



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS
ALIMENTOS**

KARIM CRISTINA PIACENTINI

**FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE CEVADA (*Hordeum
vulgare* L.) CERVEJEIRA, DESCONTAMINAÇÃO PELO GÁS
OZÔNIO E SEGURANÇA DE CERVEJAS ARTESANAIS**

Florianópolis

Maiο, 2015

Karim Cristina Piacentini

FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE CEVADA (*Hordeum vulgare* L.) CERVEJEIRA, DESCONTAMINAÇÃO PELO GÁS OZÔNIO E SEGURANÇA DE CERVEJAS ARTESANAIS

Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra Vildes Maria Scussel

FLORIANÓPOLIS
MAIO/2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Piacentini, Karim Cristina

Fungos e Micotoxinas em Grãos de Cevada (*Hordeum vulgare* L.)
Cervejeira, Descontaminação pelo Gás Ozônio e Segurança de Cervejas Artesanais
/ Karim Cristina Piacentini; orientadora, Vildes Maria Scussel – Florianópolis, SC,
2015.

147 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui Referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Fungos. 3. Micotoxinas. 4. Cevada cervejeira. 5.
Cerveja artesanal. I. Scussel, Vildes Maria. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Karim Cristina Piacentini

FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE CEVADA (*Hordeum vulgare* L.) CERVEJEIRA, DESCONTAMINAÇÃO PELO GÁS OZÔNIO E SEGURANÇA DE CERVEJAS ARTESANAIS

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pela orientadora e pelos demais membros da Banca Examinadora, composta pelos professores.

Prof^ª. Dr^ª. Vildes Maria Scussel
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Roseane Fett
Coordenadora

Banca examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Ariane Mendonça Kluczkovski
Membro

Prof^ª. Dr^ª. Elisa Siege Moecke
Membro

Prof^ª. Dr^ª. Karina Koerich de Souza
Membro

FLORIANÓPOLIS, (SC) MAIO DE 2015.

-

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

AGRADECIMENTOS

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

De antemão, a Profa. Dra. Vildes Maria Scussel, minha orientadora, pelo voto de confiança, apoio e fundamental contribuição no meu crescimento enquanto pesquisadora e profissional.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, Profa. Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski, Profa. Dra. Elisa Siege Moecke, Profa. Dra. Cleide Rosana Werneck e Dra. Karina Koerich de Souza pelas contribuições relevantes que ajudaram a elevar o nível do trabalho.

A Geovana em especial, minha grande amiga e colega de laboratório, com quem compartilhei minhas dúvidas e que certamente ajudaram a direcionar os rumos de minha dissertação. 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 LabMico, Roberta, Heloisa, Laura, Ariane, Maristela, Duda, Karol, Camila, Stephanie, Giovana, Livia e Djeini 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, Juvenal Piacentini e Ana Maria Sette, pelo incondicional apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão Diego Piacentini e minha cunhada Renata Rissotto pela sólida amizade, confiança e força que sempre transmitiram.

Ao Raphael Eduardo Chagas 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.

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

A cevada (*Hordeum vulgare* L sp. *vulgare*) é considerada um dos cereais mais importantes no contexto mundial. Atualmente, uma preocupação latente da indústria cervejeira é o crescimento de fungos filamentosos nos grãos, que ocorre devido ao manejo inadequado da matéria prima durante o armazenamento (excesso de umidade), a condensação, o aquecimento, o vazamento de água da chuva e a infestação por insetos. Tendo isso em vista e considerando que a cevada é um dos cereais mais comercializados no mundo, o objetivo desse trabalho foi investigar a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas nos grãos, avaliar a qualidade da cerveja artesanal produzida no Sul do Brasil, bem como determinar a eficiência do gás ozônio da destruição dos principais fungos encontrados na cevada. Adicionalmente, as características químicas e microestruturais de 5 cultivares de cevada cervejeira recomendados para cultivo no Brasil foram avaliados. As cervejas artesanais apresentaram contaminação por deoxynivalenol (DON) em aproximadamente 32% das amostras analisadas e contaminação por Fumonisin B₁ em 15.08% das amostras. Os grãos de cevada cervejeira utilizados na pesquisa apresentar amimportantes espécies fúngicas (*Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus* e *Penicillium*), sendo *Fusarium* o gênero mais predominante. No que diz respeito a contaminação por DON, a variedade BRS Brau apresentou maior contaminação, representando 50% das amostras desse cultivar. As fumonisinas foram encontradas, contudo, em poucas amostras e baixos níveis. No estudo realizado com O₃ como agente descontaminante, a espécie mais suscetível ao gás foi *F. poae*, seguida pelo *F. graminearum*. É necessário mencionar que a germinação dos grãos após os tratamentos com o O₃ não foi afetada. Finalmente, no estudo de análise química e microestrutural da cevada cervejeira, o cultivar BRS Brau apresentou características de melhor qualidade para a cevada em comparação com os outros, destacando, elevado teor de amido, com mais presença de grânulos tipo-A e baixas quantidades de proteína.

Palavras-chave: cerveja artesanal, cevada, fungos, micotoxinas, segurança, variedades

ABSTRACT

Barley (*Hordeum vulgare* L. sp. *vulgare*) is considered one of the most important cereals in the global context. Currently, a latent concern of the brewing industry is the growth of filamentous fungi in grains, due to the improper manipulation of raw material during storage (excess of moisture), condensation, heating and infestation by insects. Regarding it and considering that barley is one of the most cereals commercialized in the world, the aim of this study was to investigate the presence of toxigenic fungi and mycotoxins in grains, evaluate the quality of craft beer produced in southern Brazil, and to determine the ozone gas efficiency of the destruction of some fungi found in barley. In addition, chemical and microstructural analysis of 5 barley cultivars recommended for cultivation in Brazil were evaluated. The craft beers showed levels of deoxynivalenol (DON) in approximately 32% of the samples, and contamination with Fumonisin B₁ in 15.8% of samples. The malting barley grains used in the research presented important fungal species (*Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus* and *Penicillium*) being *Fusarium* the most predominant genus. Concerning DON, the Brau variety showed more contamination, representing 50% of the samples. Fumonisin has been found, however, in a few samples and low levels. In the study of O₃ as decontamination agent, the most susceptible species to the gas was *F. poae*, followed by *F. graminearum*. It is necessary to mention that the grain germination after treatment with O₃ was not affected. Finally, chemical and microstructural analysis study of the brewing barley genotypes, BRS Brau showed better quality characteristics compared to the others, emphasizing high starch, with more presence of A-type starch granules, and low amounts of protein.

Keywords: craft beer, barley, fungi, mycotoxins, safety varieties

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de cevada cervejeira no Brasil no ano de 2012.....	32
Figura 2. Estrutura do Grão de Cevada.....	34
Figura 3. Fluxograma do processo de produção da cerveja.....	44
Figura 4. Gerador de ozônio tipo descarga corona. Adaptado de Usepa (1999).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química média do grão de cevada cervejeira (% base seca) de acordo com diferentes autores.....	35
Tabela 2. Estrutura química das micotoxinas de campo.....	53
Tabela 3. Ocorrência mundial das principais micotoxinas encontradas em grãos de cevada.....	54
Tabela 4. Limites para micotoxinas em cevada malteada e outros produtos.....	56
Tabela 5. Limites na legislação internacional para micotoxinas em cevada.....	57
Tabela 6. Aplicações de ozônio para inibição de fungos em diferentes alimentos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AACC	American Association of cereal Chemists
AFLs	Aflatoxinas
AOAC	American Official Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
ASBC	American Society of Brewing Chemists
AW	Water activity
BYDV	Barley Yellow Dwarf Virus
CDA	Czapek-dox
CFU	Colony Form Unit
CYA	Czapek Yeast Agar
DON	Deoxinivalenol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EU	European Commission
FAO	Food and Agriculture Organization
FB ₁	Fumonisin B ₁
FB ₂	Fumonisin B ₂
FB ₃	Fumonisin B ₃
FBs	Fumonisin
FDA	Food and Drug Administration
FHB	<i>Fusarium</i> Head Blight
GN25	Glycerol Nitrate 25%
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAC	Immunoaffinity columns
IARC	International Association on Research of Cancer
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
LC	Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
LMT	Limite Máximo Tolerável
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MEA	Malt Extract Agar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OPA	O-oftaldialdeído
PDA	Potato Agar Dextrose
PH	Potencial Hidrogeniônico
PMS	Peso de Mil Sementes
PVC	Policloreto de Vinila

RT	Retention time
SAX	Strong Anion Exchange
SCF	Scientific Committee on Food
SCS	Standard curve solution
SD	Standard Deviation
SPE	Solid Phase Extraction
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USA	United States of America
USDA	United States Department of Agriculture
VNAC	Vírus do Nanismo Amarelo da Cevada
WHO	World Health Organization
ZON	Zearalenona

Sumário

INTRODUÇÃO.....	26
OBJETIVOS.....	28
GERAL.....	28
ESPECÍFICOS.....	28
CAPITULO 1.....	30
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
1.1 CEVADA.....	32
1.1.1 <i>Cevada cervejeira</i>	32
1.1.2 <i>Características do grão</i>	33
1.1.3 <i>Composição química da cevada</i>	36
1.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DO MALTE.....	39
1.3 PRODUÇÃO DE CERVEJAS.....	40
1.3.1 <i>Moagem do malte</i>	41
1.3.2 <i>Mosturação</i>	41
1.3.3 <i>Filtração do mosto</i>	42
1.3.4 <i>Fervura</i>	42
1.3.5 <i>Tratamento do mosto</i>	43
1.3.6 <i>Fermentação</i>	43
1.3.7 <i>Maturação</i>	43
1.3.8 <i>Clarificação</i>	44
1.4 PRINCIPAIS CONTAMINANTES DA CEVADA.....	46
1.4.1 <i>Pragas e insetos</i>	46
1.4.2 <i>Fungos</i>	46
1.4.3 <i>Micotoxinas</i>	48
1.5 LEGISLAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL.....	55
1.5.1 <i>Fungos</i>	55
1.5.2 <i>Micotoxinas</i>	55
1.6 GÁS OZÔNIO.....	57
2 REFERÊNCIAS.....	62
CAPÍTULO 2.....	76
QUALIDADE E OCORRÊNCIA DE DEOXINIVALENOL E FUMONISINAS EM CERVEJAS ARTESANAIS.....	76

CAPÍTULO 3.....	96
MICROFLORA E OCORRÊNCIA DE DEOXINIVALENOL E FUMONISINAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE CEVADA CERVEJEIRA(<i>Hordeum vulgare L.</i>).....	96
CAPÍTULO 4.....	120
EFEITO DO GÁS OZÔNIO EM RELAÇÃO A ESPÉCIES TOXIGÊNICAS DE <i>FUSARIUM</i> (<i>F. verticilioides</i>, <i>F. graminearum</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>F. poae</i> E <i>F. semitectum</i>) EM CEVADA CERVEJEIRA.....	120
CAPÍTULO 5.....	133
ANÁLISE MICROESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA CULTIVARES BRASILEIROS DE CEVADA (<i>Hordeum vulgare L.</i>) CERVEJEIRA.....	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	145
ANEXOS.....	147

INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* Lsp. *vulgare*) é considerada um dos cereais mais importantes no contexto mundial. Para se ter uma ideia de sua relevância, somente no ano de 2012 apresentou uma produção global estimada em 141,7 milhões de toneladas cultivadas em 50 milhões de hectares (USDA, 2014). É um cereal de inverno que ocupa a quinta posição em ordem de importância econômica no mundo. No Brasil, a produção de cevada é concentrada no sul, destacando o estado do Paraná (181,6 mil/t/ano) como principal produtor, seguido do Rio Grande do Sul (173,6 mil/t/ano) e Santa Catarina (6,1 mil/t) (BRASIL, 2014).

O grão é utilizado na produção e industrialização de bebidas (cerveja e destilados), na composição de farinhas para panificação, na produção de medicamentos e na formulação de produtos dietéticos e de sucedâneos de café. A cevada é ainda empregada em alimentação animal como forragem verde e na fabricação de ração. Vale ressaltar que, no Brasil, a malteação é o principal uso econômico da cevada, já que o país produz apenas 30% da demanda da indústria cervejeira (BRASIL, 2013).

Atualmente, uma preocupação latente da indústria cervejeira é o crescimento de fungos filamentosos nos grãos, que ocorre devido ao manejo inadequado da matéria prima durante o armazenamento (excesso de umidade), a condensação, o aquecimento, o vazamento de água da chuva e a infestação por insetos. Nos períodos de pré-colheita, no transporte e armazenamento dos grãos, as condições climáticas também são consideradas muito importantes na formação de fungos.

O crescimento fúngico pode levar a perda de substâncias nutritivas e resultar na contaminação por substâncias tóxicas, denominadas micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários de baixa massa molecular, produzidas pelos fungos filamentosos, principalmente os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, e são formadas por uma série de compostos de diferentes toxicidades.

Entre as micotoxinas mais comumente encontradas em grãos de cevada, destacam-se o deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZON), os quais são produzidos especialmente por *F. graminearum* as fumonisinas (FBs: FB₁ e FB₂) por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*.

De um modo geral, o principal problema causado pelas micotoxinas é o potencial carcinogênico e mutagênico, que é transferido a partir de grãos para alimentos processados. Os efeitos são tardios e

ocorrem devido à ingestão contínua de baixas doses de um alimento contaminado. Por esse motivo, a presença das micotoxinas nos alimentos é monitorada constantemente.

Nesse contexto, em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária propôs uma nova legislação para limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas em grãos de cevada (1750 µg/kg para DON) (BRASIL, 2011). O limite será reduzido ao longo dos anos para permitir que os produtores de grãos possam adaptar-se a legislação sem causar escassez do alimento. Em janeiro de 2017, os limites de DON para cevada malteada serão fixados a níveis de 750 µg/kg (BRASIL, 2013). Logo o mercado produtor tem urgência na prevenção e eliminação desses contaminantes.

Tendo em vista os aspectos supracitados, hoje são utilizados alguns métodos químicos de descontaminação, como o tratamento com gás ozônio, que é reconhecido como seguro (GRAS – generally recognized as safe) por não deixar resíduos. Esse tratamento vem sendo estudado para melhorar a qualidade dos alimentos, bem como para evitar perdas quantitativas para a indústria.

Considerando que a cevada é um dos cereais mais comercializados no mundo e a fim de conhecer se a qualidade da cevada produzida no Brasil está de acordo com o esperado pela nova legislação, este trabalho visa realizar levantamentos para investigar a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas, principalmente na região Sul, a maior produtora do país.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a segurança de grãos de cevada cervejeira relacionado a fungos e micotoxinas e a eficiência do tratamento com gás ozônio como agente descontaminante.

Específicos

- Avaliar a presença de fungos toxigênicos e de micotoxinas (DON e FBs) em grãos de cevada cervejeira.
- Determinar a eficiência do gás ozônio na destruição de fungos (*F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. poae*, *F. oxysporum* e *F. semitectum*).
- Avaliar a germinação dos grãos após tratamento com gás ozônio.
- Avaliar a segurança da cerveja artesanal (Santa Catarina) no que diz respeito às micotoxinas DON e FB₁.
- Analisar as características microestruturais de 5 cultivares de cevada cervejeira por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a composição química (proteínas, β -glucanas, amido, umidade, cinzas) e correlacioná-las com a qualidade do malte a ser produzido.

CAPITULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CEVADA

1.1.1 *Cevada 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. (POELHMAN, 1985; HOSENEY, 1994).

As características composicionais desejáveis da cevada cervejeira, de duas ou de seis fileiras, são: alto conteúdo de amido (61%), baixo teor de proteínas (<11,5%) e β -glucanas (3,3-4,5%). Destes compostos depende, em grande parte, a eficiência da maltagem e do processamento da cerveja (BOHATCH, 1994; HOUGH, 1990). 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 sanidade dos grãos.

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) (Figura 1), 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.

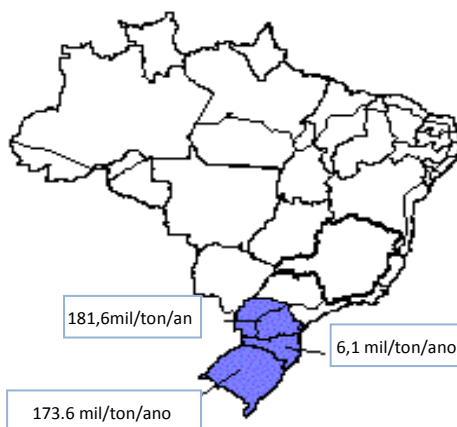


Figura 1. Produção de cevada cervejeira no Brasil no ano de 2012

1.1.2 Características do grão

A cevada é considerada um cereal de inverno a qual pertence ao gênero *Hordeum*. A espécie economicamente mais importante e que deve ser destacada é a *Hordeum vulgare* L. (FOSTER et al., 2007). A planta pode chegar a até 1 metro de altura (GONÇALVES, 2002; MAYER, 2007), e o grão pode medir de 8 à 14 milímetros de comprimento, 1,5 a 4,5 milímetros de largura, peso de mil grãos médio de 35g e formado alongado (KENT, 1987).

Estruturalmente, a cevada é composta de uma cariópside, ou seja, uma semente formada por casca, pericarpo, camada de aleurona, gérmen e endosperma, conforme pode ser observado na Figura 1 (VAN DEN BOOM et al., 2006; FULCHER; IRVING; DE FRANCISCO, 1989). A casca e o pericarpo são a parte exterior da semente e apresentam função protetora contra contaminação por fungos e insetos e ainda regulam a absorção de água durante a germinação (MCENTYRE et al., 1998). São ricos em fibra alimentar, vitaminas do complexo B e minerais (OSCARSON et al., 1996). Como a casca é utilizada como coadjuvante de filtração no processo de fabricação da cerveja (HOSENEY, 1994), a cevada nua não é recomendada para fins cervejeiros (KENT, 1987).

O gérmen está localizado na ligação terminal da cariópside, no lado dorsal do grão. É rico em sais minerais e vitaminas do complexo B (RAMUSSON, 1985).

O endosperma que consiste basicamente em amido embebido em uma matriz proteica, é a principal reserva de nutrientes do grão (HOSENEY, 1991), além de pequenas quantidades de minerais e vitaminas (ANDERSON; SMITH; GUSTAFSON, 1994). Devido à sua riqueza em polissacarídios, o endosperma da cevada tem grande importância na indústria cervejeira porque proporciona os substratos necessários para a conversão de açúcares em álcool no processo de fermentação da cerveja (MACGREGOR; FINCHER, 1993; BRENNAN et al., 1997).

Na região periférica do endosperma encontra-se a camada de aleurona, que é constituída por células de tamanho pequeno, ricas em proteína, ácido fítico, fósforo e niacina (GALLANT et al., 199) e isentas de grânulos de amido (HOUGH, 1990). Essa estrutura juntamente com o embrião controlam os processos fisiológicos relacionados com a produção e liberação de enzimas (α -amilase, β -glucanase e endoprotease), bem como o grau de hidrólise das paredes celulares do endosperma durante a germinação (PALMER, 1999; BRENNAN et al., 1996; DUFFUS; COCHRANE, 1993). A camada de aleurona localizada nas duas ou três camadas mais externas do grão é composta por uma parede celular grossa a qual é formada por arabinoxilana (85%), celulose (8%) e proteína (6%) (KENT, 1987).

Com base em um corte longitudinal e transversal de um grão de cevada (Figura 2), é possível observar o embrião, que está situado na parte arredondada ou dorsal do grão. Separando o embrião do endosperma, encontra-se uma estrutura denominada escutelo, que tem função secretora, permitindo a liberação de enzimas hidrolíticas do embrião ao endosperma amiláceo (HOUGH, 1990).

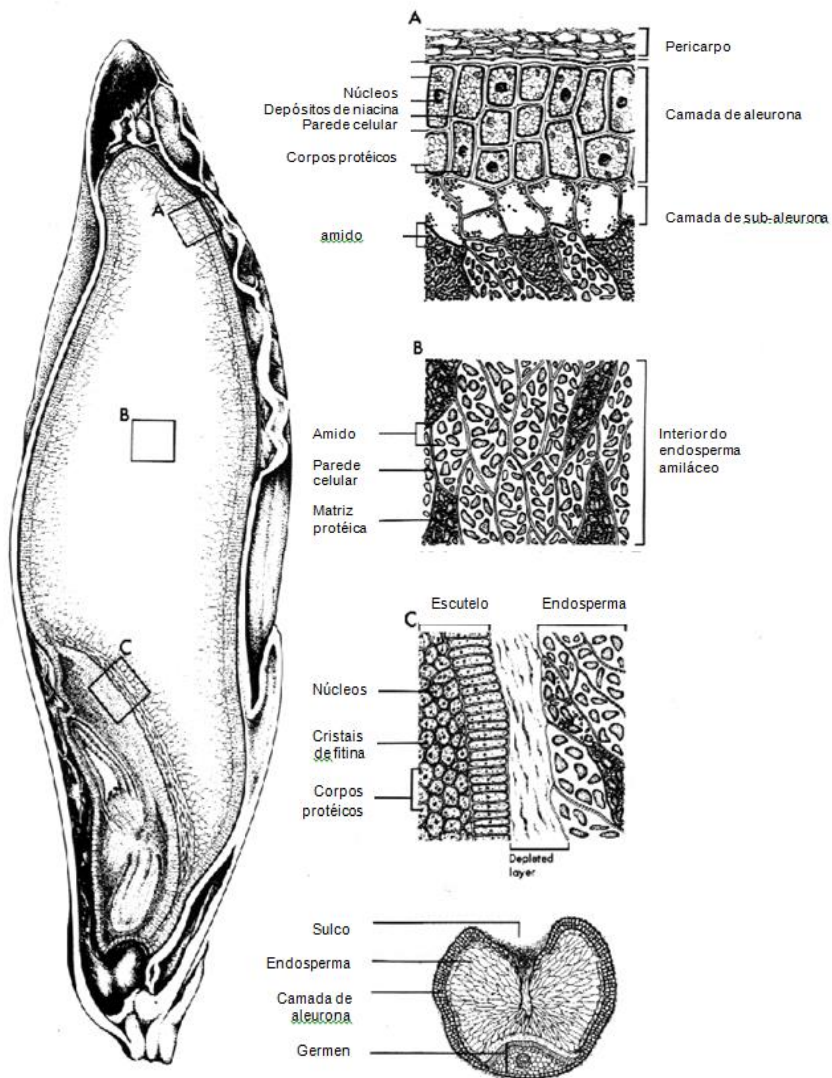


Figura 2 Estrutura do Grão de Cevada
 Fonte: Fulcher, Irving e de Francisco (1989).

1.1.3 Composição química da cevada

A maior fonte de energia do grão de cevada são os carboidratos, as quais representam cerca de 80% do peso seco do grão e estão localizados principalmente no endosperma (MACGREGOR; FINCHER, 1993). O maior componente da cevada é o amido, seguido pelas fibras alimentares e pelas proteínas. Outros constituintes como açúcares (frutose, sacarose e glicose) também fazem parte da composição do grão (MACGREGOR; FINCHER, 1993).

A composição química da cevada cervejeira varia entre cultivares e depende de diversos fatores externos (PALMER, 1989; AMAN; NEWMAN, 1986; OSCARSSON et al., 1995). O clima seco, por exemplo, aumenta os teores de proteínas, β -glucanas e dureza do grão (MUNCK, 1991).

Na Tabela 1 podem ser observados valores médios no que se refere a composição química da cevada cervejeira de acordo com alguns autores (AMAN; NEWMAN (1986), PALMER (1989), OSCARSSON et al., (1995)).

Tabela 1. Composição química média do grão de cevada cervejeira (% base seca) de acordo com diferentes autores

Componente	Åman; Newman, 1986	Palmer, 1989	Oscarsson et al., 1995
Amido	53,0 – 61,0	65,0	49,4 - 63,1
Proteína	12,0 - 17,0	10,0	9,3 - 15,5
Lipídios	2,1 - 3,7	3,5	2,1 - 3,1
Fibra alimentar	18,0 – 23,0	-	18,1 - 27,5
β -glucanas	-	3,0-4,5	3,8 - 7,9
Cinzas	2,3 - 4,0	-	1,9 – 2,4

1.1.3.1 Amido

O amido é o polissacarídeo que se encontra em maior proporção no grão de cevada. Está armazenado no endosperma em forma de duas populações de grânulos e que se apresentam embebidos numa matriz de proteína. Os grânulos grandes, Tipo A (15-25 μ m), constituem 90% do peso do amido no grão, enquanto os pequenos ou Tipo B (2-5 μ m) constituem os 10% restantes (BRENNAN et al., 1996; PALMER, 1989;

TANG et al.,2000). O tamanho, distribuição e proporção dos grânulos tipo A e tipo B dentro do endosperma podem estar relacionados com a origem genética (TANG et al., 2000).

