix [20]. On the other hand, low levels for ZEN in water were found.

Furthermore, when DON levels of barley were compared to the first and third day of steeping, a decrease in the levels was observed. These results could also be related to the loss of mycotoxins in the water.

The next step involved in malting is germination. In this study, the samples were taken from the first and third day of this process. The levels of DON decreased significantly between barley and the third day of germination. A possible reason for this reduction (DON glycosylation) is due to the

increase in glucose content, which might activate the barley enzyme responsible for the respective reaction, transforming DON into DON-3-glucoside. Some studies have shown that 50% of DON is converted after a few days of germination [21]. To our knowledge, there is no study carried out considering ZEN glycosylation during germination in barley. However, the results of the current study could suggest this reaction (between barley and the first day of germination), transforming ZEN in α - and β -zearalenol and other masked toxins, even though the decrease in the levels is considered without significant difference [22].

Additionally, during germination, fungal biomass and mycotoxin production may grow, most likely as a result of cross-contamination from the residual steeping water or because of a latent barley grain infection, which may be activated with the increase in humidity during this process [23]. This can be seen in the current study when ZEN levels from the first day of steeping and the third day of germination are compared.

The final procedure in malting is kilning, where the germination is interrupted and the green malt is prepared for storage and transportation. This step is characterized by several temperature scales (55–100 °C) and it is considered crucial to malt flavor and color formation [19]. In the current study, DON levels were shown to decrease significantly between the third day of germination and malt. This could be related to the high temperatures, but also due to the separation of the rootlets from the grain.

Malt and rootlets were analyzed for both toxins and it is necessary to highlight the eminent amount of both toxins found in rootlets. For the beer industry, it was considered a good result, as most of the mycotoxins are released in this part of the grain. On the other hand, it should be a concern for agriculture, as this matrix is frequently used to feed animals [24–26].

After barley is malted, the grains are milled, and water is added to start the brewing process. In the mashing phase, the water is heated to about 62–71 °C and enzymes, such as α - and β -amylases, are activated to allow the conversion of starches into fermentable sugars [17]. Concerning the influence on mycotoxin levels at this step, there is a possible release of DON conjugated to protein structures and, as a result, there is an increase in total DON concentration [27]. This fact could be seen in the current study for both mycotoxins, not only for DON. Being more specific, DON and ZEN had an average malt level of 1211 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 391 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. In mashing, if the results of wort and spent grains are added, the value is almost twice as high for DON and almost four times as high for ZEN (DON: 2173 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ZEN: 1460 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Also, the milling process could interfere in the levels due to the mycotoxin homogeneous spread into the entire malt batch and its later solubilization into mashing water [8].

Boiling is the next stage and it is characterized by the enzyme inactivation, hops addition, isomerization of hop alfa acids, evaporation of water and volatile compounds (dimethyl sulphides, undesirable in beer), protein precipitation, sterilization, Maillard reactions, and flavour modulation [17]. Regarding the impact of wort boiling on mycotoxin content, the temperature in this process, (above 100 °C) and the average time of boiling (1 h) could cause a decrease in mycotoxin concentration [8,28]. This experience can be seen in the results of the present study, even in low concentrations.

On the other hand, a few authors have shown that DON and ZEN are very stable compounds and the melting points in food processing are around 153 °C and 165 °C, respectively [18,29]. Another thing that should be mentioned in this stage is the addition of adjuncts, such as corn, wheat, and sorghum, which might represent an additional source of mycotoxins [1,30].

After the boiling process, the wort is cooled to 21 °C and the fermentation of wort is initiated by the yeast (*Saccharomyces* genus). In general, the fermentation temperature ranges from 2 °C to 30 °C, over 7–9 days [31,32]. DON was shown to be very stable in this process and the results did not show significant differences (after boiling: 1132 $\mu\text{g}/\text{kg}$; after fermentation: 1089 $\mu\text{g}/\text{kg}$ = 3.8% of apparent reduction). In research performed by [33], similar results were found, where there was a reduction of only 11.6% of DON.

The adsorption of mycotoxins by yeasts have been studied and this phenomenon occurs due to the binding of the toxins to β -glucans from yeast to the cell wall [34]. In the current study, the yeasts

were also analyzed after fermentation and DON was shown to be adsorbed. For ZEN, any amount of this mycotoxin found after boiling made this determination impossible in the present experiments. Nevertheless, in a study conducted by [33], ZEN was shown to have a very high ratio of adsorption (75.1%) on the beer fermentation residues.

