Efeito das etapas de elaboração de cerveja Ale nos níveis de eniatinas

Laura Oliveira Lago¹, Rafaela Diogo Silveira¹, Júlia Barreto Hoffmann Maciel¹, Flávio Fonseca Veras¹, Juliane Elisa Welke¹

Resumo

Eniatinas (ENs) são micotoxinas emergentes com potencial citotóxico encontradas em produtos de cereais, como malte usado para a fabricação de cerveja. O objetivo deste estudo foi avaliar o destino da ENA, ENA1, ENB e ENB1 ao longo das etapas de produção de cerveja Ale. Um método baseado no uso da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi validado para o monitoramento de ENs nas etapas de elaboração de cerveja. O método apresentou linearidade ($R^2 > 0,99$) e recuperação (88 - 99%), repetibilidade (coeficiente de variação $< 8,7\%$) e precisão intermediária (coeficiente de variação $< 9,0\%$), de acordo com diferentes diretrizes de validação do método. Os valores de LOD e LOQ mostraram que o método é suficientemente sensível para determinar ENs em todas as etapas da produção de cerveja. Os maiores valores de LOD ($0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$) e LOQ ($0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram verificados para ENA1 e ENB em mosto filtrado, mosto fervido e precipitado pós-fermentação. Durante os estágios de produção de cerveja, os níveis de ENA, ENA1, ENB e ENB1 foram significativamente reduzidos, garantindo que as cervejas estivessem livres dessas micotoxinas emergentes. Em contraste, ENs foram encontradas em todos os subprodutos (bagaço do malte, precipitado pós-fervura e precipitado pós-fermentação) da produção de cerveja devido à sua baixa solubilidade em água. Portanto, a principal fonte de preocupação com relação à exposição a ENs parece ser os subprodutos da elaboração de cerveja. Cabe ressaltar que esses subprodutos são destinados à alimentação animal ou adicionados a alimentos para aumentar o teor de fibra e proteína.

Palavras-chave: micotoxina; processamento; alimentação animal.

Introdução

O papel das etapas de elaboração de cerveja na redução dos níveis de micotoxinas legisladas é bem conhecido ((HABLER *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2014; PASCARI *et al.*, 2019; VACLAVIKOVA *et al.*, 2013). No entanto, além das micotoxinas regulamentadas, existem as micotoxinas emergentes, como as eniatinas (ENs). Esses compostos não são regulamentados por legislação, embora a literatura tenha relatado sua alta ocorrência e concentração em produtos de cereais com níveis de até $5.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (DRAKOPOULOS *et al.*, 2021; IWASE *et al.*, 2020; ORLANDO *et al.*, 2019).

As ENs mais prevalentes em cereais são ENA, ENA1, ENB e ENB1. Em relação à toxicidade dessas micotoxinas emergentes, investigações *in vitro* relataram um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, perda do potencial de membrana mitocondrial e indução de apoptose e necrose (PROSPERINI *et al.*, 2013). O mecanismo de citotoxicidade das ENs está relacionado à sua capacidade de atuar como ionóforo, uma vez que esses compostos se incorporam facilmente à membrana celular e formam poros seletivos para o transporte de cátions (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) através da membrana, modificando o comportamento eletroquímico normal do gradiente dentro e fora das células (CIMBALO *et al.*, 2021). A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) relatou uma preocupação sobre a exposição crônica às ENs e sugeriu que mais investigações sejam feitas para avaliar o risco humano a essas micotoxinas (PANEL; CHAIN, 2014).

A cerveja pode ser uma importante fonte de exposição as ENs, uma vez que essas micotoxinas foram relatadas nas matérias-primas (DRAKOPOULOS *et al.*, 2021; IWASE *et al.*, 2020; ORLANDO *et al.*, 2019) e podem ser transferidas para a cerveja durante o processamento. Considerando o tipo de fermentação, as cervejas são classificadas como Lager e Ale. A Ale é uma cerveja de alta fermentação devido à flutuação das leveduras no tanque de fermentação, uma vez que esta etapa é realizada a $15\text{--}25^\circ\text{C}$ por 5 a 10 dias. Ao contrário, as leveduras permanecem no fundo durante a fermentação Lager, que ocorre a $7\text{--}14^\circ\text{C}$ durante 7 a 14 dias (PARKER, 2012). O papel do processamento da cerveja Lager nos níveis de ENs foi avaliado por VACLAVIKOVA *et al.* (2013), HU *et al.* (2014) e Habler *et al.* (2017), que relataram uma diminuição na quantidade de ENs durante as etapas de elaboração da cerveja Lager. O papel das etapas de elaboração de cerveja Ale nos níveis de micotoxinas está sendo avaliado pela primeira vez neste estudo. O objetivo deste estudo foi avaliar o destino de ENA, ENA1, ENB e ENB1 ao longo da produção de cerveja Ale.