O amido é constituído basicamente por dois tipos de polímeros α -D-glucose: a amilose de cadeia linear e ligações α -(1 \rightarrow 4) e a amilopectina de cadeia ramificada com ligações α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6). Estes polímeros são degradados principalmente por duas enzimas amilolíticas, α -amilase e β -amilase. A α -amilase cliva as ligações α -(1 \rightarrow 4) dos dois polímeros, enquanto que a β -amilase degrada os finais redutores do amido, liberando maltose (GEORG-KRAEMER et al., 2001; HOSENEY, 1994). Estas enzimas chamadas também de enzimas do sistema diastásico têm grande importância na fermentação da cerveja, pois hidrolisam o amido em açúcares fermentescíveis (GEORG-KRAEMER et al., 2001).

1.1.3.2 Proteína

A maior concentração (10-12%) de proteínas da cevada encontra-se no endosperma na forma de uma matriz protéica (MACGREGOR; FINCHER, 1993) cuja quantidade e consistência variam dependendo das condições ambientais e de cultivo. Como exemplo, o uso de fertilizantes nitrogenados de forma incorreta pode aumentar o teor de proteínas do grão, chegando a níveis maiores que 12% (Embrapa, 2014). Valores acima disso, são indesejados pela indústria cervejeira, pois prolongam o processo de malteação do grão e consequentemente levam a produção de cervejas com baixa estabilidade (HOUGH, 1990; BERTHOLDSSON, 1999; HOWARD et al., 1996; EAGLES et al., 1995).

De acordo com Newman e McGuire (1985), as proteínas da cevada podem ser classificadas de acordo com a solubilidade. As albuminas que são hidrosolúveis e as globulinas que são solúveis em soluções salinas diluídas, são proteínas fisiologicamente ativas (enzimas) e estão localizadas na camada de aleurona e no germe. As proteínas de reserva são constituídas pelas glutelinas (solúveis em ácidos e bases diluídas) e as prolaminas ou hordeínas (solúveis em álcool 70%). Este último grupo encontra-se formando a matriz protéica do endosperma da cevada (SHEWRY, 1993; HOWARD et al., 1996). Com exceção da aveia, as prolaminas procedentes da cevada, do trigo e do centeio são responsáveis pela intolerância produzida em indivíduos com doença celíaca (LIBARDONI, 2001).

As hordeínas compreendem uma mistura de peptídeos que podem ser divididos em quatro frações: B, C, γ e D (SHEWRY, 1993). A fração D (elevado peso molecular), por formar géis, exerce maior influência sobre a qualidade do malte apesar de corresponder a menos de 5% do total da fração protéica do grão (HOWARD et al. 1996; ECHART-ALMEIDA; CAVALLI-MOLINA, 2000).

Como todos os cereais, a cevada apresenta baixos níveis do aminoácido lisina, e também de treonina e metionina (HOSENEY, 1994). As proteínas de reserva caracterizam-se por conter altos níveis de glutamina e prolina (SHEWRY, 1993).

1.1.3.3 β -glucanas

As β -glucanas ((1,3)(1,4)- β -glucanas) são polímeros de glicose de estrutura linear, unidos por ligações glicosídicas β -(1,4) e β -(1,3). Estão localizadas principalmente nas paredes celulares da aveia e da cevada, sobretudo na camada de aleurona e sub-aleurona, em uma concentração de 4-5,5% e 3,8-7,9% respectivamente (de FRANCISCO; de SÁ, 2001; OSCARSSON et al., 1995). Caracterizam-se por serem solúveis em água e bases diluídas e pela tendência em formar géis. Estas propriedades físicas de viscosidade e solubilidade variam de acordo com sua estrutura e seu peso molecular (de FRANCISCO; de SÁ, 2001).

A enzima responsável pela hidrólise das β -glucanas é a endo- β -(1,3)(1,4)-glucanase, que se desenvolve durante a germinação da cevada (AASTRUP; ERDAL, 1980). De acordo com Knuckles e Chiu (1999), a atividade da β -glucanase varia levemente entre cultivares. Esta enzima cliva as ligações β -(1,4) das β -glucanas, ao mesmo tempo em que libera oligossacarídeos. A degradação destes componentes facilita a migração e ação das enzimas proteolíticas e amilolíticas no endosperma durante a maltagem (de FRANCISCO; de SÁ, 2001).

O tamanho do grão e a espessura das paredes celulares parecem estar relacionados com o conteúdo de β -glucanas. Quanto mais espessas maior o teor de β -glucanas e, portanto, maior o tamanho da semente (ELFVERSON,1999). As variações encontradas entre cultivares são o resultado das diferenças genéticas e ambientais. Esta propriedade pode ser aproveitada por malteadores na escolha de cevadas destinadas para maltagem (ELFVERSSON et al., 1999; ANDERSSON et al., 1999).

As β -glucanas são os principais componentes responsáveis pela demora no processo de filtração e pela turvação da cerveja (AASTRUP; ERDAL.1980). Além destes compostos, as arabinoxilanas, devido ao

seu alto grau de ligação com as β -glucanas, também ocasionam problemas de turvação (HAN, 2000). As arabinoxilanas estão localizadas na casca e nas paredes celulares da camada de aleurona da cevada em uma concentração de 4-11% (OSCARSSON et al., 1995).

1.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DO MALTE

A qualidade do malte está associada principalmente à composição do grão, à germinação e à produção de enzimas que degradam o amido, a proteína e os constituintes celulares do endosperma (MUNCK, 1991).

Industrialmente, as características físicas dos grãos são as primeiras a serem avaliadas. Os malteadores procuram grãos grandes com pouca casca visando diminuir as perdas devido ao baixo teor de amido presente (PALMER, 1989; ELFVERSON, et al., 1999).

A avaliação do Peso de Mil Sementes (PMS) pode dar uma ideia da qualidade das sementes, assim como de seu estado de maturidade e sanidade (BRASIL, 1992). Este parâmetro físico e a classificação permitem avaliar de forma subjetiva a composição química do grão. Cultivares com alto PMS tendem dar maior rendimento e apresentam altos teores de amido.

Além disso, há uma correlação negativa entre o teor de fibras alimentares e a qualidade da cevada para produção de cerveja. Durante a maltagem, as β -glucanas são degradadas pelas β -glucanases, de aproximadamente 3,8-7,9% (OSCARSSON et al., 1995) para 0,2-1,0% (PALMER, 1989). Se as β -glucanas não forem hidrolisadas totalmente, podem impedir a passagem das outras enzimas da porção frontal à porção distal dos grãos produzindo uma modificação irregular do endosperma (PALMER, 1989; PALMER, 1999; BRENNAN et al., 1997). Isto reduz o rendimento do mosto e pode resultar em possível turvação da cerveja, assim como num processamento menos eficiente com a obstrução dos filtros (AASTRUP; ERDAL, 1980; BAMFORTH; BARCLAY, 1993; MACGREGOR; FINCHER, 1993).

No que se refere às características químicas, dois componentes influenciam na qualidade da cevada cervejeira de maneira acentuada: proteínas e fibras. A distribuição das proteínas no endosperma dos grãos em geral é importante para diferentes processos, por exemplo, para moagem, panificação, maltagem e fermentação para produção de cerveja. Muito pouco se conhece sobre a localização e distribuição das diferentes frações protéicas dentro dos grãos. Para maltagem, a qualidade da cevada está negativamente correlacionada com a quantidade total de hordeínas, e também é afetada pela composição das

mesmas. A distribuição das hordeínas afeta a porcentagem de modificação (ou mudanças na textura) do endosperma dos grãos da cevada e a uniformidade desta modificação no lote (PALMER, 1999; AASTRUP; ERDAL, 1980; AASTRUP et al., 1981). Por produzir enzimas equilibradamente, a cevada é o cereal de preferência para produção de malte (PALMER, 1989; BAMFORTH, 1983; HOSENEY, 1994) e a qualidade deste está positivamente correlacionada com a quantidade e atividade das enzimas hidrolíticas: amilases, β -glucanases e proteinases.

A eficiência da modificação depende de vários fatores, que não estão totalmente elucidados. Dentre estes é possível destacar a distribuição da umidade através do endosperma, taxa de síntese de enzimas hidrolíticas, liberação destas enzimas dentro do endosperma e a estrutura do endosperma que determina resistência à modificação (BAMFORTH; BARCLAY, 1993).

Os métodos recomendados para avaliar a qualidade do malte, geralmente, não detectam eficientemente a falta de homogeneidade da degradação da proteína e das β -glucanas, sendo estes compostos os principais responsáveis pelos problemas associados à preparação da cerveja (PALMER, 2000). Portanto, a fim de garantir uma excelente qualidade do malte cervejeiro, fatores como variedade, viabilidade (número de sementes vivas), composição (amido, nitrogênio, β -glucanas), umidade, tamanho do grão e poder germinativo devem ser levados em consideração (PROUDLOVE et al., 1990).

No Brasil, a cevada cervejeira é avaliada com relação a 14 características do malte (poder diastásico, teor de proteínas, extrato, viscosidade, umidade, entre outros) e 10 características da planta como: poder germinativo, tamanho do grão, textura do endosperma, etc. (ECHART-ALMEIDA; CAVALLI-MOLINA, 2001). Embora estes parâmetros assumam grande importância na qualidade do malte, muitas vezes não garantem que a cevada esteja de acordo para o processo de fabricação da cerveja (PALMER, 2000). Além disso, é possível combinar os parâmetros supracitados com o estudo da microestrutura do grão.

1.3 PRODUÇÃO DE CERVEJAS

A partir de uma escolha adequada do malte, o processo seguinte, que é a fabricação da cerveja, torna-se viável e conseqüentemente

poderá resultar em um produto de qualidade, com grande aceitabilidade por parte dos consumidores.

Nessa seção, serão descritas as etapas principais da produção tradicional da cerveja, a qual se caracteriza por oito operações essenciais: moagem do malte, mosturação ou tratamento enzimático do mosto, filtração do mosto, fervura do mosto, tratamento do mosto, fermentação, maturação e finalmente clarificação. Figura 3. (PRIEST; STEWART 2006; VENTURINI FILHO, 2010).

1.3.1 Moagem do malte

A etapa de moagem do malte tem influencia direta sobre a rapidez das transformações físico-químicas, o rendimento, a clarificação e a qualidade do produto final (STEWART; RUSSELL, 1998). O objetivo é a redução do grão de malte de modo uniforme para obter: rompimento da casca no sentido longitudinal, expondo dessa forma o endosperma, porção interna do grão, a desintegração total do endosperma, promovendo uma melhor atuação enzimática e a produção mínima de farinha com granulometria muito fina, evitando a formação de substâncias que produzam uma quantidade excessiva de pasta dentro da solução. (BRIGGS et al., 2004; VENTURINI FILHO, 2010).

1.3.2 Mosturação

A mistura do malte moído juntamente com água em temperatura controlada, de acordo com um programa previamente estabelecido, tem como objetivo solubilizar as substâncias do malte diretamente solúveis em água e, com auxílio das enzimas, solubilizar as substâncias insolúveis, promovendo a gomificação e posterior hidrólise do amido a açúcares. (VENTURINI FILHO, 2010).

Nesse sentido, deve-se considerar que todo o processo enzimático depende da temperatura, do tempo, do grau de acidez e concentração do meio, qualidade do malte e constituição do produto da moagem. A escolha do tipo de maturação ou programa de tempo/temperatura a ser aplicado durante a atuação enzimática vai depender da composição e do tipo de cerveja desejado, agregando, por exemplo, conhecimentos do quanto de açúcares fermentes cíveis deseje-se ou do quanto de substâncias protéicas de alto peso molecular almeja-se pra o corpo da cerveja e consistência da espuma. A ação das enzimas produz um mosto que contem de 70-80% de carboidratos

fermentescíveis, incluindo glicose, maltose e maltotriose. (VENTURINI FILHO, 2010).

O malte moído é misturado com água a 35°C na proporção de 1:4. A operação é conduzida em tanques de aço inoxidável provido de agitadores, aquecimento, controladores e indicadores de temperatura e isolamento térmico. (VENTURINI FILHO, 2010).

Ao final da mosturação em 72°C é realizado o teste com solução de iodo 0,2N 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 até 76°C com o objetivo de inativar as enzimas presentes. (VENTURINI FILHO, 2010; ASBC, 1996).

1.3.3 Filtração do mosto

A filtração do mosto é realizada em um recipiente denominado *tina de filtração*, construído em aço inoxidável contendo agitador, disco filtrante, bomba centrífuga e isolamento térmico. Nesse etapa 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; VENTURINI FILHO, 2010).

1.3.4 Fervura

Na etapa seguinte com o crescimento do lúpulo, o mosto é filtrado e submetido a fervura, visando a inativação de enzimas, esterilização do mosto, coagulação protéica, 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. Quando há a utilização de adjuntos na forma de açúcar (xarope ou cristalizado), este deve ser acrescentado nesta etapa. O mosto é mantido em fervura até atingir a concentração desejada de açúcar para o início da fermentação, correspondendo a uma média de 60 à 90 min. (KUNZE, 1996; VENTURINI FILHO, 2010).

1.3.5 Tratamento do mosto

Após a fervura do mosto, o mesmo deve passar por etapas de retirada do precipitado, resfriamento e posterior aeração. Durante a primeira etapa, utilizados forças centrífugas por meio de rotação forçada do meio, precipitam-se os complexos de proteína, resinas e taninos denominados de *trub*, os quais sedimentam no fundo do tanque, sendo separados do mosto límpido. Posterior a retirada do *trub*, o mosto é resfriado até temperatura de fermentação. (VENTURINI FILHO, 2010).

1.3.6 Fermentação

O processo fermentativo consiste no ponto central para a produção de qualquer bebida alcoólica, possuindo como principal objetivo a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico pela levedura, sob condições anaeróbicas. (VENTURINI FILHO, 2010; MUNROE, 1994).

Todos os carboidratos fermentescíveis (maltose, maltotriose, glicose etc) são metabolizados pela levedura alcoólica. As leveduras produzem os compostos de aroma e sabor da cerveja como subprodutos de seu metabolismo, a qual os teores desses compostos variam com os padrões de crescimento celular que são influenciados pelas condições de processo. Com isso, a influência das condições de fermentação, tais como concentração e composição do mosto, temperatura e tração do processo fermentativo sobre as características organolépticas (PICKERELL et al., 1991).

Os mostos obtidos apenas a partir do malte contem como fonte de carbono os seguintes açúcares: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, além de dextrinas.

1.3.7 Maturação

A maturação (fermentação secundária) é necessária e importante, mas relativamente, poucas mudanças ocorrem durante este estágio. Entretanto, no processo tradicional de fabricação de cerveja, a fermentação secundária transcorre durante um longo tempo chegando a algumas semanas e até mesmo alguns meses para determinados tipos de cerveja. Os principais compostos formados na maturação são o diacetil

(que também é formado como subproduto na fermentação principal) e a pentanodiona. (MARTINS, 1991).

Durante o período de maturação são formados ésteres (acetato de etila e acetado de amila) responsáveis pelo aroma e sabor que caracterizam a cerveja. (VENTURINI FILHO, 2010).

1.3.8 Clarificação

Após a maturação, a cerveja contém leveduras, partículas coloidais dos complexos proteínas-polifenóis e outras substâncias insolúveis formadas, devido ao baixo pH existente e as baixas temperaturas utilizadas durante essa etapa. Portanto, para se obter um produto brilhante e límpido é necessária uma etapa de clarificação, prévia ao engarrafamento da cerveja, que permita remover esse material insolúvel.

Existem quatro técnicas básicas de clarificação que podem ser utilizadas tanto individualmente, como em combinação: sedimentação por gravidade, uso de agentes clarificantes, centrifugação e filtração. (VENTURINI FILHO, 2010).

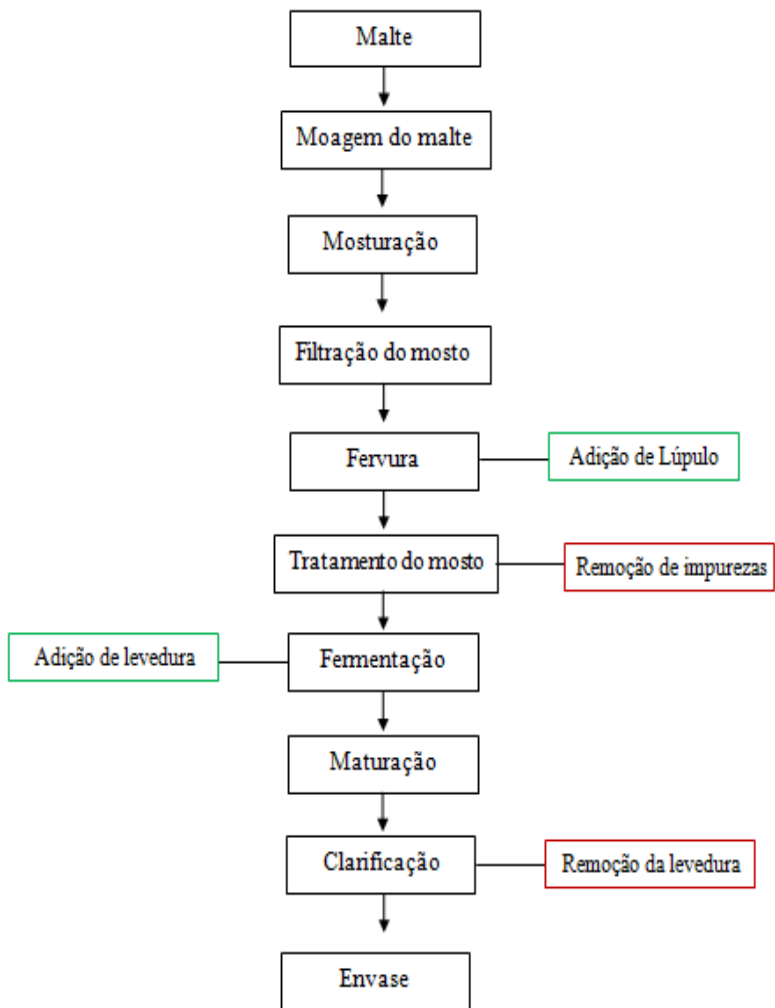


Figura 3. Fluxograma do processo de produção da cerveja

Fonte: Venturini Filho (2010)

1.4 PRINCIPAIS CONTAMINANTES DA CEVADA

1.4.1 Pragas e insetos

As pragas de campo mais comuns na cultura de cevada são os pulgões e as lagartas, as quais podem reduzir a produção de grãos, se não controladas adequadamente.

As espécies de pulgões mais encontradas em cevada são o *Metopolophium dirhodum*, *Schizaphis graminum*, *Sitobion avenae* e *Rhopalosiphum padi* (Hem., Aphididae). Estes causam danos diretos, que são caracterizados pela sucção da seiva da planta, o que pode reduzir o número de grãos por espiga, o tamanho do grão, o peso dos grãos e o poder germinativo das sementes. Além desses danos, os pulgões podem ser vetores de vírus, principalmente do *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDV), também conhecido por Vírus do Nanismo Amarelo da Cevada (VNAC). (BRASIL, 2014).

As lagartas que são outro problema comumente encontrado. Atacam a cultura a partir do mês de setembro podendo se prolongar até a maturação. As espécies de maior preocupação são a *Pseudaletia sequax* e *P. adultera* (Lep. Noctuidae). (BRASIL, 2014).

Outra praga que têm ocorrido e causado danos econômicos em algumas áreas são os corós. São conhecidos como larvas de solo e possuem hábitos alimentares e potencial de danos diferentes. As espécies-praga mais comumente encontradas são o coró-das-pastagens (*Diloboderus abderus*) e o coró-do-trigo (*Phyllophaga triticophaga*). Em geral, a infestação de corós ocorre em manchas na lavoura e varia muito de um ano para outro pois há a mortalidade natural, provocada por inimigos naturais, principalmente entomopatógenos, e por condições extremas de umidade do solo. Sistemas de rotação de culturas e de manejo de resíduos que reduzam a disponibilidade de palha no período de oviposição desfavorecem a espécie *D. abderus*. (BRASIL, 2014).

1.4.2 Fungos

Fungos, também denominados mofos ou bolores, são microrganismos eucarióticos, multicelulares e filamentosos. É de conhecimento secular que a atividade de fungos ocasiona alterações no sabor e na qualidade dos alimentos. Algumas destas alterações são desejáveis, como na fabricação de queijos. Contudo, em muitos casos, os fungos podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, que

são caracterizados em diferentes graus de deterioração (MAZIERO; BERSOT, 2010).

A infecção por fungos em sementes e grãos pode ocorrer em diversos estágios da cadeia alimentar; inicia-se no campo e continua durante a maturação, colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento, inclusive na armazenagem do produto já transformado. Ainda, é importante ressaltar que fungos são encontrados distribuídos no ar e no solo, com capacidade de contaminar e de se desenvolver em qualquer substrato que apresente condições favoráveis (SCUSSEL, 2002).

Os fungos são os principais responsáveis pela deterioração em partes de plantas, grãos e sementes após a colheita; são conhecidos como causadores de aquecimento em grãos e levam a perda do poder germinativo, descoloração, redução do valor nutricional, bem como a alterações no sabor e odor. A sua ação, mesmo quando ainda invisível, leva a grandes perdas na armazenagem e somente em um estágio mais avançado de deterioração é possível observar o prejuízo causado por eles (SCUSSEL, 2002).

Há uma variedade de fungos de campo, contudo os mais representativos são: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. São chamados de fungos de campo, pois invadem as sementes e grãos antes da colheita, enquanto as plantas estão ainda em crescimento. A microbiota fúngica é variável em função da espécie vegetal, localização geográfica e condições climáticas. Os fungos de armazenagem compreendem cerca de 10 a 15 grupos de espécies de *Aspergillus* (dos quais somente cinco ou seis são conhecidos como de deterioração) e várias espécies de *Penicillium*. Algumas espécies de *Penicillium* são fungos de campo e outras são de armazenagem. Encontram-se em grande número no ar, poeira, solo e nos resíduos de grãos e se desenvolvem tão logo estejam em condições adequadas de umidade e temperatura (SCUSSEL, 2002).

Além das espécies de fungos deteriorantes, os quais são considerados indicadores da qualidade de sementes e grãos armazenados, existem outra classe de fungos (também de campo ou de armazenagem) muito importantes por causarem danos à saúde, são os fungos micotoxigênicos. Alguns gêneros de fungos de campo (principalmente *Fusarium*) e de armazenagem (*Aspergillus* e *Penicillium*) podem produzir toxinas, denominadas genericamente de micotoxinas. Estes fungos, mesmo quando seu desenvolvimento não é acentuado, podem produzir estes compostos. Ainda, diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como

também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina (SCUSSEL, 2002; MAZIERO; BERSOT, 2010).

1.4.3 Micotoxinas

Para que ocorra a proliferação fúngica e a consequente produção de micotoxinas, são necessárias condições favoráveis de diversos fatores, tais como, umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox. A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Isso se deve, porque a maioria das micotoxinas são termoestáveis, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (MAZIERO; BERSOT, 2010).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma grande variedade de espécies de fungos que causam as perdas nutricionais e representam um risco significativo para a cadeia alimentar. Plantas de cereais podem ser contaminadas por micotoxinas de duas maneiras: fungos que crescem como patógenos em vegetais ou em vegetais durante o período de armazenagem. Portanto, 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 (DUARTE; PENA; LINO, 2010; MANKEVICIENÉ et al., 2011).

A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde animal e humana. Tais efeitos 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 freqüentemente os mais atingidos (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Em geral, as micotoxinas são categorizadas por espécies de fungos, estrutura e/ou modo de ação. Deve-se notar, no entanto, que uma única espécie de fungo pode produzir uma ou várias micotoxinas e cada micotoxina isolada pode ser produzida por diferentes espécies de fungos. Por exemplo, as aflatoxinas (AFLs) são produzidas por várias espécies de fungos, têm inúmeras variações estruturais, e têm diferentes

modos de ação dependendo do animal-alvo (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Alimentos humanos podem ser contaminados com micotoxinas em diferentes fases da cadeia alimentar e os gêneros de fungos micotoxigênicos mais importantes correspondem a *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps* e *Stachybotrys* (ZAIN, 2011).