Finally, considering the results of tolerable daily intake, the consumption of 62 L/year per capita [35] (0.17 L/day of beer) resulted in an exposure of 0.77 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{bw}/\text{day}$ from the beer in this study and 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{body weight (bw)}/\text{day}$ from beer using the levels established by the regulation for a 60 kg adult. Both these estimated daily intake (DI) results are still lower than the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) of 1 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ for DON stipulated by the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) [36].

4. Material and Methods

4.1. Samples

A total of 10 barley samples (*Hordeum vulgare* L.) with a weight of 500 g each were used from a 2015 harvest and were supplied by the Brazilian agricultural research corporation (Embrapa). It is important to mention that the samples studied had natural mycotoxins levels acquired in the field without artificial interference.

The samples used in the current study were sown in May 2015 and harvested in December 2015. During this period, above-average rainfall with a mean precipitation of 95 mm was recorded [37]. Furthermore, the humidity was also considered significant, with an average value of 80% [38]. Another parameter included was the high temperature (average of 29 °C). These barley samples contained a concentration average of 3835 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for DON and 1070 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for ZEN, according to our previous study [2]; the environmental conditions presumably affected the mycotoxin production, thereby justifying the levels found.

The samples were used in the entire processes of malting and brewing (microscale) and aliquots were taken in the selected steps for mycotoxin analysis.

4.2. Chemicals and Reagents

Deoxynivalenol and zearalenone standards were purchased from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). The stock solutions standards were prepared in methanol:water (1:1) at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

All reagents used in the following analyses were analytical and LC/MS-MS grade. For quality assurance in the mycotoxin analyses, wheat flour certified reference materials (CRM) (Trilogy, Washington) were used. The concentrations for DON and ZEN were $700 \pm 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ and $454.2 \pm 37.6 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

4.3. Malting and Brewing Process

All of the malting and brewing trials were carried out in the Research Institute of Malting and Brewing, Brno, Czech Republic. The procedures used for malting were according to the [39] methodology and amendments were approved by the barley and malt European Brewery Convention [32].

The first step of malting was steeping, carried out as follows: On the 1st day of steeping, water was added to the grains for 5 h, followed by 19 h of air rest. On the 2nd day, grains were submitted to 4 h in the water, followed by 20 h of air rest. Finally, on the 3rd day of steeping, the grains were in the water for 20 min and then submitted to air rest for 23 h and 40 min. The germination step was performed over 3 days (72 h), with a subsequent kilning step. The grains in the steeping and germination processes were always maintained at a controlled temperature (14 °C) and the moisture content of the grains was measured in each step, being controlled to 45%. The total kilning time was 22 h, with a pre-kilning temperature of 55 °C for 12 h and a kilning temperature of 80 °C for 4 h.

Furthermore, the methodology used for wort production was according to [39] and the [32], with slight modifications. Fifty grams of milled malt was weighed into the mashing beaker and 200 mL of water (45 °C) was added. The beaker was placed into a programmed mashing bath with automatic stirrers. The temperature was maintained for 30 min under constant stirring (100 rpm). Following this period, the temperature of the mashing bath was increased 1 °C per minute for 25 min. Once the temperature reached 70 °C, 100 mL of water at 70 °C was added and maintained at 70 °C for 1 h. The beaker was then removed and cooled to room temperature. The contents of the beaker were adjusted to 450 g with water, stirred, and the contents filtered through filter paper. Wort and spent grains were used for further analyses.

The methods carried out for the final steps of the brewing process, such as boiling and fermentation, were developed by the Research Institute of Brewing and Malting and also according to available literature [31,32], in an attempt to simulate the real brewing process. In short, each sample with 200 mL of the wort was boiled with 8 g of traditional hops for one hour. It is necessary to mention that the hops were added at two different times, in the beginning (4 g) and after 30 min of boiling (4 g). The boiled wort was cooled to 21 °C for the yeast (W 34/70Starobrno Lager Yeast, *Saccharomyces pastorianus*) addition. The fermentation process was carried out over the course of 3 days at a controlled temperature (18 °C).

The sampling for mycotoxin analysis was performed in 8 steps of the malting process and 5 steps in the brewing process, as shown in Figure 1.

4.4. Extraction and Mycotoxin Cleanup

To accomplish the procedure for extraction and cleanup of DON and ZEN analysis, immunoaffinity columns (DZT MS-Prep—R. Biopharm, Glasgow, Scotland) for both mycotoxins were used. This step was performed according to the DZT MS-Prep protocol with some modifications. In short, for grains, 10 g of milled barley, malt, rootlets, and spent grains were mixed with methanol 70% for 50 min, followed by 15 min of centrifugation at 4500 rpm. Then, 2 mL of the extract were added to 48 mL of PBS buffer (pH 7.4, adjusted with 2M NaOH) [40] and shaken manually. Twenty mL of the diluted extract were passed through the column at one drop per second. In addition, to wash the column, 20 mL of distilled water was added. The elution was performed with 2 mL of 100% methanol. For injection, the extract was dried and then dissolved with 1 mL of 50% methanol in water. For the yeast extract, the procedure described above was applied to 2 g per sample.

The DZT MS-Prep columns were also used for mycotoxin extraction from a liquid matrix. In summary, 2 mL of wort or beer was added to 18 mL of PBS buffer and then loaded to the column. For washing, 20 mL distilled water was used, followed by elution with 2 mL of 100% methanol. Finally, the extract was dried and dissolved in 1 mL of 50% methanol for injection.

4.5. LC/MS-MS Method for Analysis

To accomplish the identification and quantification of mycotoxins (DON and ZEN), LC/MS-MS system consisting of Finnigan Surveyor HPLC coupled to the ion trap LCQ Advantage mass spectrometer (Thermo-Fisher, USA) with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was used.

The chromatographic conditions were adopted according to the procedure developed by [41]. Chromatographic separation was performed with Synergi Hydro RP 80A column (3.0 × 150 mm, 4.0 µm particle size) equipped with a Security Guard™ cartridge C18 (4.0 × 3.0 mm, 4.0 µm) at 30 °C using gradient elution. The mobile phase was comprised of solvent A (water containing 10 mM ammonium acetate) and solvent B (methanol). The gradient program was applied at a flow rate of 0.5 mL/min under the following conditions: 0.1 min 90% A; 2 min 50% A; 10 min 20% A; 15 min 20% A; 16 min 90%; 25 min 90% A. The total analytical run time was 25 min for the two toxins.

The APCI interface was operated at negative polarity and the following ionization conditions were used: Capillary temperature, 160 °C; source heater temperature of 450 °C; nitrogen sheath gas flow of 35 L/min; nitrogen auxiliary gas flow of 10 L/min; source voltage of 6.0 kV; collision gas was

helium. For selectivity, the mass spectrometer was operated in MRM mode and two transitions per analyte were monitored (Table 4).

Table 4. Retention time and mass spectrometric parameters used in the analysis of the mycotoxins.

Mycotoxin	Retention Time (min.)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) *	Normalized CE (%)	Tube Lens
DON	6.3	355	295 ^C	34	15
			265 ^Q		
ZEN	16.2	317	273 ^C	64	15
			299 ^Q		

* C: Confirmation transition; Q: Quantification transition.

The mass spectrometry conditions were optimized by re-tuning different analytes via direct infusion of each analyte individually. The cone voltages, collision energies, and product ions were optimized and carefully chosen.

4.6. Estimation of the Average Tolerable Daily Intake (TDI) and Maximum Tolerable Daily Intake

The mycotoxin dietary intake estimation was calculated using the mean level of DON found in the end of the process (after fermentation/beer) which was divided by four, considering that 1 kg of barley is able to produce 4 L of beer [17]. The mean level obtained was multiplied by the daily consumption of beer according to [42] and divided by 60 kg (body weight). The TDI calculation was based on the tolerable intake 1 µg/kg body weight/day for DON [36].

4.7. Statistical Analysis

Results regarding DON and ZEN during the malting and brewing processes were reported as mean, maximum, and minimum using Microsoft Office Excel 2007. Also, analysis of variance (repeated measures ANOVA) using the Tukey test was conducted on the obtained data. The results are presented as mean ± standard deviation and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

5. Conclusions

The malting and brewing processes may impact the stability of DON and ZEN. Both mycotoxins were shown to decrease in levels over the entire process (barley to beer), with significant difference. It is necessary to highlight that rootlets and spent grains were shown to discard most of the mycotoxins produced in the previous processes. However, it should be a concern for the agriculture, due to this matrix being destined for animal feeding.

The quality of the five commodities involved (barley, hops, water, yeast, and adjuncts) in the beer process plays a decisive role in the creation of a safe final product. Finally, according to mycotoxin dietary intake estimation, this study showed that if the raw material is under the limits established by the regulations, the levels can decrease during the process and make the beer safe for consumers.