A Food and Agriculture Organisation of the United Nation (FAO) estima que pelo menos 25 % dos grãos de cereais do mundo estão contaminados por micotoxinas. Estas 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 (SCUSSEL, 2002; LIU; GAO; YU, 2006).

1.4.3.1 Micotoxinas produzidas por fungos de campo

1.4.3.1.1 Deoxinivalenol

É uma micotoxina do tipo B dos tricotecenos produzidas por *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. avenaceum*, entre outras espécies. Ambas 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 na cadeia alimentar de animais e humanos diretamente. É uma das micotoxinas consideradas mais importantes dos cereais, e são encontradas em todo o mundo como contaminantes de trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e milho (MOSS, 2002).

Os principais efeitos toxigênicos de DON quando em doses baixas são diminuição de crescimento e anorexia, enquanto doses elevadas induzem vômitos, efeitos imunotóxicos e mudanças neuroquímicas no cérebro (WIJNANDS; VAN LEUSDEN, 2000). Efeitos tóxicos em animais tem sido bem documentados e focalizam principalmente o sistema imunológico e o trato gastrointestinal. Doses agudas são caracterizadas por efeitos como diarreia, vômito, leucocitose, hemorragia, choque circulatório, podendo levar a morte. As doses crônicas são caracterizadas por 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).

Entre os animais, os suínos são mais sensíveis ao DON do que aves, ratos e ruminantes, em parte por causa de suas diferenças no metabolismo, sendo os machos mais sensíveis que as fêmeas (DIEKMAN; GREEN, 1992; ROTTER; PRELUSKY; PESTKA, 1996).

1.4.3.1.2 Toxina T2

Pertence ao tipo A dos tricotecenos produzidos por *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. Acuminatum* e *F. langsethiae* (CREPPY, 2002; RABIE et al., 1986). Estes fungos estão associados aos cereais tanto no campo, quanto após a colheita, no armazenamento dos grãos (ERIKSEN, 2003; LARSEN et al., 2004). O *F. sporotrichioides*, por exemplo, cresce a temperatura de 2-35°C e com alta atividade de água (CREPPY, 2002). A temperatura ótima para a ocorrência de T-2 é relativamente baixa (8-14°C) (RABIE et al., 1986), esta toxina é geralmente encontrada em várias culturas de cereais, tais como trigo, milho, cevada, arroz, aveia e centeio (SCF, 2000).

Alimentos contaminados com T-2 podem causar efeitos graves na

saúde humana e dos animais, podendo levar até a morte (HOLT et al., 1988; MOSS, 2002). Sinais gerais de toxicidade incluem náuseas, vômitos, tonturas, calafrios, dor abdominal, diarreia, perda de peso, necrose dérmica, aborto, inibição da síntese de proteínas, sendo tóxicos para os sistemas hematológico e linfático, produzindo imunossupressão. Danos no fígado e pulmões, além de alterações proliferativas do epitélio do esôfago e estômago em roedores também são relatados (MOSS, 2002; OMURTAG; YAZICIOGLU, 2001; PACIN et al., 1994).

1.4.3.1.3 Fumonisinias

As FBs são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente por *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, além de *Alternaria alternata*. Estes fungos tem distribuição mundial, sendo considerados importantes patógenos de cereais em todas as fases de desenvolvimento, incluindo período de pós-colheita, durante armazenamento (DIAZ; BOERMANS, 1994). A FB₁ é a mais abundante e tóxica, representando 70% de contaminação total de alimentos naturalmente contaminados (MALLMAN et al., 2001).

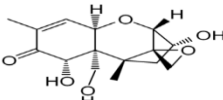
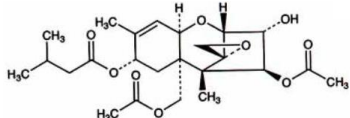
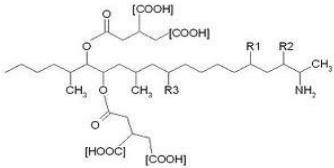
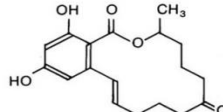
As FBs são responsáveis pela leucoencefalomácia em equinos e coelhos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos, efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e apoptose no fígado de ratos (POZZI et al., 2001). FBs são inibidoras específicas da ceramida sintase e seus efeitos tóxicos podem estar relacionados com sua capacidade em romper metabolismo de fosfolipídios, resultando em uma grande quantidade de problemas na regulação e comunicação celular. A *International Association on Research of Cancer* (IARC) classificou FBs e seus metabólitos como compostos de possível carcinogenicidade em humanos (IARC, 1993).

1.4.3.1.4 Zearalenona

A ZON é a micotoxina estrogênica mais estudada, é membro de um grande e variado grupo de compostos (estrogênicos) de estrutura semelhante e com propriedades farmacológicas. É não esteroidal e altamente termoestável, produzida por cepas de várias espécies do gênero *Fusarium*, incluindo *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, e *F. moniliforme*. Tal como acontece com outras micotoxinas, apenas algumas cepas de certas espécies podem produzir ZON (ALLDRICK; HAJŠELOVA, 2004). Está associada principalmente com culturas de cereais e seus subprodutos. Ainda que esta é considerada uma micotoxina de campo, há evidências de que esta micotoxina também possa ser produzida em grãos já colhidos (ALLDRICK; HAJŠELOVA, 2004; ZINEDINE et al., 2007a).

ZON tem uma baixa toxicidade aguda oral, sendo que em termos de toxicidade subaguda ou subcrônica, os efeitos da ZON parecem refletir sua capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio, levando a alterações no trato reprodutivo e umavariada de sintomas, incluindo: diminuição da fertilidade, aumento da reabsorção embriotal e redução da ninhada em animais, para humanos são poucos os dados disponíveis. A IARC concluiu que havia evidência limitada para avaliar a capacidade carcinogênica de ZON (IARC, 1993). Contudo, a *Scientific Committee on Food* (SCF) da União Européia observou a ocorrência de tumores em estudos clínicos devido às características estrogênicas da micotoxina (ALLDRICK; HAJŠELOVA, 2004; SCF, 2000; ZINEDINE et al., 2007a). Na Tabela 2. estão apresentados as estruturas químicas das micotoxinas de campo.

Tabela 2. Estrutura química das micotoxinas de campo

Micotoxina	Estruturas químicas	Fungo	Condições favoráveis	Órgãos alvos toxicidade
Micotoxinas de campo				
DON		<i>F. graminearum</i>	Temp.: 25°C Aw: 0.88 – 0.99	Fígado (vomitoxina).
T-2		<i>F. graminearum</i> <i>F. poae</i>	Temp.: 25°C Aw: 0.88 – 0.99	Sistemas hematológico e linfático.
FBs	 Fumonisina B ₁ : R1 = OH; R2 = OH; R3 = OH; Fumonisina B ₂ : R1 = OH; R2 = OH; R3 = H; Fumonisina B ₃ : R1 = H; R2 = OH; R3 = OH; Fumonisina B ₄ : R1 = H; R2 = OH; R3 = H;	<i>F. verticillioides</i>	Temp.: 25°C Aw: 0.90 – 0.99	Sistema nervoso, causam neoplasias.
ZON		<i>F. culmorum</i> e <i>F. graminearum</i>	Temp.: 25°C Aw: 0.88 – 0.99	Diminuição do potencial reprodutivo, infertilidade.

Na tabela 3 são apresentados dados de ocorrência mundial de micotoxinas em cevada.

Tabela 3. Ocorrência mundial das principais micotoxinas encontradas em grãos de cevada.

País	Frequência (%)	Min e Max. (µg/kg)	Média (µg/kg)	Referências
Fumonisinás				
Brasil	72.5%	50.30 – 908.47	-	Batatinha et al., 2007
Aflatoxinas B1				
Republica Tcheca	4.9%	0.13	0.39	Benesova et al., 2012
Ocratoxina A				
Republica Tcheca	39%	0.001	0.0544	Belakova et al., 2011
Deoxinivalenol				
Polônia	100%	0.025	-	Krysińska-Traczyk et al., 2007
Lituânia	96.4%	Tr – 372	-	Mankevičienė et al., 2007
Uruguai	54%	500 – 10.000	-	Pan et al., 2007
Noruega	17,2%	1440	-	Langseth et al., 1999
Etiópia	48,8%	40	-	Ayalew et al., 2006
Canadá	58%	980	-	Lombaert et al., 2003

1.5 LEGISLAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL

1.5.1 *Fungos*

No que diz respeito aos parâmetros microbiológicos relativos à contagem padrão em placa, não há uma resolução nacional que estabeleça um limite máximo para fungos em cereais como os grãos de cevada. Entretanto, a presença de fungos neste alimento, especialmente fungos toxigênicos podem ser indicativos de deterioração e contaminação por micotoxinas.

Dependendo do tipo de processamento realizado com a cevada, a contagem padrão de fungos e leveduras pode ser bastante diversificada, pois seu desenvolvimento irá depender do tipo de substrato e das condições ambientais.

1.5.2 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 (M_1 , B_1 , B_2 , G_1 , G_2), Ocratoxina A, Deoxinivalenol, Fumonisinias (B_1 e B_2), zearalenona e patulina.

Desde o ano de 2012 os limites máximos toleráveis das principais micotoxinas tem sido estabelecidos. Contudo, esses limites serão reduzidos e a indústria e os produtores de grãos deverão se adequar as novas normas sempre que ocorra escassez dos produtos.

Na Tabela 4 são apresentados os limites tolerados das micotoxinas que podem ser encontradas nos grãos de cevada, bem como em outros alimentos.

Tabela 4. Limites para micotoxinas em cevada malteada e outros produtos

MICOTOXINA	ALIMENTO	LMT (ug/kg)
Aplicação (desde 2012)		
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo	2000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
Aplicação (a partir de 2014)		
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo e incluindo cevada malteada	1250
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Aplicação (a partir de 2016)		
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo e incluindo cevada malteada	750
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada .	100

Fonte: Anvisa, 2011

No que diz respeito a legislação internacional para micotoxinas em cevada, os valores estabelecidos, estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5. Limites na legislação internacional para micotoxinas em cevada

MICOTOXINA	PAÍS	ALIMENTO	LMT
Deoxinivalenol	China	Cevada	1000
	União Europeia	Cevada	1750
	Rússia	Cevada	1000
Toxina T-2	Rússia	Cevada	100
Ocratoxina A	Rússia	Cevada	5

Fonte: EU, 2006; RU, 2001; CN, 2011.

Vale ressaltar que, ainda não existem limites máximos toleráveis para FBs em grãos de cevada, bem como DON e FBs 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.

1.6 GÁS OZÔNIO

O ozônio é um alótropo triatômico (O_3) composto por três átomos de oxigênio que se formam quando as moléculas de oxigênio se rompem devido a radiação ultravioleta e os átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio. Devido a maior estabilidade do oxigênio, a molécula de O_3 sofre um processo de dissociação espontânea com o tempo resultando novamente na formação do oxigênio (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991). A decomposição não resulta em espécies nocivas já que o mesmo é espontaneamente convertido em O_2 . Por ser instável, requer que ele seja produzido no seu local de aplicação reduzindo assim gastos e perigos relacionados como seu transporte e estocagem (ARMOR, 1999; TATAPUDI; FENTON, 1994).

A produção comercial do ozônio é realizada pelo processo de descarga elétrica, também chamado de corona (USEPA, 1999). Este processo é constituído por dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000 V). O ozônio é gerado

pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos. Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de O_2 , começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do O_2 e a consequente formação do O_3 (CULLEN et al., 2009; USEPA, 1999) (Figura 4).

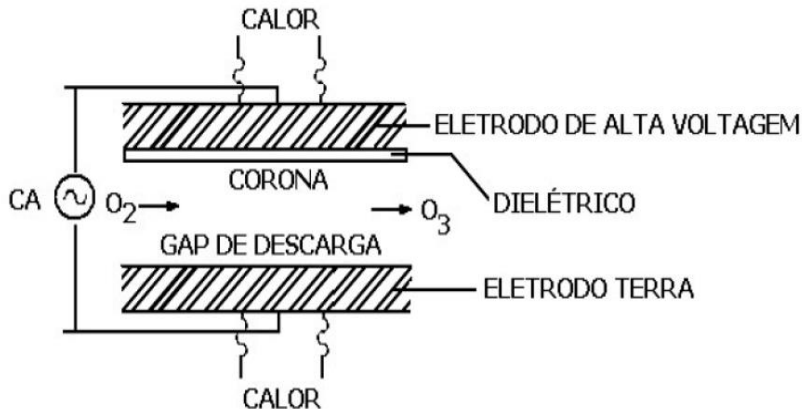


Figura 4. Gerador de ozônio tipo descarga corona. Adaptado de Usepa (1999).

O O_3 é um poderoso agente oxidante e desinfetante (GUZEL-SEYDİM; GREENE; SEYDİM, 2004; KEELS et al., 2001; MCKENZIE et al., 1998; MENDEZ et al., 2003) capaz de participar de um grande número de reações com compostos orgânicos e inorgânicos (ALMEIDA; ASSALIN; ROSA, 2004; KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). Pode reagir com a maioria dos compostos contendo ligações duplas, como $C=C$, $C=N$, $N=N$, etc., mas não com grupos funcionais contendo ligações simples, como $C-C$, $C-O$, $O-H$, etc (ALMEIDA; ASSALIN; ROSA, 2004; GOGATE; PANDIT, 2004). O gás O_3 é um poderoso germicida, empregado em engenharia sanitária para a desinfecção da água potável e na remoção de sabores e odores indesejáveis. Também é um gás oxidante, que tem inúmeras aplicações na indústria alimentícia pelas vantagens que apresenta nas técnicas de preservação.

O_3 foi reconhecido como seguro em 1997, sendo que em 26 de junho de 2001, o FDA publicou uma determinação oficial sobre a utilização do O_3 admissível como um agente antimicrobiano para o tratamento, armazenamento e processamento de alimentos em gás e uma fase aquosa em contato direto com os alimentos, incluindo as matérias-

primas, além de frutas e hortaliças minimamente processadas (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004). O O_3 já se mostrou eficaz contra um amplo espectro de micro-organismos, incluindo bactérias (KIM; YOUSEF, 2000; SHARMA et al., 2002; XU, 1999), fungos (PALOU et al., 2002; PEREZ et al., 1999) vírus e protozoários (CULLEN et al., 2009; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; RESTAINO et al., 1995). Além disso, também tem potencial para matar pragas de armazenagem (KELLS et al., 2001; MENDEZ et al., 2003), degradar micotoxinas (CULLEN et al., 2009), pesticidas e resíduos químicos (HWANG; CASH; ZABIK, 2001; ONG et al., 1996).

Na indústria alimentícia, o tratamento com ozônio vem sendo estudado com o intuito de melhorar a qualidade e evitar perdas quantitativas, devido à deterioração dos alimentos por fungos. O tratamento com gás ozônio tem demonstrado eficiência em reduzir contaminação por AFB_1 em figos secos (ZORLUGENÇ et al., 2008) e patulina em sucos de maçã (CATALDO, 2008). Pode desempenhar importante papel na qualidade de castanhas-do-Brasil, já que tem sido efetivo em inibir o crescimento fúngico e reduzir a contaminação por AFLs (SCUSSEL et al., 2011). Na Tabela 6 estão descritas as aplicações de O_3 para inibição de fungos em diferentes alimentos.

Tabela 6. Aplicações de ozônio para inibição de fungos em diferentes alimentos.

Alimento	Concentração O ₃ (ppm)	Tempo de Exposição (min)	Inibição	Referências
Redução de fungos				
Cevada	11 e 26	15	24 e 36% <i>Fusarium</i>	KOTTAPALLI; WOLF-HALL; SCHWARZ, 2003
Cevada	0.16	5	96% contagem total	ALLEN; WU; DOAN, 2003
Castanha do Brasil	31	300	100% contagem total	GIORDANO et al., 2010
Castanha do Brasil	10	90	100% contagem total	SCUSSEL et al., 2011
Figo	13.8	15	100% contagem total	ZORLUGENÇ et al., 2008
Figo	5 e 10	180 e 300	72% contagem total	ÖZTEKIN; ZORLUGENÇ; KIROGLU, 2006
Trigo	0.33	5	96% esporos	WU; DOAN; CUENCA, 2006

A eficácia do O₃ depende de vários fatores, incluindo a concentração de O₃ aplicada, as características de cada alimento e os fatores ambientais em que se encontram (temperatura e umidade). O excesso do ozônio é auto-decomposto rapidamente produzindo O₂ e assim não resta resíduo no alimento (NAITO; TAKAHARA, 2006). Esse gás demonstra ser uma alternativa potencial que oferece vantagens para melhorar a qualidade e a produção dos alimentos.

2 REFERÊNCIAS

AASTRUP, S. Selection and Characterization of Low β -glucan Mutants from Barley. **Carlsberg Research Communication**, n. 48, p. 307-316, 1983.

AASTRUP, S.; ERDAL, K. Quantitative Determination of endosperm Modification and its Relationship to the content of 1,3:1,4- β -Glucans during Malting of Barley. **Carlsberg Research Communication**, n. 45, p. 369-379, 1980.

AASTRUP, S.; GIBBONS, G. C.; MUNCK, L. A rapid method for estimating the degree of modification in barley malt by measurement of cell wall breakdown. **Carlsberg Research Communication**, n. 46, p. 77-86, 1981.

ALLDRICK, A.J.; HAJŠELOVA, M. Zearalenone. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Org.). **Mycotoxins in food**. Cambridge: Woodhead Publishing, cap.15, p.353-366, 2004.

ALLEN, B.; WU, J.N.; DOAN, H. Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 38, n.5, p. 617-630, 2003.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 818-824, 2004.

ÅMAN, P.; NEWMAN, W. Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, U.S.A. **Journal of Cereal Science**, v. 4, p. 133-141, 1986.

AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS. Methods of analysis of the American Society of brewing chemists. 8th ed. Minnesota: **ASBC, Technical Committee**; ASBC, Editorial Committee, 1996.

ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; GUSTAFSON, N. J. Health benefits and practical aspects of high-fiber diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p. 1242-1247, 1994.

ANDERSSON, A.A.M.; ANDERSSON, R.; AUTIO, K; ÅMAN, P. Chemical composition and microstructure of two naked waxy barleys. **Journal of Cereal Science**, v. 30, p. 183-191, 1999.

ARMOR, J.N. Striving for catalytically green processes in the 21st century. **Applied Catalysis A: General**,v.189, n.2, p. 153-162, 1999.

AYALEW, A.; FEHRMANN, H.; LEPSCHY, J.; BECK, R.; ABATE, D. Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. **Mycopathologia**, v. 162, p. 57-63, 2006.

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

BAMFORTH, C. W.; QUAIN, D. E. Enzymes in Brewing and Distilling. In: PALMER, G. H. **Cereal Science and Technology**. UK: Aberdeen University Press, 1983. p. 326-366.

BATATINHA, M. J. M.; SIMAS, M. M. S.; BOTURA, M. B.; BITENCOURT, T. C.; REIS, T.A.; CORREA, B. Fumonisin in brewers grain (barley) used as dairy cattle feed in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, 18, 608-612, 2007.

BELAKOVA, S.; BENESOVA, K.; MIKULIKOVA, R.; SVOBODA, Z. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chem.**, 126, 321-325, 2011.

BERTHOLDSSON, N.O. Characterization of malting barley cultivars with more or less stable grain protein content under varying

environmental conditions. **European Journal of Agronomy**, n. 10, p. 1-8. 1999.

BOHATCH, A. **Cerveja: fabricação em pequena escala**. Curitiba: 1994,74 p.

BRASIL, 2013. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Disponível em:<<http://www.cnpt.embrapa.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

BRASIL, 2014. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Cevada BR-2. Embrapa portal de pesquisa agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/pesquisa/tecnolog/cevada2.htm>> Acesso em: 20 de julho 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível em:<<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 23 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Regras para análise de sementes. Brasília. p. 365, 1992.

BRENNAN, C.S.; HARRIS, N.; SMITH, D.; SHEWRY, P.R. Structural differences in the mature endosperms of good and poor malting barley cultivars. **Journal of Cereal Science**, v. 24, p.171-177,1996.

BRENNAN, C.S; AMOR, M.A.; HARRIS, N.; SMITH, D.; CANTRELL, I.; GRIGGS, D. SHEWRY, P.R. Cultivar differences in modification patterns of protein and carbohydrate reserves during malting of barley. **Journal of Cereal Science**, v. 26, p. 83-93. 1997.

BRIGGS, D. E. et al., *Brewing : science and practise*. Cambridge: Woodhead Publishing, p. 1000, 2004.

CATALDO, F. Ozone Decomposition of Patulin-A Micotoxin and Food Contaminant. **Ozone: Science and Engineering**, v. 30, n.3, p. 197-201, 2008.

CHINA: GB 2761. (2011). Maximum Levels of Mycotoxins in Foods.

Commission of the European Communities, (2006). Commission regulation no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 364, 5.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 19-28, 2002.

CULLEN, P. J. et al., Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n.3-4, p. 125-136, 2009.

de FRANCISCO, A.; de SÁ, R. Beta-glucanas: localização, propriedades e utilização. LAJOLO, F.M, et al. In: Fibra dietética em Iberoamérica: tecnología y salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. São Paulo: Livraria Varela, p. 91-101. 2001.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H.J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: A review. **Veterinary Toxicology**, v. 36, n.6, p. 548-555, 1994.

DIEKMAN, M.A.; GREEN, M. L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Sciences**, v. 70, n.5, p. 1615-1627, 1992.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, n.2, p. 187-198, 2010.

DUFFUS, C.M; COCHRANE, M.P. Formation of the Barley Grain – Morphology, Physiology, and Biochemistry. In: MACGREGOR, A.W.; BHATTY, R.S. **Barley: Chemistry and Technology**. St. Paul,

Minnesota: American Association of Cereal Chemists Inc., 1993. p. 31-67.

EAGLES, H.A.; BEDGGOOD, A.G.; PANOZZO, J.F.; MARTIN, P.J. Cultivar and environmental effects on malting quality in barley. **Australian Journal of Agricultural Research**, n. 46, p. 831-844. 1995.

ECHART-ALMEIDA, C.; CAVALLI-MOLINA, S. Hordein polypeptide in relation to malting quality in Brazilian barley varieties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 36, n. 2, 2001.

ECHART-ALMEIDA, C.; CAVALLI-MOLINA, S. Hordein variation in Brazilian barley varieties (*Hordeum vulgare* L) and wild barley (*H. euclaston* Steud and *H. stenostachys* Godr.). **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, n. 2, p. 425-433. 2000.

ELFVERSON, C.; ANDERSSON, A.A.M.; ÅMAN, P.; REGNÉR, S. Chemical composition of barley cultivars fractionated by weighing, pneumatic classification, sieving, and sorting on a specific gravity table. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 76, n. 3, p. 434-438. 1999.

ERIKSEN, G.S. Metabolism and toxicity of Trichothecenes. **Doctoral thesis**, Uppsala, Sweden, 2003.

FORSTER, B. P. et al., The Barley Phytomer. **Annals of Botany**, v. 100, p. 725-733, 2007.

FULCHER, R. G.; IRVING, D.W.; DE FRANCISCO, A. Fluorescence microscopy: applications in food analysis. In: MUNCK, L.; de FRANCISCO, A. **Fluorescence Analysis in Foods**. U.K: Longman Scientific and Technical. p.59-109. 1989.

GALLANT, D.J.; de MONREDON, F.; BOUCHET, B.; TACON, P.; DELORT-LAVAL, J. Cytochemical study of intact and processed barley grain. **Options Méditerranéennes – Série Séminaires. New Trends in Barley Quality for Malting and Feeding**, n. 20, p. 31-34, 1991.

GEORG-KRAEMER, J.E.; MUNDSTOCK, E.C.; CAVALLI-MOLINA, S. Developmental expression of amylases during barley malting. **Journal of Cereal Science**, v. 33, p.279-288. 2001.

GIORDANO, B.N.E. et al., **Reduction of in-shell Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) aflatoxin contamination by ozone gas application during storage.** In: 10th International Working Conference on Stored Product Protection, 2010. Abstract book. Estoril: IWCSPP, p. 451, 2010.

GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. A review of technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. **Advances in Environmental Research**, v. 8, n.3-4, p. 501-551, 2004.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 37, n.4, p. 453-460, 2004.

HAN, J. Structural characteristics of arabinoxylan in barley, malt and beer. **Food Chemistry**, n. 70, p. 131-138. 2000.

HOLT, P.S. et al., Cytotoxic effect of T-2 mycotoxin on cells in culture as determined by a rapid colorimetric bioassay. **Toxicon**, v.26, n.6, p.549-558, 1988.

HOSENEY, R. C. Principios de Ciencia y Tecnologia de los Cereales. Zaragoza: Acribia, 1991.

HOSENEY, R.C. Principles of **Cereal Chemistry and Technology**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal chemists, Inc. v. 2, 1994.

HOUGH, J. S. **Biotecnología de la cerveza y de la malta**. Zaragoza: Acribia, p. 9-20, 1990.

HOWARD, K.A.; GAYLER, K.R.; EAGLES, H.A.; HALLORAN, G.M. The relationship between D Hordein and malting quality in barley. **Journal of Cereal Science**, v. 24, p. 47-53. 1996.

HUSSEIN S.; BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p.101-134, 2001.

HWANG, E.; CASH, J.N.; ZABIK, M.J. Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.49, n.6, 3127-3132, 2001

KELLS, S.A. et al., Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n.4, p. 371-382, 2001.

KENT, N. L. Tecnología de los cereales. **Introducción para Estudiantes de ciencia de los alimentos y agricultura**. Zaragoza: Acribia, 1987.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**, v. 66, n.9, p. 1242-1252, 2001.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**, v. 65, n.3, p.521-528, 2000.

KNUCKLES, B.E.; CHIU, M.M. β -Glucanase activity and molecular weight of β -glucans in barley after various treatments. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 76, n. 1, p. 92-95. 1999.

KOTTAPALLI, B.; WOLF-HALL, C.E.; SCHWARZ, P. Evaluation of gaseous ozone and hydrogen peroxide treatments for reducing *Fusarium* survival in malting barley. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1236-1240, 2005.

KRYSIŃSKA-TRACZYK, E.; PERKOWSKI, J.; DUTKIEWICZ, J. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in Eastern Poland. **Ann.Agric. Environ. Med.** v. 14, p. 159-167, 2007.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

KUNZE, W. Technology, brewing and malting. Berlin: VLB. p.726, 1996.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R.; Ozone in Water Treatment. Application and Engineering. **Lewis Publishers**, Chelsea: Michigan, 1991.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. **Mycopathologia**. v.147, p. 157-165, 1999.

LARSEN, J.C. et al., Workshop on trichothecenes with a focus on DON: Summary report. **Toxicology Letters**, v. 1, n.1, p. 22, 2004.

LIBARDONI, E. **Determinação de glúten em aveia e produtos derivados**. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

LIU, Z.; GAO, J.; YU, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, v. 42, n.4, p. 468-479, 2006.

LOMBAERT, G.A.; PELLAERS, P.; ROSCOE, V.; MANKOTIA, M.; NEIL, R.; SCOTT, P.M. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. **Food Addit. Contam.** v. 20, p. 494-504, 2003.

MacGREGOR, A. W.; FINCHER, G. B. Carbohydrates of the barley grain In: MacGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. **Barley: Chemistry and Technology**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc. p. 73-130, 1993.

MALLMANN, C. A. et al., Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n.1, p. 41-45, 2001.

MANKEVIČIENĖ, A.; BUTKUTĖ, B.; DABKEVIČIUS, Z.; SUPRONIENĖ, S. *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests. **Ann. Agric. Environ. Med.** v. 14, p. 103-107, 2007.

MANKEVICIENĖ, A.; BUTKUTĖ, B.; GAURILCIKIENĖ, I.; DABKEVICIUS, Z.; SUPRONIENĖ, S. Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. **Food Control**, v. 22, p. 970-976, 2011.

MARTINS, S. M. Como fabricar cerveja. 2ed. São Paulo: Ícone, p.77, 1991.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, p.89-99, 2010.

McENTYRE, E.; RUAN, R.; FULCHER, R.G. Comparison of water absorption patterns in two barley cultivars, using Magnetic Resonance Imaging. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 75, n. 6, p. 792-795.1998.

MCKENZIE, K.S. et al., Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**, v. 77, n.8, p. 1094-1102, 1998.

MENDEZ, F. et al., Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n.1, p. 33-34, 2003.

MOSS, M.O. Mycotoxin review-2. *Fusarium*. **Mycologist**. v. 16, p. 158-161, 2002.

MUNCK, L. Advances in barley quality. Experiences and Perspectives. **Options Méditerranéennes – Série Séminaires. New Trends in Barley Quality for Malting and Feeding**, n. 20, p. 9-18, 1991.

MUNROE, J. H. Fermentation. In: Hardwick, W. A. **Handbook of brewing**. New York: Marcel Dekker, p. 323 -353, 1994.

NEWMAN, C.W.; McGUIRE, C.F. Nutritional quality of barley. In: RASMUSSEN, D.C. **Barley**. Wisconsin, USA: American Society of Agronomy. Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. n. 26. 1985. p. 404.

OMURTAG, G.Z.; YAZICIOGLU, D. Occurrence of T-2 toxin in processed cereals and pulses in Turkey determined by HPLC and TLC. **Food Additives Contaminants**, v. 18, n.9, p. 844-849, 2001.

ONG, K.C. et al. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. **Food Chemistry**, v. 55, n.2, p. 153-160, 1996.

OSCARSSON, M.; ANDERSSON, R.; SALMONSSON, C.; ÅMAN, P. Chemical composition of barley samples focusing on dietary fiber components. **Journal of Cereal Science**, v. 24, p. 161-169, 1995.

OSCARSSON, M.; ANDERSSON, R.; SALOMONSSON, A. – C.; AMAN, P. Chemical Composition of Barley Samples Focusing on Dietary Fibre Components. *Journal of Cereal Science*, v. 24, p. 161-170, 1996.

ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENÇ, B.; KIROGLU ZORLUGENÇ, F. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n.3, p. 396-399, 2006.

PACIN, A. et al., Subclinic effect of the administration of T-2 toxin and nivalenol in mice. **Mycotoxin Research**, v. 10, n.2, p. 85-96, 1994.

PALMER, G. H. Cereals in Malting and Brewing. In: PALMER, G.H. **Cereal Science and Technology**. UK: Aberdeen University Press, p. 61-242, 1989

PALMER, G.H. Achieving Homogeneity in Malting. **European Brewery Congress Proceedings**, p. 323-363, 1999.

PALMER, G.H. Malt performance is more related to inhomogeneity of protein and –glucan breakdown than to Standard Malt Analyses. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 106. p. 189-192, 2000.

PALOU, L. et al. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p. 39-48, 2002.

PAN, D.; BONSIGNORE, F.; RIVAS, F.; PERERA, G.; BETTUCCI, L. Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. **Int. J. Food Microbiol.** v. 114, p. 149-152, 2007.

PEREZ, A.G. et al., Effect of ozone treatment on postharvest strawberry quality. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 47, n.4, p. 1652–1656, 1999.

- PESTKA, J.J.; A.T. SMOLINSKI. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, v. 8, n.1, p. 39-69, 2005.
- PICKERELL, A. T. W.; HWANG, A.; AXCELL, B. C. Impact of yeast-handling procedures on beer flavor development during fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, St Paul, v. 49, p. 87 -92, 1991.
- POEHLMAN, J.M. Adaptation and Distribution. In: RASMUSSEN, D.C. Barley. Wisconsin, USA: American Society of Agronomy. **Crop Science Society of America, Soil Science Society of America**. 1985.
- POZZI, C.R. et al., Effects of prolonged oral administration of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in rats. **Mycopathologia**, v. 151, n.1, p. 21-27, 2001.
- PRIEST, F. G.; STEWART, G.G. **Handbook of brewing**. Boca Raton: CRC. p. 853, 2006.
- PROUDLOVE, M.O.; DAVIES, N.L.; MCGILL, W. Quality requirements for malting barley and their measurement. **Ferment**. v. 3, n. 3. p.173-176. 1990.
- RABIE, C.J. et al., T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. **Applied Environmental Microbiology**, v. 52, n.3, p. 594-596, 1986.
- RAMUSSEN, D. C. Barley. U.S.A.: **American Society of Agronomy**, 1985.
- RESTAINO, L. et al., Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.9, p. 3471-3475, 1995.
- ROTTER, B.A.; PRELUSKY, D.B.; PESTKA, J.J. Invited review: toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 48, n.1, p. 1-34, 1996.

RUSSIA. 1. SanPin 2.3.2.1078-01 'Hygienic Requirements in respect of the Safety and Nutritional Value of Foodstuffs' of 14 November 2001, as amended; 2. Chapter 1 "Requirements for the safety and nutrition of foods" of the Unified Sanitary-Epidemiological and Hygiene Requirements of the Commission of the Customs Union of Russia, Belarus and Kazakhstan.

SCF. Scientific Committee on Food. **Opinion of the Scientific Committee on food on Fusarium Toxins**, 2000. Disponível em: <http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf>. Acesso em: 20 jun .2014.

SCUSSEL, V. M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Biogeneziz. p. 675-691, 2002.

SCUSSEL, V.M. et al., Effect of Oxygen-Reducing Atmospheres on the Safety of Packaged Shelled Brazil Nuts during storage. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2011, n.1, p. 9, 2011.

SHARMA, R.R. et al., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat Treatment. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.3, p. 447-451, 2002.

SHEWRY, P.R. Barley seed proteins. In: MACGREGOR, A.W.; BHATTY, R.S. Barley: Chemistry and Technology. St. Paul, Minnesota: **American Association of Cereal Chemists**. p. 131-183, 1993.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I. An introduction to brewing science & technology: series III: brewer's yeast. **London: Institute of Brewing**. p. 108,1998.

TANG, H; ANDO, H.; WATANABE; Some physicochemical properties of small, medium and large-granule starches in fractions of waxy barley grain. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 77, n. 1, p. 27-31. 2000.

TATAPUDI, P.; FENTON, J. M. Electrochemical oxidant generation for wastewater treatment. In: SEQUEIRA, C.A.C. **Environmental Oriented Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, p. 103-130, 1994.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**, 1999. Disponível em: <http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf>. Acesso em: 30 mai. 2008.

VAN DEN BOOM, A.; SERRA-MAJEM, L.; RIBAS, L.; NGO, J.; PÉREZ-RODRIGO, C.; ARANCETA, J.; FLETCHER, E. The contribution of ready-to-eat cereals to daily nutrient intake and breakfast quality in a mediterranean setting. **Journal of the American College of Nutrition**, v.25, p.135-143, 2006.

VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas alcoolicas: Ciência e tecnologia. São Paulo. v. 1, 2010.

WIJNANDS, L.M.; VAN LEUSDEN, F. M. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and biossays for their detection. RIVM report 257852 004, Bilthoven, 2000.

WU, J.N.; DOAN, H.; CUENCA, M.A. Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 7, p. 1288-1293, 2006.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. **Food Technology**, v.53, n.10, p. 58–61, 1999.

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

ZINEDINE, A. et al., Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p.1-18, 2007a.

ZORLUGENÇ, B. et al., The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B₁ in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3593-3597, 2008.

CAPÍTULO 2

QUALIDADE E OCORRÊNCIA DE DEOXINIVALENOL E FUMONISINAS EM CERVEJAS ARTESANAIS

ARTIGO PUBLICADO: Karim C. Piacentini, Geovana D. Savi, Gisele Olivo, Vildes M. Scussel. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. Food Control. 50, 925-929, 2015.

ABSTRACT

Beer is an alcoholic beverage consumed on a regular basis by many people around the world. Consequently, beer quality and, specifically, its impact on the future health of the consumer must be considered seriously. One issue is the action of mycotoxins and their impact on the beverage. In this sense, the objective of the present study was to determine the occurrence of Deoxynivalenol (DON) and Fumonisin B₁ (FB₁) in many artisanal beers from southern Brazil and, additionally, to evaluate their physico-chemical properties.

The methods applied for physico-chemical characteristics were from the AOAC and Adolfo Lutz Institute. The analyses for mycotoxins were conducted using high performance liquid chromatography with fluorescence detection for fumonisin B₁ and ultraviolet detection for deoxynivalenol. The physico-chemical results were in agreement with some studies and with Brazilian regulations. DON and FB₁ were present in 32 and 15.09 % of the samples, respectively. The concentrations found in craft beer from southern Brazil were probably caused by the widespread and high occurrence of these toxins in barley. Furthermore, the level of mycotoxins seem to be very stable during the brewing process.

Keywords: craft beer, mycotoxins, quality, barley

1 INTRODUCTION

Beer is an alcoholic beverage consumed on a regular basis by many people around the world. In Brazil, for instance, the average beer consumption recorded in 2008 was around 57 l per inhabitant (SINDICERV, 2014). Nowadays, consumption of craft beer has increased due to the different types available. Together with being smaller scale and independent, the main characteristic of the craft breweries is to put the emphasis on the flavor and brewing techniques (OLIVEIRA, 2011). Craft beer is a non-filtered and unpasteurized

product that maintains unaltered sensorial characteristics. When compared to industrial beers, craft beer is more subject to microbial contamination which may result in spoilage (turbidity, acidification and the production of undesired aromatic compounds) (GIOVENZANA et al., 2014).

Moreover, due to the absence of pasteurization and microfiltration in craft beer brewing, the need is much greater for quality measurements during the entire process and not only in finished beer. Monitoring must be performed on raw materials and at individual process stages. This also differs from industrial beers (BAMFORTH, 2003).

Beer quality is extremely important as problems with this may result in future diseases in the consumer population. In this sense, it is possible to highlight the action of mycotoxins and their impact on the beverage.

All mycotoxins are naturally occurring secondary metabolites of filamentous fungi and they can be produced in a large range of agricultural commodities, (BERTUZZI et al., 2011) mainly associated with cereal crops, in particular corn, wheat, barley, rye, rice and oats (OSMURTAG et al., 2006; GOYARTS et al., 2007).

As beer production requires the use of barley grains and these may have been exposed to mycotoxins, a number of studies have been carried out to detect these in commercially available beers (SCOTT, 1996; KAWASHIMA et al., 2007; BENESOVA et al., 2012). In summary, results showed that the deoxynivalenol (DON), nivalenol, T-2, HT-2, diacetoxyscirpenol, zearalenone, aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins have been detected in beers at trace (ppb) levels.

DON, known colloquially as “vomitoxin” (CANADY et al., 2001), is one of the mycotoxins most found in barley and it is produced mainly by *Fusarium graminearum* (PETSKA, 2007). The exposure of DON in human and animal bodies through ingestion of contaminated food can cause acute and chronic effects such as immunosuppression, neurotoxicity, embryotoxicity and teratogenicity (PESTKA, 2007; ROTTER; PRELUSKY; PESTKA, 1996; WIJNANDS; VAN LEUSDEN, 2000).

Furthermore, another important problem found concerning DON presence in beer is “gushing”, i.e. excessive foaming and overflowing on opening a bottle. This has been reported frequently in the last few years and can seriously damage the beer quality and the reputation of the brewery.

Another relevant mycotoxin group that can be found in barley and, consequently, in beer are the FBs (FB₁ and FB₂). These are produced by a number of *Fusarium* species, notably *F.verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. nygamai* as well as *Alternaria alternata f. sp. lycopersici* (BENNETT, 2003). *F. verticillioides* produces several mycotoxins however, the most prominent is fumonisin B₁ (FB₁) (CIACCI-ZANELLA, 1998). This mycotoxin can be introduced in beer, either from contaminated input materials or from adjuncts added during the brewing process. Generally, corn starch and corn syrup are among the adjuncts alternatively used for beer production (HLYWKA, 1999).

With respect to the mycotoxins produced by *Fusarium*, it is possible to say that they are produced mainly in the field, although some toxin synthesis may occur during storage, or also, in the case of beer, they can increase during the germination of the barley during the malting and brewing process of the beer (PIETRI et al., 2010; BEATTIE et al., 1998; LANCOVA et al., 2008; WOLF-HALL, 2007). Basically, the temperature and moisture conditions are crucial factors and thereby affect the fungal infection and toxin synthesis (DOYLE, 1997).

In 2012, the Brazilian regulations proposed a maximum tolerable level (MTL) of 1750 µg/kg for DON in malted barley grains. The limit will be decreased over time to allow grain producers and the industry to adapt to the legislation without causing a shortage of barley. As of January 2017, DON limits for malted barley will be set at 750 µg/kg (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013).

Currently, the limit fixed by the Commission of the European Communities for DON is equal to 1750 µg/kg for cereals and sub products (EUROPEAN COMMISSION, 2006). It is important to emphasize that there is no specific legislation for fumonisins neither in barley nor for the mycotoxins detected in beer around the world. Furthermore, to our knowledge no research study has examined mycotoxins in craft beer in Brazil or internationally.

For the reasons stated above, the aim of the present study was to determine the occurrence of DON and FB₁ in craft beers from southern Brazil and their quality, regarding the physic-chemical characteristics.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 MATERIALS

2.1.1 Samples

In the first months of 2014, 53 craft beer samples (one bottle each), consisting of 14 different brands, were collected in breweries and local stores in southern Brazil and kept under refrigeration at 7° and in the dark until analysis. The samples consisted of 25 ale beers and 28 lager beers.

2.1.2 Chemicals and Standards

For physical and chemical analyses, sodium hydroxide and phenolphthalein analar grade were obtained from Biotec (Pinhais, PR, Brazil). For HPLC analyses, acetonitrile, methanol and acetic acid were obtained from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil), all of which were LC grade. Sodium hydroxide was from Biotec (Pinhais, PR, Brazil) and OPA reagent (40 mg o-ftaldialdehyde in 1 ml ethanol diluted with 5ml 0.1 M borate buffer and 50 µl 2-mercaptoethanol) was from Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). High-purity Milli-Q water (18.2 MΩ/cm) was obtained from the Millipore Synergy system (MA, USA). The standards, DON and FB₁, were obtained from Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). A stock solution of DON was prepared by dissolving 1 mg in DON in 1 ml of acetonitrile. The standard curve solutions were prepared from appropriate dilutions of the stock solutions (200 µg/ml) with Mili-Q water (0.15 to 15 µg/ml). A stock solution of FB₁ was prepared by dissolving 1 mg in FB₁ in 1 ml of methanol. The standard curve solutions were prepared from appropriate dilutions of the stock solutions (50 µg/ml) with methanol (0.005 to 2.5 µg/ml). *Other materials used:* immunoaffinity columns from DON-test Vicam (Milford, MA, USA), strong anion exchange SPE columns (6 cm³, 500 mg⁻¹, SAX, Phenomenex, USA) and diatomaceous earth.

2.1.3 Equipments

The following equipment was required for the physical and chemical tests: pH meter (Digimed DM 20, São Paulo, SP, Brazil), water bath (Nova Técnica, Piracicaba, SP, Brazil) and a drying oven (Olided –cz, Ribeirão Preto, SP, Brazil).

The determination of DON and FBs levels was carried out by a high performance liquid chromatography (HPLC) model 321, Gilson (Middleton, WI, USA), equipped with an isocratic pump model 805, manual injector (20µl loop) with an ultraviolet –visible (UV) detector model 118 and fluorescence detector model 121. The chromatographic columns used were C₁₈ reversed-phase (Synergi 4 µm particle size, with

250 x 4.60 mm, length and diameter, respectively), model Fusion-RP 80, Phenomenex (Torrance, USA) for DON and C₁₈ reversed-phase (particle size 5 µm, with 150 and 4.60 mm), model Luna (Torrance, USA), for FB₁.

2.2 METHODS

2.2.1 Physical and chemical analyses

To accomplish the physical and chemical analyses, each bottled beer sample was gently mixed and approximately 200 ml were degassed by ultrasonic bath.

2.2.1.1 pH

The pH tests were in accordance with the AOAC Method 945.10 (2012) for beer, using a pH/reference electrode system.

2.2.1.2 Acidity

The acidity analyses were in accordance with the AOAC Official Method 950.07 (2012) for beer. In short, 10 ml of previously decarbonated beer, 50 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.5 % phenolphthalein were added to a flask. After this first step, the sample was titrated with 0.1 N NaOH to first appearance of faint pink.

2.2.1.3 Real extract

The determination of the real extract is in accordance with the Adolfo Lutz Institute method (IAL 2008) and it is based on the dry residue weight of a certain volume of samples submitted to evaporation.

2.2.2 Fumonisin (FB₁) determination

To perform the FB₁ analyses, the AOAC Official Methods of Analysis 995.15 (AOAC, 2005), originally developed for corn and its products with modifications, was used as follows: Briefly, the pH of craft beer samples was brought to a 5.8 – 6.5 range with 1 N NaOH and the samples were filtered through qualitative filter paper. For sample cleanup and concentration, a 50 ml aliquot of beer was applied to a strong anion exchange SPE column (6 cm³, 500 mg⁻¹, SAX,

Phenomenex, USA), previously conditioned with 10 ml of methanol, followed by 10 ml of methanol:water (3:1). The sample was followed by 10 ml of methanol:water (3:1) and 6 ml of methanol. FB₁ was eluted with 10 ml of methanol:acetic acid (95:5). The elution was dried under a nitrogen stream at 60 °C.

The dried extract was suspended in 300 µl of acetonitrile:water (1:1) and was cleaned with a syringe filter (0.45 µm, 13mm, CA membrane) and dried under a nitrogen stream at 60 °C. The dried extract was then suspended in 100 µl aliquot of methanol and transferred to a reaction vessel and 200µl of OPA reagent was added. After 60 seconds reaction time, 20 µl of the derivatized sample was injected into a LC-FLD at 335 and 440 nm for excitation and emission, respectively. The mobile phase was methanol: sodium dihydrogen phosphate (77:23, v/v) adjusted to pH 3.3 with H₃PO₄ at a flow rate of 1 ml/min.

2.2.3 Deoxynivalenol analyses

The craft beer samples were analysed using immunoaffinity columns for the cleaning step and LC/UV for detection, according to the Vicam protocol DON test, N_o G1005 USA (Vicom 2013), with some modifications. In short, 84 ml of acetonitrile and 3.2 g of diatomaceous earth were added to 16 ml of a degassed sample and mixed for 5 min and then filtered through a Whatman no. 4 filter paper.

For sample cleanup and concentration, an aliquot of 1ml of the extract was applied to an immunoaffinity column (DONTest HPLC) at a flow rate of one drop per second. This column was previously conditioned with 1 ml of LC grade water. The sample was followed by 2.5 ml of LC grade water to wash the column and the toxin was slowly eluted with 2 ml of 100 % LC grade methanol. The eluate was evaporated using a heating block device at 40 °C in a gentle nitrogen stream and then the dry residue was redissolved in 100 µl of mobile phase acetonitrile:water (10:90, v/v). The extract (20 µl) was injected into the LC/UV System set at a wave length of 218 nm and the mobile phase was delivered at a constant flow rate of 0.8 ml/min.

3 RESULTS

3.1 PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS

The physical and chemical analyses are extremely important to the quality of the beer and, consequently, for consumer acceptability. In

this paper, the pH, the acidity and the real extract of the beers analysed are also shown in Table 1, in terms of mean and standard deviation according to beer type.

Beer Type	Samples	pH	Acidity (% lactic acid)	Real Extract
Ale	25	4.55 ± 0.27	0.26 ± 0.06	5.40 ± 1.48
Lager	28	4.74 ± 0.21	0.24 ± 0.07	5.17 ± 1.59

Table 1. Physico-chemical characteristics of the craft beer.

3.2 MYCOTOXINS

3.2.1 Don analyses

The LC/UV method for DON chromatographic separation and the validation parameters obtained (linearity, limit of detection – LOD, limit of quantification – LOQ reproducibility, repeatability and recovery), were adequate. For instance, under the chromatographic conditions used, the DON retention time (Rt) was equal to 14 ± 0.5 min. Linearity was confirmed using the calibration curve for each DON concentration; i.e., it was linear from 0.15 to 15 µg/ml (correlation coefficient 0.996). The LOD (signal to noise ratio = 3) and LOQ (signal to noise ratio = 10) were 67 and 119 µg/l, respectively. Recovery experiments were conducted by spiking blank beer with 200 µl of DON stock solution at concentrations of 80, 160 and 250 µg/l and performed with the same HPLC system. The extraction was carried out according to the methodology previously mentioned and the eluate (2 ml) was evaporated with nitrogen at 60 °C for 10 min until dry. A duplicate analysis was conducted.

The recovery experiments showed yields of 99.9, 99.9 and 96.0 % for concentrations of 80, 160 and 250 µg/l, respectively. The mean recovery rate for the extraction method was 97.9 %.