Author Contributions: The authors' responsibilities were as follows—K.C.P. and S.B. designed the research; K.C.P., S.B., K.B., M.P., and I.H.: conducted the research; G.D.S., and L.O.R.: guided and performed the statistical analysis; J.C., S.B., and B.C.: Oversight and leadership responsibility for the research activity planning and execution, K.C.P. wrote the manuscript and hold primary responsibility for the final content; and all authors: read and approved the final manuscript.

Funding: The authors would like to thank FAPESP (Sao Paulo Research Foundation) grant numbers 2016/01798-4, 2018/01795-0 and also TACR TE020001777 "Centre for Innovative Use and Strengthening of Competitiveness of Czech Brewery Raw Materials and Products" for the financial support.

Acknowledgments: Furthermore, the authors would like to thank the technician involved, Pavel Mezulanik, in the analysis of this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Oliveira, M.S.; Rocha, A.; Sulyok, M.; Krska, R.; Mallmann, C.A. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control* **2017**, *73*, 127–132. [[CrossRef](#)]
- Piacentini, K.C.; Rocha, L.O.; Savi, G.D.; Carnielli-Queiroz, L.; Almeida, F.G.; Minella, E.; Corrêa, B. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil. *Mycotoxin Res.* **2018**, *34*, 173–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tralamazza, S.M.; Bemvenuti, R.H.; Zorzete, P.; De Souza Garcia, F.; Corrêa, B. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. *Food Chem.* **2016**, *196*, 445–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bolechová, M.; Benešová, K.; Běláková, S.; Čáslavský, J.; Pospíchalová, M.; Mikulíková, R. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control* **2015**, *47*, 108–113. [[CrossRef](#)]
- Xu, W.; Han, X.; Li, F. Co-occurrence of multi-mycotoxins in wheat grains harvested in Anhui province, China. *Food Control* **2019**, *96*, 180–185. [[CrossRef](#)]
- Savi, G.D.; Piacentini, K.C.; Bittencourt, K.O.; Scussel, V.M. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. *J. Stored Prod. Res.* **2014**, *59*, 245–253. [[CrossRef](#)]
- da Rocha, M.E.B.; Freire, F.D.C.O.; Maia, F.E.F.; Guedes, M.I.F.; Rondina, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* **2014**, *36*, 159–165. [[CrossRef](#)]
- Pascari, X.; Ramos, A.J.; Marin, S.; Sanchis, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Res. Int.* **2018**, *103*, 121–129. [[CrossRef](#)]
- Pestka, J.J.; Smolinski, A.T. Deoxynivalenol: Toxicology and Potential Effects on Humans. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* **2005**, *8*, 39–69. [[CrossRef](#)]
- Rocha, L.O.; Laurence, M.H.; Proctor, R.H.; McCormick, S.P.; Summerell, B.A.; Liew, E.C.Y. Variation in type A trichothecene production and trichothecene biosynthetic genes in *Fusarium goulgardii* from Natural Ecosystems of Australia. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 4577–4594. [[CrossRef](#)]
- van der Lee, T.; Zhang, H.; van Diepeningen, A.; Waalwijk, C. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: A review. *Food Addit. Contam. Part A* **2015**, *32*, 453–460.
- Savi, G.D.; Piacentini, K.C.; Rocha, L.O.; Carnielli-Queiroz, L.; Furtado, B.G.; Scussel, R.; Zanoni, E.T.; Machado-de-Ávila, R.A.; Corrêa, B.; Angioletto, E. Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *270*, 5–13. [[CrossRef](#)]
- Takemura, H.; Shim, J.Y.; Sayama, K.; Tsubura, A.; Zhu, B.T.; Shimoi, K. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *103*, 170–177. [[CrossRef](#)]
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 Maximum levels for certain contaminants in food. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *2006*, 5–24.
- BRASIL Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas. *Agência Nac. Vigilância Sanitária ANVISA* **2017**, *2017*, 3.
- 401/2006/EC Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L70*, 12–34.
- Briggs, D.E.; Boulton, C.A.; Brookes, P.A.; Stevens, R. *Brewing: Science and Practice*, 1st ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2004; ISBN 9781855734906.
- Kabak, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *J. Sci. Food Agric.* **2009**. [[CrossRef](#)]
- Briggs, D.E. *Malts and Malting*, 1st ed.; Blackie Academic & Professional: London, UK, 1998; ISBN 0412298007.
- Schwarz, P.B.; Casper, H.H.; Beattie, S. Fate and Development of Naturally Occurring *Fusarium* Mycotoxins During Malting and Brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1995**, *53*, 101–127.
- Maul, R.; Müller, C.; Rieß, S.; Koch, M.; Methner, F.J.; Irene, N. Germination induces the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chem.* **2012**, *131*, 274–279. [[CrossRef](#)]
- Schneweis, I.; Meyer, K.; Engelhardt, G.; Bauer, J. Occurrence of Zearalenone-4-b-D-glucopyranoside in Wheat. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1736–1768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vegi, A.; Schwarz, P.; Wolf-Hall, C.E. Quantification of Tri5 gene, expression, and deoxynivalenol production during the malting of barley. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *150*, 150–156. [[CrossRef](#)]