In the present study, DON was detected in approximately 32 % (17 of 53 samples) of the samples, with levels ranging from 127 µg/l to 501 µg/l (mean 221 µg/l). The descriptive statistics are shown in Table 2.

Samples	Range of positive samples (µg/l)^a	Mean of positive samples (µg/l)	Median of positive samples (µg/l)	Maximum Value (µg/l)
Deoxynivalenol				
17	127 – 501	221	177	501
Total: 17				
Fumonisin FB₁				
8	29 – 285	105	90	285
Total: 8				

^a > method LOQ 119 µg/l for deoxynivalenol and 21.0 µg/l for fumonisin B₁
Table 2. Descriptive statistics for concentrations of DON and FB₁ in craft beer.

3.2.2 FB₁ analyses

The method applied for FB₁ was successfully validated under laboratory conditions. The validation criteria were linearity, selectivity, reproducibility, limits of detection and quantification (LOD and LOQ, respectively) and recovery. The retention time (rt) of FB₁ was 5.5 min ± 0.5. Linearity was confirmed by constructing a calibration curve for FB₁ ranging from 0.005 – 2.5 µg/ml, which showed coefficients of correlation $r^2 = 0.990$ for FB₁. The LOD (signal noise ratio = 3) was 6.6 µg/l, and LOQ (signal noise ratio = 10) was 21.0 µg/l. Recovery experiments were conducted by spiking blank beer with 500 µl of the FB₁ stock solution at concentrations of 35 and 70 µg/l, on the same day and with the same HPLC system. The extraction was carried out according to the methodology previously mentioned and the eluate (10 ml) was evaporated with nitrogen at 60 °C for 10 min until dry. A duplicate analysis was performed. The recoveries ranged from 99.1 % to 99.7 % for 35 and 70 µg/l, with an overall mean of 99.4%.

For FB₁, 8 (15.09 %) samples were contaminated with levels ranging from 29 µg/l to 285 µg/l. The descriptive statistics are detailed in Table 2.

4 DISCUSSION

Firstly, it is important to mention that the pH for beer is essential because it has an influence on several factors such as microorganism growth, color intensity, enzymatic activity, flavor and oxy-reduction potential, as discussed in Oliveira (2011). The results of the pH analyses for both beer types are in accordance with Compton (1978) with values ranging from 3.8 and 4.7, which determine a great parameter for the beer quality. Moreover, a survey carried out by Sleiman and Venturini in 2004 also showed pH levels similar to those found in our study and those stated by Compton (1978).

In addition, the results concerning the acidity and real extract analyses are in agreement with the Brazilian regulation established by Anvisa decree n^o 2.314/1997 (Brasil, 1997).

With respect to DON, which is considered one of the mycotoxins most found in cereals in the world, especially in barley, the study was able to demonstrate that the contamination levels must be monitored especially in products made from stored cereals which are potentially contaminated.

The same idea presented in this paper was also researched by SchothorstJekel (2003) who conducted a survey on mycotoxins in the Netherlands. On that occasion, the results showed contamination in only three of 51 analyzed industrial beer samples (approximately 6 %), and the DON levels were low, varying between 26 $\mu\text{g/l}$ and 41 $\mu\text{g/l}$. Additionally, no detectable levels of mycotoxins in industrial beer were found in a study conducted by Omurtag and Beyoglu (2007) in Turkey.

Furthermore, in order to explain the DON levels, some studies have shown that this mycotoxin seems to be very stable during the brewing process (BÖHM-SCHRAML et al., 1997; WOLF-HALL, 2007). Niessen (1993), found deoxynivalenol to be carried over into the final beer. In the study mentioned, they also showed a four-fold increase in deoxynivalenol concentrations during mashing. It suggested that deoxynivalenol may be released from protein conjugates during mashing.

Moreover, another study carried out by Lancova et al., (2008), showed that in malt, the content of monitored mycotoxins (tricothecenes) was higher compared with the original barley. The most significant increase was found for DON -3-Glc. Additionally, during the brewing process, significant increases in levels occurred.

According to the aspects aforementioned, chemical treatments are promising, such as ozonation, (SAVI et al., 2014a; SAVI et al., 2014b) as this would not leave residual chemicals in the barley grain or in the beer. This means that the problem would be reduced or solved still in storage where some conditions can be monitored.

It is important to highlight that the current Brazilian and international regulations do not determine minimum levels for DON in beer. However, there are maximum values for barley and malted barley which correspond to levels of 1500 $\mu\text{g/kg}$ and 1250 $\mu\text{g/kg}$, respectively. These levels can serve as a benchmark. Based on this, it is possible to conclude that beers brewed from quality, purified and well-stored raw materials do not represent any health risk of DON exposure to consumers.

Considering FB_1 , the results presented previously are similar to a study carried out in Brazil in 2007, where 43.1 % of the industrial beers analyzed were contaminated with levels ranging from 1 to 40 $\mu\text{g/l}$ (KAWASHIMA et al., 2007). Furthermore, the results from this survey were in agreement with previous European studies: Bertuzzi et al., (2011) detected FBs in 97 % of the samples ($n = 32$) at maximum levels of 30 $\mu\text{g/l}$ and Torres et al., (1998) detected FBs in 43.8 % of Spanish beer ($n = 32$) at levels of 4.8 to 85.5 $\mu\text{g/l}$. Also for FB_1 , some studies

have reported the stability of this toxin in heat and during the fermentation process (ALBERTS et al., 1990; JACKSON et al., 1996a; JACKSON et al., 1996b; SCOTT et al., 1995).

It is necessary to highlight that most of the craft beers are made only with barley, therefore, these results may suggest that the beer contamination can be affected by the products used. An example of this, is corn starch and corn syrup which are among the adjuncts alternatively used for beer production in Brazil. These can increase the levels of FB₁ as cited by Hlywka and Bullerman (1999) and Kawashima et al., (2007).

According to these numbers of contamination in beer, many studies also documented levels of *Fusarium* mycotoxins and their pattern in barley grains (MARÍN et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012; RUBERT et al., 2012; CASTANARES et al., 2014). This problem is strongly influenced by agricultural practices which, in combination with weather conditions during critical phases of plant growth, determine a number of toxigenic fungi invading the crop under field conditions (EDWARDS, 2004).

4.1 ESTIMATION OF MYCOTOXIN DIETARY INTAKES BY THE CONSUMPTION OF BEER

By considering the mean values of DON and FB₁ obtained from this survey, the mean Brazilian beer consumption (57 / 1 year per capita, equivalent to 0.158 / 1 day) and a body weight of 60 kg, it was possible to calculate the daily average exposure, as shown in Table 3. The Scientific Committee for Food (SCF) and FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) (BOLGER et al., 2001) indicated a tolerable daily intake (TDI) of 1 and 2 µg/kg⁻¹ bw for DON and FBs, respectively.

	Mean ^a (µg / l)	Daily average exposure (µg / kg bw)	Tolerable daily intake (µg / kg bw)	% of Tolerable daily intake
Deoxynivalenol	71	0.18	1	18
Fumonisin B ₁	16	0.04	2	2

^aall of 53 samples

Table 3. Estimation of mycotoxin dietary intakes from beer.

According to Table 3, it is evident that, for a moderate consumer, the daily average exposure from beer was low, in agreement

with previous studies (MATUMBA et al., 2014; HARCZ et al., 2007). Nevertheless, it is extremely important to maintain the high levels of monitoring.

5 CONCLUSION

This study reported the results from a survey investigating the physical and chemical characteristics of craft beer produced in southern Brazil and the presence of mycotoxins in it.

In summary, the pH, acidity and real extract were in agreement with some surveys and with the Brazilian regulation, however, DON and FB₁ were present in 32 and 15.09 % of the samples, respectively. The concentrations found in craft beer from southern Brazil were probably caused by the widespread and high occurrence of these toxins in barley. Furthermore, the mycotoxins seem to be very stable during the brewing process.

The elimination of both toxins from the product should be contemplated by the industry either for quality or health reasons.

6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the craft breweries in southern Brazil for providing the beer samples, CAPES, and CNPQ for financial support.

7 REFERENCES

ALBERTS, J. F. et al. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56 (6), p. 1729-1733, 1990.

BAMFORTH, C. Beer Tap Into the Art and Science of Brewing, second ed. Oxford University Press, 198 Madison Avenue, New York. ISBN: 13 978-0-19-515479-5, 2003.

BEATTIE, S.; SCHWARZ, P.; HORSLEY, R.; BARR, J.; CASPER, H. The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 103–106, 1998.

BENESOVA, K.; BELAKOVA, S.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA Z. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by

liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Control**, v. 25, p. 626-630, 2012.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin. Microbiology**, v.16, p. 497-516, 2003.

BERTUZZI, T. ; RASTELLI, S.; MULAZZI, A.; DONADINI, G.; PIETRI, A. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. **Food Control**, v. 22, p. 2059-2064, 2011.

BÖHM-SCHRAML, M.; STETTNER, G.; GEIGER, E. Studies into the influence of yeast on Fusarium-toxins in wort. **Cereal Research Communications**, v. 25, p. 729-730, 1997.

BRASIL. (1997). Decreto n. 2314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, DF, 05 set. 1997.

BRASIL. (2011). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Prorrogação para 1º de janeiro de 2017 o prazo para adequação estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Resolução nº 59 publicada em 30/12/2013. Available in: <http://portal.anvisa.gov.br/.../anvisa/anvisa/.../04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz>. Acesso em: 10 fev. 2014.

BRASIL. (2011). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*, 22 de fevereiro de 2011.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MERRILL, A.H. JR.; WANG, E.; JONES, C. Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells. **Food Chemistry Toxicology**, v.36, p. 791-804, 1998.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 364, 5, 2006.

EDWARDS, S. G. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 29–35, (2004).

GIOVENZANA, V.;BEGHI, R.;GUIDETTI, R. Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v.142, p. 80–86, 2014.

GOYARTS, T.; DÄNICKE, S.; VALENTA, H.; UEBERSCHÄR, K.H. Carry-over of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, p. 369-380, 2007.

HLYWKWA, J. J.; BULLERMAN, L. B. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in beer. **Food Add. Contam.**,v. 16(8), p. 319-324, 1999.

HLYWKWA, J. J.; BULLERMAN, L. B. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in beer. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 319-324, 1999.

JACKSON, L. S. et al. Effects of thermal processing on the stability of fumonisins B2 in an aqueous model system. **J. Agric. Food Chem**, v. 44(10), p.1984-1987, 1996b.

JACKSON, L. S. et al. Effects of time, temperature and pH on the stability of fumonisins B1 in an aqueous model system. **J. Agric. Food Che**, v.44(4), p. 906-912, 1996a.

KAWASHIMA, L. M.; VIEIRA, A. P.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin B₁ and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27(2), p. 317-323, 2007.

LANCOVA, K.; HAJŠLOVA, J.; POUŠTKA, J.; KRPLŮVA, A.; ZACHARIASOVA, M.; DOSTÁLEK, P.; SACHAMBULA, L. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and ‘masked’ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. **Food Additives and Contaminants: Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v.25, p. 732–744, 2008.

M. BOLGER, R.; COKER, M.; DINOVI, D.; GAYLOR, W.; GELDERBLUM, M.; OLSEN, N.; PASTER, R.T.; RILEY, G.; SHEPHARD, G. Fumonisin: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. **56th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Geneva, Switzerland**, p. 103–279, 2001.

MARÍN, S.; MAGAN, N.; SERRA, J.; RAMOS, A. J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. **J. of Food Science**, v. 64(5), p. 921–924, 1999.

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

NIESSEN, L.M. Entwicklung und anwendung immunchemischer verfahren zum nachweis wichtiger Fusarium- toxine bei der bierbereitung sowie mycologische untersuchungen im zu sammenhang mit dem widwerded (gushing) von bieren. **Doctoral Thesis, Technical University Munich, Program for Technical Microbiology and Brewing Technology**, 1993.

OLIVEIRA, N. A. M. Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. Programa de pós graduação, Minas gerais, UFMG, 44, 2011.

OLIVER, G. Craft brewing. The Oxford Companion to Beer, Oxford University Press. Oxford, UK, p. 270–271, 2011.

OMURTAG, G.Z.; BEYOGLU, D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. **Food Control**, v.18, p.163–166, 2007.

OMURTAG, G.Z.; YAZICIOGLU, D.; BEYOGLU, D.; TOZAN, A.; ATAK, G. A review on fumonisin and trichothecene mycotoxins in foods consumed in Turkey. **ARI, ITU-Bulletin**, v. 54, p. 39-45, 2006.

PESTKA, P. P. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v.137,p. 283–29, 2007.

PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; AGOSTI, B.; DONALDINI, G. Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. **Food Additives & Contaminants A**, v. 27(10), p. 1431-1439.2010.

ROTTER, B.A.; PRELUSKY, D.B.; PESTKA, J.J. Invited review: toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 48, p. 1-34, 1996.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* growth inhibition and mycotoxin degradation of stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Food Processing and Preservation**, p. 1-9. (2014).

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. **Journal of Stored Products and Research**, p. 1-9, 2014.

SCOTT, P. M. et al. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. **Food Add. Contam.** v.12(1), p. 31-40.1995.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A. Analysis of beer for fumonisins. **Journal of Food Protection**, v. 58 (12), p. 1379-1382, 1995.

SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of Association Official Analytical Chemistry Intl**, v.79, p. 875–882, 1996.

SINDICATO NACIONAL DE INDÚSTRIAS DA CERVEJA. (2014). Dados de consumo. Brasília. Available in: <<http://www.sindicerv.com.br>>. Accessed in: 11/02 de 2014.

WIJNANDS, L.M.; VAN LEUSDEN, F. M. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and biossays for their detection. **RIVM report 257852 004**, Bilthoven.2000.

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

CAPÍTULO 3

MICROFLORA E OCORRÊNCIA DE DEOXINIVALENOL E FUMONISINAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE CEVADA CERVEJEIRA (*Hordeum vulgare L.*)

ARTIGO SUBMETIDO: Piacentini, K.C., Savi, G. D., Pereira, M. E. V., Scussel, V. M. Mycoflora and natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in different varieties of malting barley (*Hordeum vulgare* L.) grains. Food Chemistry.

ABSTRACT

The industrial use of barley (*Hordeum vulgare* L.) grain has experienced continuous growth mainly due to its economic importance for malt production. However, studies from the high beer consumption/production countries have demonstrated that using low quality barley fungi contaminated can interfere on brewing process. Indeed, barley fungal persistence can reduce final products marketability and cause economic losses. This work reports a study on the mycoflora and field toxins (deoxynivalenol and fumonisins) occurrence in 5 different varieties of malting barley samples from Southern Brazil. According to the mycological tests, the samples presented low fungi colonies count, with values ranging from 1×10^1 to 1.2×10^2 . The main genera isolated in descending order were *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhysopus* and *Penicillium*. Regarding the *Fusarium* species, they were the toxigenic *F. graminearum* and *F. verticilioides* (26 and 12%, respectively). The Brau variety was the one that presented the highest number of samples toxin contaminated, being half (50%) from the total positives, for deoxynivalenol. On the other hand, fumonisins were detected in fewer total samples, which is a quite good achievement for those varieties and the beers consumers.

Key words: malting barley, variety, mycotoxins, deoxynivalenol, fumonisins, mycoflora

1 INTRODUCTION

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the most important cereals in the world with an estimated global production of approximately 141 million tons in 50 million hectares in 2013 (USDA, 2014). The industrial use of barley grain has experienced continuous growth mainly due to its economic importance for malt production (Oliveira et al., 2012).

Several works have demonstrated that the barley can be contaminated with fungi and, from a technological perspective, fungal persistence can reduce product marketability causing economic losses.

This lowers the quality of the grain and, consequently, the final product is affected. (Noots et al., 1999; Schwarz et al., 2001).

The fungi genus that should be taken into account for barley and other small grains is *Fusarium*, and this can be associated with a disease called *Fusarium* head blight (FHB) (Ibáñez-Vea et al., 2012 and Neuhof et al., 2008). The major species associated with FHB in Europe are *F. graminearum*, *F. avenaceum*, and *F. culmorum*, and, to a lesser extent *F. poae*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* and *F. tricinctum* (Bottalico and Perrone, 2002; Ibáñez-Vea et al., 2012).

Contamination of barley by these pathogenic fungi negatively affects vegetation and leads to reduced germination capacity and grain malting quality as well as to losses in yield (Oliveira et al., 2012). Although micromycetes of *Fusarium* spp. are known as “field fungi“, they can also grow during storage (Fakhrunnisa et al., 2006, Oliveira et al., 2012).

Among the mycotoxins associated with FHB, such as trichothecenes, deoxynivalenol (DON), nivalenol, T-2 and HT-2 toxins, DON is the most common found in barley grains. The accumulation of DON in human and animal bodies after ingestion of contaminated food can induce acute and chronic effects such as immunosuppression, neurotoxicity, embryotoxicity and teratogenicity (Pestka, 2007; Wijnands and Van Leusden, 2000).

Furthermore, an important problem found in the industry concerning DON presence in barley and consequently in beer, is “gushing”, i.e. excessive foaming and overflowing on opening a bottle. This has been reported frequently in the last few years and can seriously damage the beer quality and the reputation of the brewery.

Another relevant *Fusarium* specie that can be found in barley is *F. verticillioides* and this is a producer of fumonisins (FBs). FBs are a family of toxic and carcinogenic mycotoxins that cause serious diseases affecting humans and animals (Marasas et al., 2004). More than ten types of FBs have been isolated and characterized. Of these, fumonisin B₁ (FB₁), fumonisin B₂ (FB₂), and fumonisin B₃ (FB₃) are the major FBs produced in nature, with FB₁ being the most prevalent and toxic (Musser and Plattner, 1997). Additionally, these toxins are catalogued as group 2B carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993).

With respect to the mycotoxins produced by *Fusarium*, it can be said that they are produced mainly in the field, although some toxin synthesis may occur during storage. These may also increase during germination of the barley during the malting and brewing process of the

beer (Pietri et al., 2010; Wolf-Hall, 2007). Basically, the temperature and moisture conditions are crucial factors and thereby affect the fungal infection and toxin synthesis (Doyle, 1997).

Due to the health risks associated with the consumption of contaminated commodities, their occurrence is currently under regulation in many countries. In 2012, the Brazilian regulation proposed a maximum tolerable level (MTL) of 1.75 $\mu\text{g/g}$ for DON in malted barley grains. The limit will be decreased over time to allow grain producers and the industry to adapt to the legislation without causing a shortage of barley. As of January 2017, DON limits for malted barley will be set at 0.75 $\mu\text{g/g}$ (Brasil, 2011; Brasil, 2013).

Currently, the limit fixed for DON by the Commission of the European Communities is equal to 1.75 $\mu\text{g/g}$ for cereals and sub products (European Commission, 2006). It is important to emphasize that there is no specific regulation for FBs in barley and, therefore, the raw material should be carefully monitored.

For the reasons stated above, the aim of the present study was to determine the presence and identification of mycoflora and also the occurrence of DON and FBs in malting barley from Brazil by means of High Performance Liquid Chromatography. It is important to mention that this research has not been developed in Brazil previously and can therefore be a benchmark for the Brazilian beer industry from here onwards and cultivation/storage of this widespread cereal.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 MATERIALS

2.1.1 Samples

Malting barley grains (50 samples), from 5 different varieties (Brau, Elis, Korbel, Caue and also PFC) of the year 2013 harvest (minimum weight: 1 kg), recommended for cultivation in Southern Brazil (Paraná-PR, Rio Grande do Sul-RS and Santa Catarina-SC states). They were obtained after passing through the cleaning (compressed air / low density matter) and drying (hot air / max. 60°C) stages in the Grain Storage Unit (GSU), then packaged in polyethylene bags and stored at 4 °C for mycoflora, DON and FBs analysis. Figure 1 shows the different malting barley grains variety characteristics.

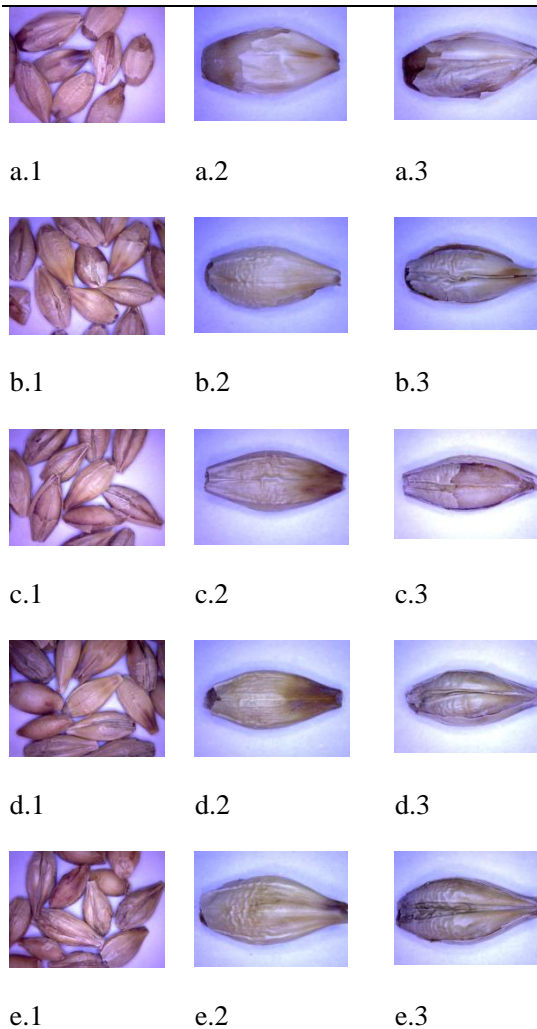


Figure 1. Characteristics of the malting barley (*Hordeum vulgare* L.) grains of different varieties: (a) Brau, (b) Caue, (c) Elis, (d) Korbel and (e) PFC [1 - grains / 2 -verse / 3 -reverse].

2.1.2 Culture media, chemicals and other materials

(a) *culture media* - potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA) and peptone media were from Himedia (Curitiba, Parana, Brazil); czapek-dox 25% glycerol nitrate (GN25), czapek yeast extract (CYA) agar and Czapek-dox agar (CDA) from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil); (b) *chemicals (b.1) solvents* - acetonitrile and methanol from Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil); Mili-Q water from system 18.2 MΩ/cm; (b.2) *mycotoxin standards* - DON and FBs, from Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). [DON stock solution (SS): 1 mg in 1 ml of acetonitrile (200 µg/ml); standard curve solutions (SCS): prepared from appropriate dilutions of SS with Mili-Q water (0.15 to 15 µg/ml); FBs SS: 1 mg of FB₁ & FB₂ in 1 ml of methanol (50 µg/ml); SCS: prepared from appropriate dilutions of SS with methanol (0.005 to 2.5 µg/ml)]. (c) *other materials* - chloramphenicol from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil); DON-test immunoaffinity columns (IAC), from Vicam (Milford, MA, USA), N+C₁₈solid phase extraction (SPE) columns from Phenomenex (Torrance, CA, USA) and C₁₈ reversed-phase chromatographic columns (c.1) for DON - 4 µm, 250 x 4.60 mm, particle size, length and diameter, respectively, model Fusion-RP 80, Phenomenex (Torrance, USA) and (c.2) for FB_s - 5 µm, 150 x 4.60 mm, particle size, length and diameter, respectively, model Luna (Torrance, USA).

2.1.3 Instruments

Microwave oven, Philco (Sao Paulo, SP, Brazil); laminar flow cabinet, Veco (Campinas SP, Brazil); fume cabinet, Quimis (Diadema, SP, Brazil); stomaker, Marconi (Piracicaba, SP, Brazil), microbiological oven, Quimis (Diadema, SP, Brazil); autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brazil); light microscope (LM), model CH-BI45-2, Olympus (Shinjuku, Tokyo, Japan). High performance liquid chromatography (HPLC) system, Gilson (Middleton, WI, USA), equipped with an isocratic pump, model 805; ultraviolet-visible (UV-VIS), model 118 & fluorescence, model 121, detectors; injector (20µl loop), Rheodyne(California, USA). Drying oven, Olidef-cz (Ribeirao Preto, SP, Brazil); Aqua-Lab, model 4TE, Decagon Devices (Sao Jose dos Campos, SP, Brazil).