24. Cavaglieri, L.R.; Keller, K.M.; Pereyra, C.M.; Gonzalez Pereyra, M.L.; Alonso, V.A.; Rojo, F.G.; Dalcerro, A.M.; Rosa, C.A.R. Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. *J. Stored Prod. Res.* **2009**, *45*, 147–150. [[CrossRef](#)]
25. Zachariasova, M.; Dzuman, Z.; Veprikova, Z.; Hajkova, K.; Jiru, M.; Vaclavikova, M.; Zachariasova, A.; Pospichalova, M.; Florian, M.; Hajslova, J. Occurrence of multiple mycotoxins in european feedstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2014**, *193*, 124–140. [[CrossRef](#)]
26. Mastanjević, K.; Šarkanj, B.; Warth, B.; Krška, R.; Sulyok, M.; Mastanjević, K.; Šantek, B.; Krstanović, V. Fusarium culmorum multi-toxin screening in malting and brewing by-products. *LWT* **2018**, *98*, 642–645. [[CrossRef](#)]
27. Wolf-Hall, C.E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 89–94. [[CrossRef](#)]
28. Habler, K.; Geissinger, C.; Hofer, K.; Schüller, J.; Moghari, S.; Hess, M.; Gastl, M.; Rychlik, M. Fate of fusarium toxins during brewing. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 190–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Milani, J.; Maleki, G. Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 2372–2375. [[CrossRef](#)]
30. Piacentini, K.C.; Rocha, L.O.; Fontes, L.C.; Carnielli, L.; Reis, T.A.; Corrêa, B. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. *Food Chem.* **2017**, *218*, 64–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Basarova, G.; Savel, J.; Petr, B.; Lejsek, T. *The Comprehensive Guide to Brewing: From Raw Materials to Packaging*; Fachverlag Hans Carl: Nuremberg, Germany, 2017.
32. *EBC European Brewery Convention - Analytica EBC*; Fachverlag Hans Carl: Nuremberg, Germany, 2009; ISBN 3-418-00759-7.
33. Campagnollo, F.B.; Franco, L.T.; Rottinghaus, G.E.; Kobashigawa, E.; Ledoux, D.R.; Daković, A.; Oliveira, C.A.F. In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. *Food Res. Int.* **2015**, *77*, 643–648. [[CrossRef](#)]
34. Jouany, J.; Yiannikouris, A.; Bertin, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Arch. Zootech.* **2005**, 26–50.
35. Renato Matos Lopes, P.; Marin Morales, E.; Nallin Montagnolli, R. Cerveja brasileira: do campo ao copo. *Rev. Agron. Bras.* **2018**, *1*. [[CrossRef](#)]
36. EFSA Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA J.* **2013**.
37. CPTEC Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos—CPTEC/INPE. Available online: <http://www.cptec.inpe.br/> (accessed on 5 September 2017).
38. INMET Instituto Nacional de Meteorologia. Available online: <http://www.inmet.gov.br/portal/> (accessed on 4 December 2017).
39. MEBAK. *Raw Materials—Barley, Adjuncts, Malt, Hops and Hop Products*; MEBAK: Freising-Weihenstephan, Germany, 2011.
40. Běláková, S.; Benešová, K.; Mikulíková, R.; Svoboda, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chem.* **2011**, *126*, 321–325. [[CrossRef](#)]
41. Běláková, S.; Benešová, K.; Čáslavský, J.; Svoboda, Z.; Mikulíková, R. The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in czech malting barley. *Food Control* **2014**, *37*, 93–98. [[CrossRef](#)]
42. Lopes, P.R.M.; Morales, E.M.; Montagnolli, R.N. Cerveja brasileira: do campo ao copo. *Rev. Agron. Bras.* **2018**, *1*, 18–21.