2.2 METHODS

2.2.1 Mycological analysis

(a) *fungi enumeration* - to evaluate total fungal load it was applied the methodology of Silva et al. (2010). Briefly, each sample (25 g) was added to peptone:water (0.1%), stirred in a stomacher (2 min) and dilutions ($10^{-1}/10^{-2}/10^{-3}/10^{-4}$) prepared. Next, aliquots of each dilution (0.1 ml) were spread (n=2) on the PDA surface containing chloramphenicol (100 mg/l) and incubated for 7 days, at 28°C. The results were presented as colony forming units per gram (CFU g⁻¹) in the 10⁻¹ dilution; (b) *identification of fungal genera and species* - the isolated strains were sub-cultured on PDA, MEA, GN25 and CYA media (incubated for 7 days, at 28°C), followed by species identification performed through micro-cultivation in carnation leaf agar for *Fusarium* and CDA for *Aspergillus* and *Penicillium* (keys of Weber and Pit, 2000; Samson et al. 2006) were applied.

2.2.2 Humidity (mc & aw)

To determine (a) *mc* - the barley grains (2 g) were submitted to a drying process in an oven ($105 \pm 5^{\circ}\text{C}$) up to a constant weight using the gravimetric method of Association of the Official Analytical Chemists (AOAC, 2005); and the (b) *aw* - was carried out by submitting each barley grains variety (2 g) to the Aqua-Lab 4TE apparatus, up to stable reading (Aqua Lab. 2014).

2.2.3 Mycotoxins determination

(a) *DON*: the malt barley samples were analysed using IAC column for the cleaning step and LC/UV for detection, according to the Vicam protocol for DON test, N_o G1005 USA (Vicom, 2013), with some modifications. In short, each sample (25 g) was mixed into an industrial blender with 100 ml of ultra pure water. The mixture was blended for 30 seconds and then filtered twice. For sample cleanup and concentration, an aliquot of 1ml of the extract was applied to an IAC (DON Test HPLC) at a flow rate of one drop per second. This column was previously conditioned with 1 ml of LC grade water. The sample was followed by 2.5 ml of LC grade water to wash the column and the toxin was slowly eluted with 2 ml of 100 % LC grade methanol. The eluate was evaporated using a heating block device at 40°C in a gentle nitrogen stream and then the dry residue was redissolved in 100 µl of mobile phase acetonitrile:water (10:90, v/v). The extract (20 µl) was injected

into the LC/UV System set at a wave length of 218 nm and the mobile phase was delivered at a constant flow rate of 1.0 ml/min.

(b) *FBs*: the method applied for *FBs* (FB_1 & FB_2) determination was of AOAC art. 995.15 (AOAC, 2005). Briefly, each barley sample (50 g) had toxins extracted in a blender jar with methanol:water (80:20, v/v), followed by cleanup through an SPE column (N+C18), previously conditioned with methanol (5 ml), followed by methanol:water (80:20). The sample was followed by 5 ml of methanol:water (80:20) and 3 ml of methanol. The FB_s were eluted with methanol:acetic acid (99:1). The eluate was dried under a nitrogen stream at 60°C. The dried extract was suspended in methanol (100 μ l), transferred to a reaction vessel and OPA reagent (200 μ l) was added. After 60 sec. reaction time, 20 μ l of the derivatized toxins was injected into a LC-FLD (at 335 and 440 nm for excitation and emission, respectively). The mobile phase was methanol:sodium dihydrogen phosphate (77:23, v/v) adjusted to pH 3.3 with H_3PO_4 (flow rate of 1 ml/min).

3 RESULTS

The data obtained from the 5 different varieties (Brau/Elis/Korbel/Caue/PFC) of malting barley samples on *mycoflora* (total fungi load/genera/species) isolation & identification as well as the *toxins* (DON & *FBs*) surveyed, showed some variation among them, and are presented in the Tables 1 & 2, respectively.

3.1 MYCOFLORA

According to the mycological tests, the samples presented low fungi total counts, with values ranging from 1×10 to 1.2×10^2 CFU g^{-1} (mean: 4.4×10^1). After incubating the samples for 7 days at 25 °C, a total of 9 fungal isolates (Table 1) belonging to four different genera, such as *Fusarium* (6), *Penicillium* (1), *Alternaria* (1) and *Rhysopus* (1) were identified.

The incidence of samples colonizes by *Fusarium*, especially *F. graminearum* and *F. verticillioides* were significantly predominant from 19 strains isolates, 13 belonging to *F. graminearum* and 6 belonging to *F. verticillioides*. The incidence of both species were 26 and 12 %, respectively.

3.2 HUMIDITY (MC & AW)

Regarding the conditions for fungi grow, related to the barley sample humidity (mc & aw), in the current study the 5 malting barley varieties showed values ranging from 11.69 to 14.74% (mean 13.24 ± 0.78) for mc and from 0.53 to 0.65 (mean 0.61 ± 0.02) for aw. Most data was slightly under the threshold for optimum growth conditions. It is important to mention that under grains favourable conditions, either high mc (14-16%), aw (0.70-0.90) and temperature (25-35°C), toxigenic fungi can grow and produce mycotoxins (SCUSSEL, 2002). According to the Brazilian regulation, the maximum mc allowed in malting barley is 13%, in order to prevent fungi contamination and consequently mycotoxins (BRAZIL, 2011). Regarding, data on varieties, the samples humidity parameters were somewhat similar, with some slight differences observed.

3.3 MYCOTOXINS

(a) DON:(a.1) validation -the LC/UV method for DON chromatographic separation and the validation parameters obtained (linearity, limit of detection – LOD, limit of quantification – LOQ reproducibility, repeatability and recovery), were adequate. For instance, under the chromatographic conditions used, the DON retention time (Rt) was equal to 12 min. In turn, linearity was confirmed using the calibration curve for each DON concentration; i.e., it was linear from 0.15 to 15 µg/ml (correlation coefficient 0.996). Finally, the LOD (signal to noise ratio = 3) and LOQ (signal to noise ratio = 10) were 0.07 and 0.12 µg/g, respectively.

The second step of the research was the recovery experiments. To achieve reasonable accuracy, the recovery was conducted in triplicate by means of spiking blank with DON stock solution at concentrations of 0.25, 1 and 1.5 µg/g and performed with the same HPLC system. The extraction was carried out according to the methodology aforementioned and the eluate (2 ml) was evaporated with nitrogen at 60 °C for 10 min until dry. A duplicate analysis was conducted.

The recovery experiments showed yields of 87, 96 % and 93 % for concentrations of 0.25, 1 and 1.5 µg/g, respectively. The mean recovery rate for the extraction method was 92 %. *(a.2) DON malting barley grain data* - in the present study, DON was detected in 8 out of 50 (16%) samples, with levels ranging from 0.25 to 15.08 µg/g (mean 3.36 µg/g). The descriptive statistics are shown in Table 2.

(b) FBs:(b.1) validation - the method applied for FB₁ and FB₂ was successfully validated under laboratory conditions. The validation

criteria were linearity, selectivity reproducibility, limits of detection and quantification (LOD and LOQ, respectively) and recovery. The retention time (rt) of FB₁ was 5 min and for FB₂ 10.3 min. Linearity was confirmed by constructing a calibration curve for FBs ranging from 0.001 – 5.5 µg/ml, which showed coefficients of correlation $r^2 = 0.994$ for FB₁ and 0.996 for FB₂. The LOD (signal noise ratio = 3) was 0.0002 µg/g (FB₁) and 0.01 µg/g (FB₂), and LOQ (signal noise ratio = 10) were 0.001 µg/g and 0.04 µg/g for FB₁ and FB₂, respectively.

Following the same idea described for DON, the recovery experiments were conducted by spiking blank with 0.05, 0.25 and 5 µg/g for FB₁ and FB₂. Each spiked level was conducted in triplicate to obtain great precision and they were performed on the same day and with the same HPLC system.

In turn, the extraction was carried out according to the methodology previously mentioned and the eluate (10 ml) was evaporated with nitrogen at 60 °C for 10 min until dry. In this case, a duplicate analysis was performed. The recoveries ranged from 70, 85 and 90% 0.05, 0.25 and 5 µg/g, with an overall mean of 81%.
(b.2) *FBs malting barley grain data* – data on FB₁ showed that 5 (10%) out of the 50 samples present some levels, all at quite low level ranging from 0.003 to 0.1 µg/g (one sample, each variety). On the other hand, for FB₂ only one sample showed contamination and was of Elis variety (0.09 µg/g).

Table 1. Mycoflora isolated of different varieties malting barley (*Hordeum vulgare* L.) grains*

Variety**	Barley sample		TFC (CFU/g) ^b	Mycoflora		Humidity*	
	Fungi	Number		Genera	Species	Aw ^c	Mc% ^d
BRAU ^e	Negative:	6	NA ^f	NI ^g	NI	0.62±0.00	13.20±0.07
	Positive:	4	7.0x10	NI	NI	0.61±0.01	12.58±0.05
				NI	NI	0.60±0.00	12.51±0.02
				NI	NI	0.60±0.01	11.69±0.15
				NI	NI	0.60±0.00	11.89±0.31
				NI	NI	0.63±0.00	13.33±0.12
				<i>F. / Ryzopus</i>	<i>F.</i>	0.65±0.01	12.99±0.11
					<i>graminearum/v</i>		
					<i>erticilioides / R.</i>		
					<i>oryzae</i>		
	<i>Fusarium</i>	<i>F.</i>	0.60±0.01	12.84±0.07			
	7.0x10	<i>F. / Alternaria</i>	<i>graminearum</i>	<i>F. culmorum /</i>	0.57±0.01	13.27±0.08	
	1.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. culmorum /</i>	<i>A. alternata</i>			
			<i>F. culmorum /</i>	<i>F. acuminatum</i>	0.56±0.00	13.94±0.15	
	Mean (range)		4.2(1.0 to 7.0x10)	NA	NA	0. (0.56-0.65)	12.74(11.69-13.94)
CAUE ^e	Negative:	5	NA	NI	NI	0.62±0.01	12.26±0.01
	Positive:	5		NI	NI	0.60±0.01	12.83±0.23
				NI	NI	0.60±0.00	12.83±0.30

				NI	NI	0.60±0.00	12.22±0.56
				NI	NI	0.60±0.00	12.13±0.08
		7.0 x10		<i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum</i>	0.63±0.01	13.78±0.19
		1.0 x10		<i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum</i>	0.63±0.00	12.73±0.06
		2.0 x10		<i>Penicillium</i>	<i>P. digitatum</i>	0.58±0.02	13.57±1.67
		3.0 x10		<i>Fusarium</i>	<i>F. acuminatum/</i>	0.60±0.00	13.48±0.01
		2.0 x10		<i>F. /Alternaria</i>	<i>F. culmorum</i>		
					<i>F. acuminatum</i>	0.57±0.00	13.79±0.01
					<i>/A. alternata</i>		
	<i>Mean (range)</i>	<i>3.0(1.0 to 7.0x 10)</i>		NA	NA	0.60	<i>12.96(12.13-13.79)</i>
ELIS ^e	Negative:	6	NA	NI	NI	0.62±0.01	11.86±0.87
	Positive:	4		NI	NI	0.61±0.00	13.70±0.11
				NI	NI	0.60±0.00	13.88±0.12
				NI	NI	0.61±0.00	13.28±0.55
				NI	NI	0.61±0.00	12.37±1.84
				NI	NI	0.62±0.03	13.96±0.04
			3.0 x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum</i>	0.64±0.01	13.03±0.01
					<i>/F. clamydosporum</i>		
					<i>/F. acuminatum</i>		
			1.0x10 ²	<i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum/</i>	0.58±0.01	11.88±0.97
		<i>F. acuminatum</i>					

			1.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. verticilioides</i>	0.60±0.02	13.37±0.13	
			2.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. culmorum</i>	0.56±0.01	13.56±0.16	
						0		
			<i>Mean (range)</i>			. (0.56- 6 0.64)	13.01(11.86- 13.96)	
			4.0 (1x10to 1x 10 ²)	NA	NA	1		
KORBEL^c	Negative:	6	NA	NI	NI	0.62±0.01	13.30±0.14	
	Positive:	4		NI	NI	0.60±0.01	13.32±0.04	
				NI	NI	0.60±0.01	13.74±0.32	
				NI	NI	0.62±0.01	13.70±0.17	
				NI	NI	0.61±0.00	13.13±0.18	
				NI	NI	0.65±0.01	14.11±0.01	
				NI	NI	0.63±0.00	14.74±0.16	
				1.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. proliferatum</i>	0.60±0.02	12.81±0.25
				1.2x10 ²	<i>Fusarium</i>	<i>F. vesticilioides</i> / <i>F.</i> <i>graminearum</i>	0.61±0.02	13.44±0.28
				4.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F.</i> <i>gramineraum</i>	0.57±0.01	13.14±0.22
			5.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F.</i> <i>gramineraum</i> / <i>F. verticilioides</i>	0.62±0.01	13.30±0.14	
			<i>Mean (range)</i>			0.65 (0.57-0.65)	13.87(12.81- 14.74)	
			5.5(1.0x10 ¹ to1.2x10 ²)	NA	NA			
PFC	Negative:	6	NA	NI	NI	0.61±0.01	13.72±0.27	
	Positive:	4		NI	NI	0.62±0.01	13.73±0.13	
				NI	NI	0.61±0.00	13.95±0.31	
				NI	NI	0.59±0.00	14.18±0.29	

			NI	NI	0.60±0.01	14.12±0.24
			NI	NI	0.65±0.01	14.56±0.43
		6.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum</i>	0.64±0.01	13.51±0.40
		3.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum/</i>	0.61±0.01	13.09±0.42
		1.1x10 ²	<i>Fusarium</i>	<i>F. subglunatins</i>	0.64±0.01	13.59±0.01
		1.0x10	<i>Fusarium</i>	<i>F. verticilioides</i>	0.53±0.01	13.52±0.07
				<i>F. proliferatum</i>		
	<i>Mean (range)</i>	5.2(1.0x10 to 1.1x10 ²)	NA	NA	0.61 (0.53-0.64)	13.80(13.09-14.56)
Total positive	21		NA	NA	NA	NA
General mean positive (range)		4.4 (1x10to1.1x10 ²)	NA	NA	(0.53-0.65)	(11.69-14.74)

Table 2. Occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in different varieties of malting barley (*Hordeum vulgare* L.) grains

Malting barley grain			Field toxin levels ($\mu\text{g/g}$) ^{a,b}					Positive samples ^g		
Variety*	Contamination	Number	Per sample:	DON ^c	FBs ^d			>MTL ^g	Frequency (%)	Mean ($\mu\text{g/g}$)
					FB ₁ ^e	FB ₂ ^f	FB _{stotal}			
BRAU**	Negative:	5	NA ^h	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Positive:	5	1	ND ⁱ	0.003	ND ^e	0.003	2/10 DON	20	9.17
			2	15.08	ND	ND	NA			
			3	0.25	ND	ND	NA			
			4	0.23	ND	ND	NA			
5	3.26	ND	ND	NA						
CAUE**	Negative:	9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Positive:	1	1	ND	0.002	ND	0.002			
ELIS**	Negative:	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Positive:	2	1	3.12	0.01	0.09	0.1	1/10 DON	10	NA
2			0.64	ND	ND	NA				
KORBEL**	Negative:	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Positive:	2	1	ND	0.01	ND	0.01	1/10 DON	10	NA
2			4.57	ND	ND	NA				
PFC**	Negative:	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Positive:	2	1	ND	0.001	ND	0.001	1/10 DON	10	NA
2			2.17	ND	ND	NA				
Total sample: evaluated:		50								
positive(%):		12 (24%)	DON	8(16%)	FBs	5(10%)				
> MTL(%):		5(10%)	DON	5(10%)	NA	NA				
negative:		38(76%)								

* total of 10 samples per barley variety studied **BRS variety ^a LOQ: 0.12 and 0.001 & 0.04 $\mu\text{g/g}$ for DON and FBs(FB₁&FB₂), respectively ^b higher than the LOQ ^c deoxynivalenol ^d fumonisins ^e fumonisin B₁ ^f fumonisin B₂ ^g higher than the maximum tolerable level: EU & BR of 1.75 $\mu\text{g/g}$ ^h not applicable ⁱ not detected

4DISCUSSION

As expected, the results (Section 3) indicate that the 5 different varieties of malting barley samples were prone to field fungi contamination (especially by spores of *Fusarium* species) (Table 1). That was probably due to the higher mc that the plants were exposed during field growth, when comparing the values obtained and the safe values established by regulations (BRAZIL, 1996, BRAZIL, 2011, EC, 2006). In addition, both toxin groups (trichotecenes: DON and FBs: FB₁ & FB₂) surveyed were able to be detected among some of those barley varieties utilized in Southern Brazil.

4.1 MYCOFLORA ISOLATED, HUMIDITY CONDITIONS *VERSUS* MALTING BARLEY VARIETIES

(a) *Total fungi count*: regarding the malting barley total fungi load and the varieties studied, Korbelt and PFC presented slightly higher (1.2 and 1.1x10²) total count when compared to Brau, Elis and Caue varieties (7.0, 7.0 and 3.0 x 10, respectively). These results can be associated with both varieties mc and aw levels that were quite closer (mc - 13.87, 13.80%) to the maximum allowed (14%) for that grain. On the other hand, the other varieties, less fungi contaminated, showed lower mc_s (12.74, 13.01, 12.96%) and aw (0.65, 0.61, 0.61, 0.61, 0.60, respectively).

(b) *Fungi genera and species isolated*: concerning the fungi identification, the genera most found was *Fusarium*, present in all the variety and the species isolated were *F. graminearum* and *F. verticillioides* which are prone to toxin formation (toxigenic), as long as grains and environment conditions may allow. According to studies carried out in different countries high contamination of these *Fusarium* species in barley, especially by *F. graminearum*, has been detected (CLEAR et al., 2000; HASHMI; GHAFAR, 2006; PAN et al., 2007; IBÁÑEZ-VEA et al., 2012). It is necessary to highlight that both species are filamentous fungi and producers of two mycotoxins groups, DON and FBs (IBÁÑEZ-VEA et al., 2012; PAN et al., 2007).

(c) *Humidity conditions*: in Southern Brazil, where the barley samples were collected, the climatic conditions (mild temperature and high humidity) at the flowering stage tend to increase (SCUSSEL et al., 2011), allowing contamination by *F. graminearum* / *F. verticillioides* and, consequently, maximizing the possibility of toxin production. The varieties that showed be more prone to contamination, environment

conditions wise, were Korbek and PFC with mc of 13.87% (12.81-14.74) and 13.80% (13.09-14.56), respectively (Table 1).

4.2 MYCOTOXINS *VERSUS* THE DIFFERENT MALTING BARLEY CONTAMINATION VARIETIES

Both toxin Groups were able to be detected and levels varied, with some higher than the Brazilian and EU MTL, which occurred in only one of the varieties utilized as discussed bellow (Table 2).

(a) *DON*: regarding the 5 varieties of the surveyed malting barley grains and the trichothecenes toxin group, 76% (38) of the samples did not present contamination up to the method LOQ (0.12 µg/g) which are good news for the grain producers and brewers. Despite that, 16% were toxin positive, however only 10% were higher than the Brazilian and EU MTLs (both of 1.75 µg/g). They were of Brau (with 2 > MTL) followed by Elis, Korbek and PFC varieties with only one sample > MTL each. Our study showed results similar to those carried out in Uruguay (Pan *et al.* 2007). Authors report *DON* detection ranging from 0.5 to 10 µg/g and the frequency of the occurrence was in more than 50% of the samples. However authors did not reported the barley variety(ies) utilized. Other studies reported high levels of *DON* in barley grains from different countries such as Czeck Republik, Germany and The Netherlands (LANGSETH *et al.*, 1999; LOMBAERT *et al.*, 2007; MANKEVIČIENĖ *et al.*, 2007). Authors were unanimous to affirm that contamination is strongly influenced by agricultural practices which, in combination with weather conditions during critical phases of plant growth, can determine a number of toxigenic fungi invading crops (EDWARDS, 2004; SCUSSEL *et al.*, 2011). Based on the results previously mentioned, which showed that 10% of the samples were in disagreement with the Brazilian and EU regulations for *DON*, it is possible to highlight that monitoring should be a good practice in order to mitigate the problems involved this mycotoxin (BRAZIL, 2011; EC, 2006).

(b) *FBs*: data on *FB*₁ showed that 5 (10%) out of the 50 samples present some levels, all at quite low level ranging from 0.003 to 0.01 µg/g (one sample, each variety). On the other hand, for *FB*₂ only one sample showed contamination and was of Elis variety (0.09 µg/g).

To our knowledge, only a few research data has been reported on malting barley for *FBs*, either in Brazil or abroad (BOLECHOVA *et al.*, 2014; MANOVA; MLADENOVA, 2009). Furthermore, the Brazilian

and international regulation do not establish FBs MTLs for barley, thus this data is a parameter for further new norms.

(c) *Field toxins versus barley producers and brewers*: the current study demonstrates that mycotoxin levels in barley, despite of the low presence of positive (>MTL) samples, can lead to consumption problems, as it is the raw material for beer production (highly consumed in the Western countries). In other words, the studies associated with mycotoxins occurrence should be given more attention due to the fact that beer (barley derived) consumption is in constant growth. Additionally, its quality tends to cause damage to beer process thus affecting the breweries reputation. For those reasons, the raw material used should be well selected and also monitored during the stages between the field and beer industry.

5 CONCLUSION

The current study reports fungi and field toxins (DON & FBs) contamination in malting barley with different levels and number of samples per grain variety cultivated in Southern Brazil.

The main genera isolated in descending order were *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhysopus* and *Penicillium*. Regarding the *Fusarium* species, they were the toxigenic *F. graminearum* and *F. verticillioides*.

The Brau variety was the one that presented the highest number of samples toxin contaminated, being half (50% - 5 samples) of them positive for DON. However, only 20% (2 samples) had values above the Brazilian and European MTLs established. On the other hand, FBs were detected in fewer samples, which is a quite good achievement for those varieties and the beers consumers.

Results may help to draw more attention to these grains regarding safety and should be a matter of concern to the brewing industry, regarding its effect on both, the malting process and beers consumers' safety. In addition, growers should pay attention on the malting barley variety to be chosen for planting in the region (fungi & toxin contamination wise), and select the fungi resistant ones.

6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian Agricultural Research Corporation - Wheat (EMBRAPA-Wheat) of Passo Fundo, RS, Brazil, for providing the barley grain samples and CAPES for the research financial support.

7 REFERENCES

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg (MD): **AOAC**, 2005.

BEATTIE, S.; SCHWARZ, P.; HORSLEY, R.; BARR, J.; CASPER, H. The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 103–106, 1998.

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**, v. 47, p. 108–113, 2015.

BOTTALICO, A.; PERRONE, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 611- 624, 2002.

BRASIL. (2011). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, 22 de fevereiro de 2011.

BRASIL. (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Prorrogação para 1º de janeiro de 2017 o prazo para adequação estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Resolução nº 59 publicada em 30/12/2013. Available in: http://portal.anvisa.gov.br/.../anvisa/anvisa/.../04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz. Accessed in: 10 nov. 2014.

BRASIL. (1996). Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 691, de 22 de novembro de 1996. Aprova a Norma de Identidade e Qualidade da Cevada, para comercialização interna. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 24751, 25 nov. 1996. Seção 1.

CLEAR, R. M.; PATRICK, S. K.; GABA, D. Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p. 44-50, 2000.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5, 2006.

DORAN, P.; BRIGGS, D. Microbes and grain germination. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, p. 165–170, 1993.

DOYLE, E. *Fusarium* mycotoxins. **FRI Briefings**, p.1-4, 1997.

EDWARDS, S. G. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. **Toxicology Letters**, v.153, p. 29–35, 2004.

FAKHRUNNISA, HASMHI, M. H.; GHAFAR, A. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. **Pakistan Journal of Botany**, v.38, p. 185-192, 2006.

FDA-United States food and drug administration. FDA Mycotoxin Regulatory Guidance. Fed. Regist, 2011.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZZARAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAZ, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Cooccurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. **Food Control**, v. 25, p. 81-88, 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Some Naturally Occurring Substances: Food**, 1993.

LANCOVA, K.; HAJŠLOVA, J.; POUŠTKA, J.; KRPLOVA, A.; ZACHARIASOVA, M.; DOSTÁLEK, P.; SACHAMBULA, L. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and ‘masked’ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. **Food Additives and Contaminants: Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v.25, p.732–744, 2008.

- LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. **Mycopathologia**, v. 147, p. 157-165, 1999.
- LOMBAERT, G.A.; PELLAERS, P.; ROSCOE, V.; MANKOTIA, M.; NEIL, R.; SCOTT, P.M. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. **Food Addit. Contam.**, v.20, p.494-504, 2003.
- MANKEVIČIENĖ, A.; BUTKUTĖ, B.; DABKEVIČIUS, Z.; SUPRONIENĖ, S. *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v.14, p. 103-107, 2007.
- MANOVA, R.; MLADENOVA, R. Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. **Food Control**, v. 20(4), p. 362-365, 2009.
- MARASAS, W.F.O.; RILEY, R.T.; HENDRICKS, K.A.; STEVENS, V.L.; SADLER, T.W.; GELINEAU-VAN WAES, J.; MISSMER, S.A.; CABRERA, J.; TORRES, O.; GELDERBLUM, W.C.; ALLEGOOD, J.; MARTÍNEZ, C.; MADDOX, J.; MILLER, J.D.; STARR, L.; SULLARDS, M.C.; ROMAN, A.V.; VOSS, K.A.; WANG, E.; MERRILL JR., A.H. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. **The Journal of Nutrition**, v.134, p. 711–716, 2004.
- MUSSER, S.M.; PLATTNER, R.D. Fumonisins composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.1169–1173, 1997.
- NEUHOF, T.; KOCH, M.; RASENKO, T.; NEHLS, I. Distribution of trichothecenes, zearalenone, and ergosterol in a fractionated wheat harvest lot. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 7566-7571, 2008.
- NOOTS, I.; DELCOUR, J.A.; MICHIELS, C.W. From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, p. 121–153, 1999.

- OLIVEIRA, P. M.; MAUCH, A.; JACOB, F.; WATERS, D. M.; RENDT, E. K.. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 32–43, 2012.
- PAN, D.; BONSIGNORE, F.; RIVAS, F.; PERERA, G.; BETTUCCI, L. Deoxynivalenol in barley samples from Uruguay. **Int. J. Food Microbiol**, v.114, p. 149-152, 2007.
- PESTKA, P. P. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**,v. 137,p. 283–29, 2007.
- PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; AGOSTI, B.; DONALDINI, G. Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. **Food Additives & Contaminants A**, v.27(10), p. 1431-1439, 2010.
- SARLIN, T.; KIVIOJA, T.; KALKKINEN, N.; LINDER, M.B.; NAKARI-SETÄLÄ, T. Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p.184–194,2012.
- SCHWARZ, P.; SCHWARZ, J.; ZHOU, A.; PROM, L.; STEFFENSON, B. Effect of *Fusarium graminearum* and *F. poae* infection on barley and malt quality. **Monatsschrift fur Brauwissenschaft**, v.54, p. 55–63, 2001.
- SCUSSEL, V. M. Fungos em grãos armazenados. In: Lorini I, Miike LH, Scussel VM, editors. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Biogeneziz, p. 675–691, 2002.
- SCUSSEL, V.M.; BEBER, M.; TONON, K.M. Efeitos da infecção por *Fusarium/Giberella* na qualidade e segurança de grãos, farinhas e produtos derivados. (1th ed), in Reis, E.M. (ed): **Seminário sobre Giberella em cereais de inverno**. Passo Fundo, Berthier, pp. 131-175, 2011.
- THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A. The implications of naturally occurring

levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, v. 117, p. 3–9, 1992.

USDA. (2011). World agricultural production: grains: Grains: world markets and trade archives 2011 Available in: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1487>>. Accessed in: 10.11. 2014.

VAUGHAN, A.; SULLIVAN, T. O.; SINDEREN, D. V. Enhancing the microbiological stability of malt and beer e a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111,p. 355-371,2005.

VICAM. Deoxynivalenol (DON) Testing Solutions, 2013. DONTest HPLC [Internet]. [cited 2013 May]. Available from: <http://vicam.com/don-test-kits>

WIJNANDS, L.M.; VAN LEUSDEN, F. M. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and biossays for their detection. **RIVM report 257852 004**, Bilthoven., 2000.

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

CAPÍTULO 4

EFEITO DO GÁS OZÔNIO EM RELAÇÃO A ESPÉCIES TOXIGÊNICAS DE *FUSARIUM* (*F. verticilioides*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae* E *F. semitectum*) EM CEVADA CERVEJEIRA

ABSTRACT

Fusarium is a large genus of filamentous fungi widely distributed around the world, representing one of the most prevalent sources of food contamination, with strong, acute or chronic negative impacts on human health. The complete elimination of fungi contaminated commodities may not be indeed achievable, but a reduction in these is essential for final product quality as well as for consumer health. This study evaluated the efficacy of the ozone (O₃) gas treatment in different *Fusarium* species and, in addition, to investigate the O₃ effect in malting barley seed germination. The O₃ gas was briefly applied to pilot silos (added with barley), divided into Control (no O₃ gas), and Treated groups (concentrations of 40 and 60 ppm). These were exposed for 30, 60, 120 and 180 min. The specie more susceptible (fungi load) after the O₃ treatment was *F. poae* followed by *F. graminearum*, with 93,3% and 92.6%., respectively. Germination of the malting barley seed was not affected.

1 INTRODUCTION

Fusarium is a large genus of filamentous fungi widely distributed around the world (BACKHOUSE et al., 2001), representing one of the most prevalent sources of food contamination, with strong, acute or chronic negative impacts on human health.

F. graminearum is the specie most frequently responsible for scabs in grains, especially in malting barley (OSBORNE; STEIN, 2007). Furthermore, other species, such as *F. verticillioides*, *F. poae*, *F. oxysporum* and *F. semitectum* can be found (MAENETJE; DUTTON, 2007; SCHWARZ et al., 2001; IVIC et al., 2011; GONZALEZ PEREYRA et al., 2011) and may interfere in the quality of the grains and the final product.

Barley infection by these pathogenic fungi negatively affects the vegetation health and leads to losses of yield, decreasing germination capacity and worsening grain malting quality (OLIVEIRA et al., 2012). Although micromycetes of *Fusarium* spp. are known as “field fungi”, they can also grow during storage under favorable

conditions (FAKHRUNNISA et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2012; VAUGHAN et al., 2005).

The complete elimination of fungi contaminated commodities may not be indeed achievable (Codex Alimentarius, 2003), but a reduction is essential for final product quality as well as for the consumer.

Nowadays, new decontamination technologies are used, but it is possible to highlight the ozonation of food products. Ozone (O_3) is a powerful antimicrobial agent due to its potential oxidizing capacity (KHADRE et al., 2001). It is currently used as a disinfectant for microorganisms and viruses, odor and taste removal, color and decomposition of organic matter (CATALDO, 2008; KARACA; VELIOGLU, 2009; KARACA et al., 2010).

A number of surveys have been carried out with O_3 to control the growth of several fungi in food or grains, in a laboratory environment (KOTTAPALLI, 2005; WU et al., 2006; ZORLUGENÇ et al., 2008; SCUSSEL et al., 2011). The idea presented in these studies is to reduce fungi and mycotoxin contamination in peanuts, figs, Brazil nuts and wheat, and in field trials researching artificially contaminated corn (ZORLUGENÇ et al., 2008; MCDONOUGH et al., 2011; SCUSSEL et al., 2011; SAVI et al., 2014).

The major advantage of O_3 treatment is related to the molecular oxygen decomposition without leaving residues. The US Food and Drug Administration (FDA) classifies O_3 for treating bottled water as *generally recognized as safe* (GRAS) (FDA, 1982), and it has been affirmed as GRAS for use in food processing (GRAHAM, 1997). Moreover, the Food and Agriculture Organization (FAO, 1994) recognizes the potent disinfectant characteristics of O_3 .

Based on that, the objective of this study was to evaluate the efficacy of the O_3 treatment in five species of *Fusarium* and, in addition, investigate the effect of O_3 in the malting barley seed germination.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Samples

About 30kg of malting barley grains were obtained from the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Wheat). They passed through cleaning and drying (maximum 60°C) processes in the

storage unit prior delivering to UFSC. Then, they were packaged in a polyethylene bag and stored at 4°C for analysis.

2.1.1 Fungi strains, culture media and others

(a) *Fusarium* species (*F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*) were obtained from the culture collection of the Laboratory of mycotoxicology and food contaminants in the Federal University of Santa Catarina. (b) Culture media: potato dextrose agar (PDA) and bacteriology peptone were purchased from Himedia (Curitiba, PR, Brazil). Others: tween 80 from Himedia (Curitiba, PR, Brazil).

2.1.2 Instruments

Microbiological incubator, Quimis (Diadema, SP, Brazil), autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brazil); stomacher, Marconi (Piracicaba, SP, Brazil); microwave oven, Philco (Sao Paulo, SP, Brazil); laminar flow cabinet, Veco (Campinas, SP, Brazil), caliper, Mitutoyo (Illinois, US) and colony counter, Phoenix (Araraquara, SP, Brazil).

2.2 METHODS

2.2.1 Samples *Fusarium* inoculation

Portions (25g) of malting barley samples were inoculated with a different *Fusarium* strains through a solution of Tween 80 (10ml) previously prepared, containing 3.3×10^5 ml of *F. semitectum* spores, 7×10^5 ml of *F. verticiloides* spores, 1×10^4 ml of *F. graminearum* spores, 8.5×10^4 ml of *F. oxysporum* spores and 4.1×10^5 ml of *F. poae* spores. The spores of each specie were count by means of the Neubauer chamber.

2.2.2 Ozone gas treatment

Laboratory silo preparation: the laboratory silos were prepared (25 cm × 10 cm length × diameter) with two apertures: one for the input of O₃ gas (bottom) and one for the output (top). The silos were filled with 400 g of malting barley grains.

The O₃ gas was applied into pilot cylinders (12 for each *Fusarium* specie), divided into Control (no O₃ gas) and Treated groups with different concentrations (Group I: 40 ppm and Group II: 60 ppm).

They were gas exposed during different length of time: 30 min, 60 min, 120 min and 180 min, in a room at 25 ± 0.5 °C.

O₃ application: the O₃ gas generator system followed the procedures detailed by Giordano et al. (2012) with minor modifications. First, the compressed air pump was connected to a device responsible for clearing the air impurities and, consequently, getting rid of solid particles and humidity. The filtered air was then driven to the adjusted flow meter at 1 L/min and the O₃ generator was calibrated to reach a concentration of 40 or 60 ppm.

The O₃ production by the generator (5–60 ppm) used the corona discharge process, in which an electrical discharge caused by the passage of air or pure oxygen (O₂) between the two electrodes generates the conversion of O₂ to O₃. Therefore, the O₃ gas produced was injected through a tube into the input aperture of each test chamber while the control chambers were ventilated with “room air” at the same flow rate (1 L/min).

Measuring the O₃ concentration: it was carried out by the iodometric titration test from the output of the O₃ generator. The gas was bubbled into potassium iodide solution (50 mL) acidified with 2.5 mL of sulfuric acid 1 N (pH below 2.0) and titrated with sodium thiosulfate (0.005 N) using a starch solution as the indicator (APHA, 1999).

Based on these analyses, the most effective concentration against the *Fusarium species* (60 ppm for 180 min) was chosen for further physical analysis.

2.2.3 Mycological analyses

The enumeration technique was applied to evaluate the total fungi load (Silva et al., 2010). Each barley sample (25g) inoculated was added to a peptone (0.1%) under sterile conditions. The mixture was stirred in a stomacher for 2 min and dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}) obtained. Aliquots of each dilution were spread (in duplicate) on surface of PDA medium containing chloramphenicol and incubated for up to 7 days at 28 °C in the dark. The results were expressed in colony forming units per gram (CFU/g).

2.2.4 Seed germination

The malting barley seed germination was examined before and after O₃ treatment according to the method proposed by the International

Seed Testing Association (1985). The seeds were allowed to germinate between two blotter paper layers at 25–27 °C for 8 days and the percentage of germination was calculated. The tests were repeated four times and the averages were recorded.

2.2.5 Statistical analysis

All data were evaluated through the analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni as post-test. Here, the main results were expressed in terms of mean \pm standard deviation and values of $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$ were considered statistically significant.

3 RESULTS AND DISCUSSION

From the O₃ gas treatments (different times and concentrations) on the 5 species of *Fusarium* spores, it was possible to observe susceptibilities among them (species) including variation on the two O₃ concentrations effectiveness. On the other hand, the O₃ gas treatment effect on barley grain germination capacity was possible.

3.1 MYCOLOGICAL ANALYSIS AFTER O₃TREATMENT

Firstly, it is clear that all species had a decrease in their availability after the O₃ treatments (min reduction 8.2%, max reduction 93.3%). Figura 1.

In the case of *F. verticillioides*, (Figura 1 b) there was a significant reduction at 30, 120 and 180min of viable spores, highlighting 120 (P<0.001) and 180min (P<0.05) in both concentrations. The current study was similar to research proposed by Mylona et al., 2014 concerning *F. verticillioides*, inoculated conidia in maize. The results demonstrated that in both concentrations used (100ppm and 200ppm) the total of fungal CFUs/g was significantly reduced. In the same study, the treatments were also carried out *in vitro*, and the exposure showed an immediate effect (100%) after 30min of treatment at 200ppm (MYLONA et al., 2014). Additionally, in a previous study by Savi and Scussel., 2014 *in vitro* showed good efficacy against *F. verticillioides* spores and slight inhibition of mycelial growth with some morphological changes in hyphal permeability.

In contrast, for *F. graminearum*, (Figura 1 c) the O₃ treatment was significantly effective at 60, 120, 180min, emphasizing 120 min in both concentrations (P<0.05-40ppm, P<0.01-60ppm). This represents a 66.7

and 92.6% reduction, respectively. Furthermore, only at 180min at 60ppm ($p < 0.05$) did the availability of the spores show a decrease, representing a 90 % reduction. The same idea can be seen in a study proposed by Kottapalli et al., 2005 in malting barley, which showed a significant reduction, which represented 24 - 36% at a concentration of 11 and 26mg/g, respectively, for 15min. Furthermore, in another *in vitro* study, it was verified that *F. graminearum* exposed for 60min at 60ppm did not show any growth until the eighth day of incubation (SAVI; SCUSSEL, 2014).

Considering *F. semitectum* (Figura 1 a), this species were significantly reduced after 60min, 120min and 180min in both concentrations, 40ppm and 60ppm of O₃ treatment, compared with the control group.

Regarding *F. oxysporum* (Figura 1 d), it can be seen from the chart that there were significant reductions of the viable spores at 30, 60 and 120min, with a more accentuated decrease after 120min of exposure at 40ppm ($p < 0.001$), representing a 66.3% reduction.

Finally, the last *Fusarium* species treated in malting barley was *F. poae* (Figura 1 e). The exposure time and concentration that showed the most significant reduction on the viable spores were at 60, 120 and 180min, at both concentrations. All reductions were statistically significant ($P < 0.01$), compared to the control group. It is necessary to mention that this specie demonstrated the greatest decrease (93.3%) compared to the other species.

To our knowledge, no previous studies in the literature have examined the efficacy of O₃ treatment in *F. semitectum*, *F. oxysporum* and *F. poae*. In summary, the data discussed on O₃ exposure showed some promising results on all *Fusarium* species studied in malting barley, emphasizing high levels of decontamination compared to some studies.

Figures 1 and 2. show data obtained on the O₃ gas effects on each *Fusarium* species (at different times of exposure and concentrations) and barley grain germination respectively.

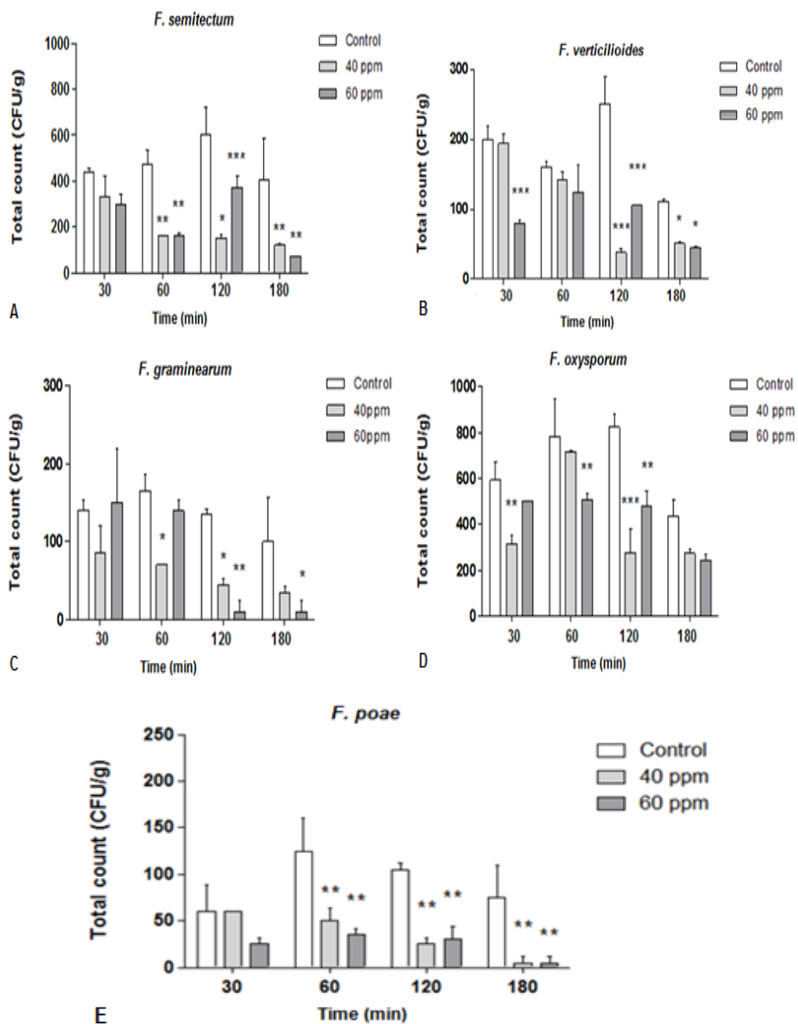


Figure 1. Ozone gas effects on 5 different *Fusarium* species during 30 to 180 min exposure time, at concentrations of 40 and 60 ppm (a) *F. semitectum*, (b) *F. verticillioides*, (c) *F. graminearum*, (d) *F. oxysporum*, (e) *F. poae*.

[* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$]

3.2 O₃GAS EFFECT ON MALTING BARLEY SEED GERMINATION

Regarding the malting barley seed germination after the O₃ treatment (which is an important and expected feature for breweries grain selection), no effect was observed after 120 min of exposure at the concentration of 60 ppm. Therefore, the expected seed germination capacity was kept to its minimum (95%), and was in accordance with the regulation. Figure 2 shows the Control and Treated seeds germination with similar length of seminal root and coleoptiles, reaching a mean for Control group of 3.4 mm and 29 mm respectively, and for Treated group 4.4 mm and 33.4 mm, respectively. Other surveys have reported similar results with O₃ treatments, which showed no effects on malting barley germination (ALLEN et al., 2014). Considering other studies with O₃ in grains (wheat), the treatments also did not affect the germination (SAVI et al., 2014). In addition, the germination capacity can only be influenced by high concentrations of O₃ at long times of treatment (ALLEN et al., 2014).

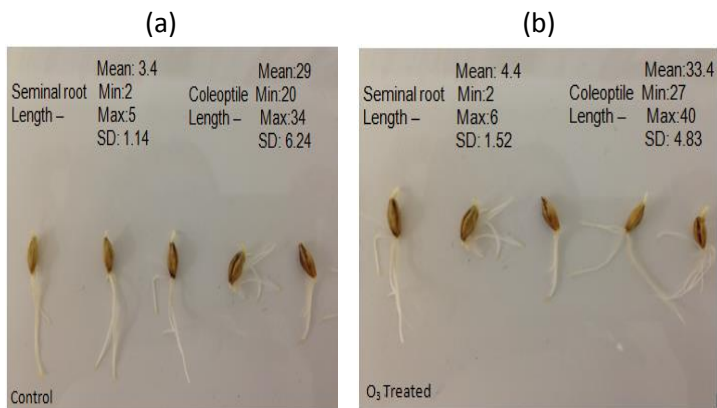


Figure 2. Malting barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination (a) Control (no O₃) and (b) O₃ treatment at 60ppm for 180min.

4 CONCLUSION

The experimental results showed that the O₃ was able to effectively inactivate all *Fusarium* species with the conditions applied in the current study with malting barley. The species that was more susceptible (high reduction) to O₃ gas was *F. poae*, with 93,3% inhibition (60 ppm at 180 min), followed by *F. graminearum* with 92.6% (60 ppm at 120 min). Taking into account the O₃ effect on malting barley germination after O₃ exposures, no effects were observed in the grains, neither in the coleoptiles or seminal roots.

According to the current study, it is possible to mention that the O₃ gas has a strong antifusarium effect and may be a promising green procedure, with potential applications in grain postharvest and in the food industry.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA Wheat) of Passo Fundo, RS, Brazil, for providing the barley grain samples and CAPES and CNPQ for financial support.

6. REFERENCES

ALLEN, B.; WU, J.; DOAN, H. Inactivation of Fungi Associated with Barley Grain by Gaseous Ozone. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v. 38:5, p. 617-630, 2007.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (16th ed) American Public Health Association, Washington, 1999.

BACKHOUSE, D.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A. Biogeography of *Fusarium*. B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, L.M. Burgess (Eds.), *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium, APS Press, St Paul, Minnesota, p. 122–137, 2001.

CATALDO, F. Ozone decomposition of patulin - a mycotoxin and food contaminant. **Ozone: Science & Engineering**, v. 30, p.197-201, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and tricothecenes CAC/RCP 51–2003, p. 1–8,2003.

FAKHRUNNISA, HASMHI, M. H.; GHAFFAR, A. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. **Pakistan Journal of Botany**, v.38, p.185-192, 2006.

FDA - United States Food and Drug Administration. GRAS status of ozone. Federal Register,v. 47, p. 50209-50210, 1982

GIORDANO, B.N.E.; NONES, J.; SCUSSEL. V.M. Susceptibility of the in shell Brazil nut mycoflora and aflatoxin contamination to ozone gas treatment during storage. **Journal of Agricultural Science**, v. 4,p. 1–10, 2012.

GONZALEZ PEREYRA M.L.; ROSA, C.A.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L,R. Mycobiota and mycotoxins in malted barley and brewer's spent grain from Argentinean breweries. **Letters in Applied Microbiology**. v. 53(6), p. 649-55, 2011.

GRAHAM, D.M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**,v. 51,p. 72-75,1997.

International Seed Testing AssociationInternational rules for seed testing rules. **Seed Sci. Technol**, v.13,p. 299–335, 1985.

IVIC, D.; KOVACEVIK, B.; VASILJ, V.; IDZAKOVIC, N. Occurrence of potentially toxigenic *Fusarium verticillioides* and low fumonisin b1 content on barley grain in Bosnia and Hercegovina. **Journal of applied botany and food quality**, v. 84, p. 121 – 124, 2011.

KARACA, H.; VELIOGLU, Y.S. Effects of some metals and chelating agents on patulin degradation by ozone. **Ozone: Science & Engineering**, v. 31, p. 224-231, 2009.

KARACA, H.; VELIOGLU, Y.S.; NAS, S.Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone. **Toxin Reviews**, v. 29, p. 51-59, 2010.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide, a comparative study. **International Journal Food Microbiology**, v. 71, p. 131- 138, 2001.

KOTTAPALLI, B.; WOLF-HALL, C.E.; SCHWARZ, P. Evaluation of gaseous ozone and hydrogen peroxide treatments for reducing *Fusarium* survival in malting barley. **Journal of Food Protection**, v.68, p. 1236-1240,2005.

MAENETJE P.W.; DUTTON, M. F. The incidence of fungi and mycotoxins in South African barley and barley products. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 42, p. 229-236, 2007.

MCDONOUGH, M.X.; CAMPABADAL, C.A.; MASON, L.J.; MAIER, D.E.; DENVIR, A.; WOLOSHUK, C. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, p. 249-254,2011.

MYLONA, K.; KOGKAKI, E.; SULYOK, M.; MAGAN, N. Efficacy of gaseous ozone treatment on spore germination, growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* *in vitro* and *in situ* in maize. **Journal of Stored Products Research**, v.59, p. 178-184, 2014.

OLIVEIRA, P.M.; MAUCH, A.; JACOB, F.; WATERS, D. M.; ARENDT, E.K. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. **International Journal of Food Microbiology**,v. 156, p. 32–43,2012.

OSBORNE, L.E.; STEIN, J.M. Epidemiology of fusarium head blight on small-grain cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 103-108, 2007.

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. **Journal of stored products and research**, v.59, p. 245-253, 2014.

SAVI, G.D.; SCUSSEL, V.M. Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* genera. **Ozone Sci. Eng.**, v.36, p. 144-152, 2014.

SCHWARZ, P.; SCHWARZ, J.; ZHOU, A.; PROM, L.; STEFFENSON, B. Effect of *Fusarium graminearum* and *F. poae* infection on barley and malt quality. **Monatsschrift fur Brauwissenschaft**, v. 54, p. 55–63,2001.

SCUSSEL, V.M.; GIORDANO, B.N.; SIMAO, V.; MANFIO, D.; GALVAO, S.; RODRIGUES, M.N.F. Effect of Oxygen-Reducing Atmospheres on the Safety of Packaged Shelled Brazil Nuts during storage. **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1-9, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. (fourth ed), p. 624 São Paulo, Varela.2010.

VAUGHAN, A.; SULLIVAN, T. O.; SINDEREN, D. V. Enhancing the microbiological stability of malt and beer e a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v.111,p. 355-371,2005.

WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M.A. Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p. 1288-1293.2006.

ZORLUGENÇ, B.; ZORLUGENÇ, F.K.; ÖZTEKIN, S.; EVLIYA, I.B. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B₁ in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3593-3597,2008.

CAPÍTULO 5
ANÁLISE MICROESTRUTURAL E FÍSICO-QUÍMICA
CULTIVARES BRASILEIROS DE CEVADA (*Hordeum vulgare*
L.) CERVEJEIRA

RESUMO

A cultura de cevada é usada principalmente para aplicações de malte e cerveja e seu uso industrial tem tido um crescimento contínuo, principalmente, devido à sua importância econômica para a indústria cervejeira. Com base nisso, é importante ressaltar a qualidade do grão e do malte produzido correspondente. Um fator determinante principal no que diz respeito a qualidade do grão é a composição estrutural do cereal. Tal fator é principalmente associado com a capacidade de germinação, produção de enzimas, conteúdo de proteínas, bem como os constituintes celulares do endosperma. Por estas razões, o objetivo do presente estudo foi verificar as diferenças entre genótipos de malte de cevada considerando as características físico-químicas e microestruturais. Os genótipos apresentaram menores quantidades de amido do que o esperado, variando entre 45,99-51,86 g / 100 g, e as quantidades de proteína estavam de acordo com a legislação, com valores que variaram entre 9,72 e 11,82%. O cultivar BRS Brau teve as características de melhor qualidade para a cevada em comparação com os outros, destacando, elevado teor de amido, com mais presença de grânulos tipo-A e baixas quantidades de proteína.

ABSTRACT

The barley culture is used mainly for malting and brewing applications and its industrial use has experienced continuous growth mainly due to its economic importance for malt and beer production. Based on this, it is important to emphasize the quality of the grain and the corresponding malt produced. A major factor determining grain quality is the structural composition of the mature cereal. This is associated mainly with the germination capacity, enzyme production, protein content as well as the cellular constituents of the endosperm. For these reasons, the objective of the present study was to verify the differences between malting barley genotypes in their physical and chemical characteristics and microstructure. In general, the genotypes presented lower quantities of starch than expected ranging from 45.99 to 51.86 g/100g, and the amounts of protein were in agreement with the regulations with values ranging 9.72 to 11.82%. Under the scanning electron microscope, the lines showed no differences in the degree of the starch-protein association and the continuity of protein matrix. The BRS Brau had the best quality characteristics for malting barley comparing to the others,

highlighting, high starch content with more presence of starch A-type granules and low amounts of protein.

INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) é considerada um dos cereais mais importantes do mundo, com uma produção global estimada acima de 141 milhões de toneladas distribuídas em aproximadamente de 50 milhões de hectares em 2013 (USDA, 2014).

A cultura é usada principalmente para aplicações de malte e cerveja e seu uso industrial tem mostrado um crescimento contínuo, principalmente, devido à sua importância econômica para a indústria cervejeira (OLIVEIRA et al., 2012).

Com base nisso, é importante ressaltar a qualidade do grão e do malte correspondente. Um fator determinante no que diz respeito a qualidade do grão é a composição estrutural do cereal. Isso, é principalmente associado com a capacidade de germinação, produção de enzimas, o conteúdo de proteínas, bem como dos constituintes celulares do endosperma (MUNCK, 1991).

As fibras de proteína do endosperma podem afetar a qualidade de cevada, retardando o processo de maltagem. No caso das fibras, pode causar um aumento no tempo necessário para a maltagem, e também ser responsáveis por problemas como dificuldade durante o processo de filtração, e conseqüentemente a turvação do produto final (PALMER, 1989). Para a eficiência de maltagem, os grãos de cevada devem fornecer uma quantidade baixa de β -glucanas e de proteína, elevado teor de amido para aumentar o rendimento, elevada atividade enzimática e de germinação para garantir a degradação do endosperma. (BRENNAN et al., 1997).

Os aspectos acima mencionados são influenciados principalmente pela variação climática e fatores genéticos. As temperaturas elevadas podem acelerar o desenvolvimento de plantas com um efeito negativo sobre o grão (BERTHOLDSSON, 1999; NILSSEN ANKER et al., 2006) na fase de maturação. Em climas secos e quentes, o conteúdo de proteína pode aumentar e, por conseguinte, causar dureza do endosperma, o que é indesejável, tanto para a produção quanto para a qualidade do processamento do malte e da cerveja (PALMER, 1989; ANKER-NILSSEN et al., 2006).

Para evitar perdas econômicas para a indústria cervejeira devido a fatores, a seleção da matéria-prima é fundamental (AASTRUP; ERDAL, 1980; MUNCK, 1991). A microestrutura do endosperma e as

características físico-químicas devem ser levados em consideração para otimizar a atividade de enzimas (PALMER, 1989), melhorando o processo de produção da cerveja e, conseqüentemente, a qualidade do produto final.

De acordo com as normas brasileiras, a cevada deve apresentar características, como o poder de germinação de no mínimo 95%, teor de proteínas inferior a 12% e teor de umidade inferior a 13%. No Brasil, a causa principal e mais importante de desqualificação para o malte é o baixo índice de germinação devido às chuvas durante a colheita (BRASIL, 1996).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar as diferenças entre genótipos de malte de cevada cultivada no Brasil, de acordo com as características físico-químicas, microestruturais e, além disso, associá-los com o seu potencial para a produção de malte.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Amostras

Um total de cinco genótipos de cevada recomendadas para cultivo no Brasil (BRS Brau, BRS Cauê BRS Elis, BRS Korbel e PFC 2.008.058), provenientes da colheita de 2013, foram coletados. Cada amostra foi limpa e moída em um moinho equipado com uma tela de 0,5 milímetros, de acordo com o método oficial da American Association of Cereal Chemists (AACC, 1995). As amostras foram armazenadas a -20° C para análise.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Análises físico-químicas consideradas:

Proteína, β -glucanas, cinzas, composição de amido, umidade e atividade de água (aw).

As análises de proteínas e β -glucanas foram realizadas de acordo com os métodos oficiais da AACC (46-12 / 32-23, respectivamente) e da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). Os resultados foram expressos em g / 100 g (base seca). No que diz respeito a composição de amido, as amostras foram analisadas usando o método proposto pela AOAC 996,11 (2005). Para

teor de umidade, o método gravimétrico foi aplicado (AOAC, 2005). Para determinar aw, os grãos de cevada (2 g) foram submetidos a um equipamento Aqua-Lab 4TE.

2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realizar as análises de microestrutura, os grãos de cevada secos foram descascados e quebrados manualmente em duas metades, para assegurar suas estruturas intactas. As amostras foram fixadas em bases de alumínio do MEV com fita dupla face de carbono para posterior revestimento com uma camada de ouro de 350 Å. Em seguida, as amostras foram examinadas usando o microscópio eletrônico de varredura JEOL (Peabody, MA, EUA), operado a 5 kV com uma distância de trabalho de 15 milímetros.

2.2.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados usando o software Sistema Statistica, versão 7.0 e foram expressos em média e desvio padrão. O nível de diferença significativa de 95% ($P \leq 0,05$) entre os genótipos de cevada de malte foi calculado por meio do Teste de Duncan. Todos os testes foram realizados por pelo menos duas vezes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Primeiramente, no que diz respeito a legislação, é importante ressaltar que o teor de proteína da cevada deve ter valores inferiores a 12%, a fim de ser considerada uma boa fonte para a produção de cerveja. No presente estudo, os resultados de proteína dos cinco genótipos de malte de cevada, estavam de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1996), com valores que variam entre 9,72-11,82% (Tabela 1). Além disso, o estudo mostrou semelhanças com os estudos de Brennan et al (1996). Por outro lado, em outra pesquisa realizada no Brasil em 2007, diferentes genótipos apresentaram valores mais elevados (variando 12,4-14,5%) em comparação com os cultivares recomendados atualmente. (SOARES et al., 2007).

Considerando o teor de amido, a maior parte dos estudos com cevada cervejeira demonstra que este é o principal componente que determina qualidade na produção de cerveja. Os dados do presente

estudo variaram entre 45,99-51,86 g / 100g (Tabela 1) e estes foram menores do que o esperado (60 g / 100 g), considerando a legislação e estudos anteriores (MACGREGOR; FINCHER, 1993). Além disso, o teor de amido pode ser positivamente associado com uma melhor qualidade do malte. (TSCHOPE; NOHEL, 1999; MACGREGOR; FINCHER, 1993).

No que diz respeito a β -glucanas, as variações encontradas entre os genótipos são o resultado das diferenças genéticas e ambientais. Esta propriedade pode ser utilizada pela indústria de malte na escolha de cevada para produção de malte (ELFVERSSON et al., 1999; ANDERSSON et al., 1999). De acordo com Aastrup e Erdal (1980), a β -glucanassão o principal componente responsável pelo atraso no processo de filtração e a turbidez da cerveja. No entanto, no presente estudo, os genótipos estavam de acordo com os parâmetros esperados (3,0 a 4,5g / 100g) (PALMER, 1989), variando entre 3,00-3,96 g / 100g (Tabela 1).

Com base nos dados de umidade e atividade de água, ambos os resultados estavam de acordo com a legislação brasileira com valores que variaram entre 11,58-12,09 e 0,60-0,61, respectivamente. Isto demonstra que estas variedades não eram propensas a contaminação fúngica, por exemplo. Além disso, vale comentar que a contaminação fúngica pode diminuir a disponibilidade de amido (ARCHER; PEBERDY, 1997).

Com base nos resultados mencionados anteriormente, os genótipos apresentaram resultados satisfatórios em relação a maior parte dos parâmetros físico-químicos avaliados. É necessário comentar que apenas os níveis de amido estavam abaixo dos limites esperados. Isto pode estar relacionado com as condições ambientais de crescimento, tais como o clima e da temperatura (ANKER-NILSSEN et al., 2006). Além disso, os parâmetros genéticos podem também estar relacionados.

Comparando os parâmetros entre os genótipos, o teor de proteína de BRS Caue, foi considerado significativamente maior do que os outros. No mesmo contexto, os resultados de amido mostraram uma diferença significativa entre as amostras. β -glucanas, teor de umidade e atividade de água não apresentaram diferença. As estatísticas descritivas estão descritas na Tabela 1.

Table 1. Média da composição química de 5 genótipos de cevada cervejeira do Brasil. (g/100g ind.b).

Genotype	Protein (N x 5.83)	Starch	Ash	β -glucans	Moisture content	Water activity
BRS Elis	10.07 \pm 0.04 ^a	45.99 \pm 0.001 ^c	2.17 \pm 0.04 ^a	3.00 \pm 0.93 ^a	12.09 \pm 0.20 ^a	0.60 \pm 0.02 ^a
BRS Brau	9.72 \pm 0.54 ^a	51.60 \pm 0.48 ^{ab}	2.19 \pm 0.01 ^a	3.96 \pm 0.60 ^a	11.97 \pm 0.01 ^a	0.61 \pm 0.03 ^a
PFC20080 58	9.90 \pm 0.14 ^a	51.86 \pm 2.89 ^a	2.54 \pm 0.08 ^b	3.76 \pm 0.15 ^a	11.87 \pm 0.63 ^a	0.61 \pm 0.03 ^a
BRS Korbel	10.09 \pm 0.13 ^a	50.68 \pm 1.27 _{ab}	2.16 \pm 0.07 ^a	3.53 \pm 0.07 ^a	11.58 \pm 0.44 ^a	0.61 \pm 0.02 ^a
BRS Cauê	11.82 \pm 0.37 ^b	47.94 \pm 0.36 ^{bc}	2.29 \pm 0.13 ^a	3.94 \pm 0.32 ^a	11.93 \pm 0.02 ^a	0.60 \pm 0.02 ^a

Means with different letters in the same column are statistically different with significant levels of 95% ($P \leq 0.05$).

3.2 MICRO-ESTRUTURA DOS GENÓTIPOS DE MALTE DE CEVADA

Todos os genótipos de cevada de malte apresentaram padrões semelhantes de tamanho das células e distribuição sob o SEM. No que diz respeito a estrutura dos grãos, eles são compostos do endosperma amiláceo, a qual mostraram tanto grânulos de amido do tipo A quanto do tipo B. No entanto, é possível destacar que alguns genótipos apresentaram mais quantidades de amido do tipo A do que o amido de tipo B. Considerando o malte e, conseqüentemente, a produção de cerveja, a qualidade dos grãos depende principalmente da quantidade de grânulos de amido do tipo-A, para que possa ser considerado adequado e de qualidade. (BRENNAN et al., 1997). Comparando as micrografias com as análises físico-químicas, o genótipo BRS Elis apresentou a menor quantidade de amido e PFC 2008058 a maior quantidade.

O genótipo BRS Brau apresentou imagens com alta quantidade de amido, destacando principalmente grânulos de amido do tipo A. Comparando a quantidade de amido tipo A, BRS Brau apresentou maior quantidade do que BRS Caue, e os grânulos eram maiores. Além disso, BRS Brau mostrou ter paredes celulares espessas.

Considerando PFC 2008058, como mencionado anteriormente, este genótipo mostrou níveis elevados de amido e os grânulos de amido de tipo A são menos abundante do que o amido de tipo B no seu estudo micro-estrutural.

Quanto à associação de amido-proteína e continuidade da matriz protéica, os genótipos mostraram semelhança nesses aspectos. Verificou-se que os genótipos, principalmente BRS korbelt, têm uma associação de amido-proteína forte, onde os grandes e pequenos grânulos de amido são enterrados numa matriz de proteína não-uniforme e altamente irregular. Este tipo de estrutura é indesejável porque pode atrasar o processo de maltagem (Palmer, 1989).

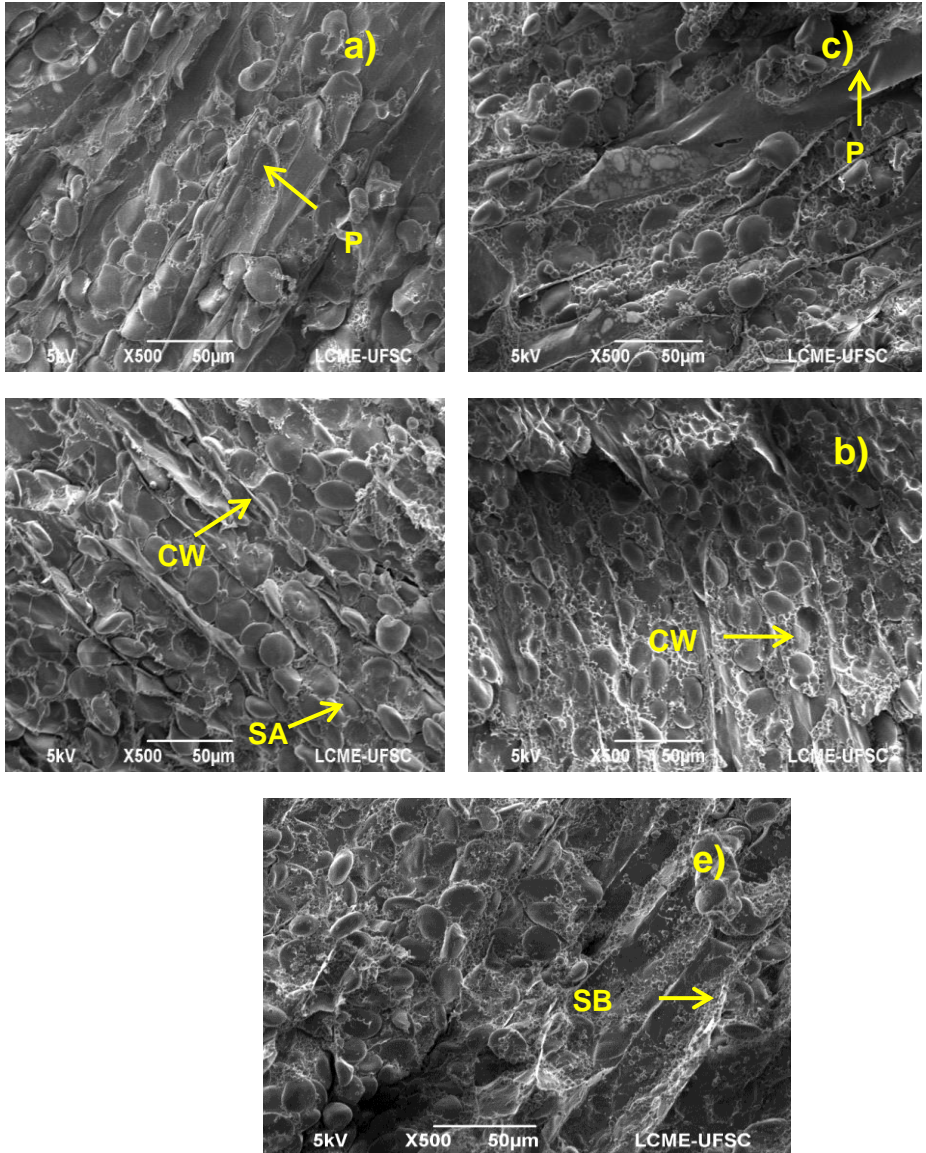


FIGURA 1. Microestrutura dos genótipos de cevada cervejeira: a) Elis; b) Brau; c) PFC; d) Korbelt; e) Caue. P= Proteína; CW= Cell wall; SA: starch A-type; SB: starch B-type.

4 CONCLUSÃO

A composição química dos genótipos de cevada cervejeira estudadas, foram confirmadas pela análise microestrutural. Em geral, os genótipos apresentaram menores quantidades de amido do que o esperado, contudo as quantidades de proteína estavam de acordo com os regulamentos.

Sob o MEV, os cultivares não apresentaram diferenças no grau de associação proteína amido e da continuidade da matriz protéica. BRS Brau apresentou características de melhor qualidade para o malte em comparação com os outros, destacando, elevado teor de amido, com mais presença de amido A-tipo grânulos e baixas quantidades de proteína.

Finalmente, o estudo contribui para a compreensão da composição e propriedades físicas dos genótipos de malte de cevada brasileiros cultivados atualmente e podem sugerir mais pesquisas para o melhoramento genético do cultivares de cevada cervejeira.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Trigo) de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, pela disponibilidades das amostras de grãos de cevada, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

AASTRUP, S.; ERDAL, K.. Quantitative Determination of endosperm Modification and its Relationship to the content of 1,3:1,4- β -Glucans during Malting of Barley. **Carlsberg Research Communication**, v.45, p. 369-379, 1980.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC). Approve Methods. St. Paul, Minnesota, 9th ed. 1995.

ANDERSSON, A.A.M.; ANDERSSON, R.; AUTIO, K.; ÅMAN, P. Chemical composition and microstructure of two naked waxy barleys. **Journal of Cereal Science**, v. 30, p. 183-191,1999

ANKER-NILSSEN, K.; FÆRGESTAD, E.M.; SAHLSTRØM, S.; UHLEN, A.K.. Interaction between barley cultivars and growth temperature on starch degradation properties measured in vitro. **Anim. Feed Sci. Technol**, v. 130, p. 3–22, 2006.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg (MD).2005.

ARCHER, D.B.; PEBERDY, J.F. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 17, p. 273–306,1997.

BERTHOLDSSON, N.O.Characterization of malting barley cultivars with more or less stable grain protein content under varying environmental conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 10, p. 1-8, 1999.

BRASIL.Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 691, de 22 de novembro de 1996. Aprova a Norma de Identidade e Qualidade da Cevada, para comercialização interna. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 24751, 25 nov. Seção 1.1996.

BRENNAN, C.S.; AMOR, M.A.; HARRIS, N.; SMITH, D.; CANTRELL, I.; GRIGGS, D.; SHEWRY, P.R.Cultivar differences in modification patterns of protein and carbohydrate reserves during malting of barley. **Journal of Cereal Science**, v. 26, p. 83-93,1997.

ELFVERSON, C.; ANDERSSON, A.A.M.; ÅMAN, P.; REGNÉR, S. Chemical composition of barley cultivars fractionated by weighing, pneumatic classification, sieving, and sorting on a specific gravity table. **Cereal Chemistry**, v. 76, 3, p. 434-438,1999.

MACGREGOR, A. W.; FINCHER, G. B.Barley chemistry and technology. In: MacGregor, A. W., Bhatti, R. S. Barley: Chemistry and Technology. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc, p. 486, 1993.

MACGREGOR, A. W.; FINCHER, G. B.Carbohydrates of the barley grain In: MacGregor, A. W., Bhatti, R. S. Barley: Chemistry and Technology. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc, p. 73-130,1993.

MUNCK, L. Advances in barley quality. Experiences and Perspectives. Options Méditerranéennes – Série Séminaires. New Trends in Barley Quality for Malting and Feeding, v. 20, p. 9-18,1991.

OLIVEIRA, P.M.; MAUCH, A.; JACOB, F.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Fundamental study on the influence of Fusarium infection on quality and ultrastructure of barley malt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 32–43, 2012.

PALMER, G.H. Cereals in Malting and Brewing. In: Palmer, G.H. Cereal Science and Technology. UK: Aberdeen University Press, p. 61-242,1989.

SOARES, R.M.D.; DE FRANCISCO, A.; RAYAS-DUARTE, P.; SOLDI, V. Brazilian hull-less and malting barley genotypes: 1. Chemical composition and partial characterization. **Journal of food quality**, v.30, p. 357-371, 2007.

TSCHOPE, E. C.; NOHEL, F. A malteação da cevada. Vassouras: Senai – RJ. 272.1999.

USDA., 2014. World agricultural production: grains: Grains: world markets and trade archives 2011 Available in: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1487>>. Accessed in: 10.01. 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As concentrações de DON e FBs encontradas nas cervejas artesanais foram provavelmente oriundas da cevada cervejeira utilizada para a fabricação da cerveja.
- As micotoxinas mostraram-se estáveis durante o processamento da cerveja.
- A eliminação de ambas as toxinas deve ser considerada pela indústria, por razões de qualidade e segurança.
- Os resultados do estudo podem ajudar na escolha de uma melhor matéria prima, para que não ocorram problemas de qualidade do produto final, bem como para segurança dos consumidores.
- O gás ozônio demonstrou ser efetivo no crescimento das espécies de *Fusarium* estudadas, e pode ser uma técnica promissora na pós-colheita de grãos e na indústria, com potenciais aplicações.
- O estudo com os 5 genótipos recomendados para cultivo no Brasil, podem sugerir mais pesquisas para o melhoramento genético de cevada cervejeira.

ANEXOS

Food Control 50 (2015) 925–929



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer



Karim Cristina Piacentini, Geovana Dagostim Savi, Gisele Olivo, Vildes Maria Scussel

Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2014

Received in revised form

21 October 2014

Accepted 23 October 2014

Available online 1 November 2014

Keywords:

Craft beer

Mycotoxins

Quality

Barley

ABSTRACT

Beer is an alcoholic beverage consumed on a regular basis by many people around the world. Consequently, beer quality and, specifically, its impact on the future health of the consumer must be considered seriously. One issue is the action of mycotoxins and their impact on the beverage. In this sense, the objective of the present study was to determine the occurrence of Deoxynivalenol (DON) and Fumonisin B₁ (FB₁) in many artisanal beers from southern Brazil and, additionally, to evaluate their physico-chemical properties.

The methods applied for physico-chemical characteristics were from the AOAC and Adolfo Lutz Institute. The analyses for mycotoxins were conducted using high performance liquid chromatography with fluorescence detection for fumonisin B₁ and ultraviolet detection for deoxynivalenol. The physico-chemical results were in agreement with some studies and with Brazilian regulations. DON and FB₁ were present in 32 and 15.09% of the samples, respectively. The concentrations found in craft beer from southern Brazil were probably caused by the widespread and high occurrence of these toxins in barley. Furthermore, the level of mycotoxins seem to be very stable during the brewing process.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.