Material e Métodos

Elaboração da cerveja

Malte moído (500 g) naturalmente contaminado com ENs foi adicionado a 2 L de água destilada (68°C) com agitação contínua e mantendo a temperatura a 65°C . A mosturação ocorreu até a conversão completa do amido em açúcares fermentáveis, o que foi verificado adicionando-se uma gota de solução de iodo a 2%

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43212, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; Email: juliane.welke@ufrgs.br

em um prato de porcelana branca contendo algumas gotas de mosto. A cor amarelo-ouro confirma a conversão completa do amido em açúcares menores, como a maltose e a maltodextrose. A temperatura do mosto foi aumentada para 78 °C e mantida por 10 min para desativar as enzimas. O método *Brew In a Bag* (BIAB) foi usado para o processo de filtragem, que envolve a separação do mosto filtrado e sólido residual (bagaço do malte). O mosto filtrado foi fervido a 90-95 °C durante 35 min. Lúpulo (1 g) foi adicionado quando a ebulição começou. O mosto foi resfriado a 20 °C em banho de gelo e as partículas suspensas foram agrupadas por meio de agitação mecânica (*whirlpool*), seguida da separação dos agregados decantados (precipitado pós-fervura). A levedura de alta fermentação (*Fermentis SafAle S-33*, 1 g diluída em 10 mL de água destilada) foi adicionada ao mosto para produzir cerveja Ale. A fermentação decorreu a 18 °C durante 6 dias e foi considerada finalizada quando as leituras da medição do ° Brix em refratômetro permaneceram constantes por 2 dias, o que equivale a densidade 1,008 e etanol 4,5%. Ao final da fermentação, o fermentado foi separado do sedimento de levedura (precipitado pós-fervura), adicionou-se açúcar (6 g L⁻¹) e a bebida foi transferida para garrafas âmbar de 350 mL. Os frascos foram mantidos em local escuro por 3 dias a 18 ± 3 °C para carbonatação. Após esse período, as garrafas foram armazenadas por 10-15 dias a 5 °C para completar a fase de maturação. As seguintes amostras foram coletadas durante a fermentação: malte, bagaço do malte, mosto filtrado, precipitado pós-fervura, mosto fervido, fermentado, cerveja verde, sedimento de levedura e cerveja.

Determinação das micotoxinas

A extração das amostras foi realizada de acordo com um procedimento QuEChERS relatado em um estudo anterior (LAGO *et al.*, 2021). As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo-tempo de voo (QTOFMS, (Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-Q III, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada com C18. coluna (Kinetex Core-Shell Technology 2,6 µm F5 100 Å, Estados Unidos da América) a 35 °C, taxa de fluxo de 0,4 mL min⁻¹. A fase móvel consistia em água ultrapura (fase A) e acetonitrila (fase B). Ambas as fases continham ácido acético 0,1% e acetato de amônio 4 mM. O gradiente da fase A e B foi de 60:40 a 44,6: 55,4 em 4 minutos, a 63:37 em 9 minutos, a 80:20 em 14 minutos e então para 40:60 em 19 minutos, respectivamente. Curvas analíticas foram obtidas para a quantificação das ENs em concentração variando de 0.05 – 250 µg kg⁻¹. O MS foi operado no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) e no modo de varredura completa para a identificação e quantificação das ENs, respectivamente. No MS, a voltagem capilar foi de 3,5 kV, a temperatura da fonte foi de 120 °C e a temperatura de dessolvatação foi de 400 °C.

Validação do método

Os parâmetros de validação do método incluíram linearidade, recuperação, precisão intermediária (reprodutibilidade), repetibilidade, limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção

(LOD), conforme estabelecido pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH 2005).

Resultados e Discussão

As curvas analíticas elaboradas por superposição de matriz (0.05 to 250 µg kg⁻¹) exibiram linearidade adequada com coeficientes de determinação (R^2) ≥ 0,99. Os menores valores de LOD (0,01 µg kg⁻¹) e LOQ (0,05 µg kg⁻¹) foram encontrados para ENA em todas as matrizes e ENB1 no mosto filtrado e mosto fervido. Os maiores valores de LOD (0,1 µg kg⁻¹) e LOQ (0,5 µg kg⁻¹) foram verificados para ENA1 e ENB em mosto filtrado, mosto fervido e precipitado pós-fermentação. A porcentagem de recuperação (88 - 99%), repetibilidade (RSD <8,7%) e precisão intermediária (RSD <9,0%) estavam de acordo com as diretrizes da FDA, AOAC e INMETRO.

A Tabela 1 mostra as características (fórmula molecular e massa teórica exata) e dados de MS [razão massa-carga (m/z) do íon precursor e dos íons produto] das ENs (ENA, ENA1, ENB e ENB1) avaliadas usando LC-QToF-MS. ENs foram detectados em modo positivo como aduto com NH₄⁺.

Tabela 1: Dados sobre as eniatinas avaliadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de tempo de voo quadrupolo (LC-QToF-MS)

Micotoxina	Fórmula Molecular	Massa teórica exata	m/z [M+NH ₄] ⁺	m/z íons produtos
ENA	C36H63N3O9	699.4908	699.4885	328; 210
ENA1	C35H61N3O9	685.4751	685.4719	328; 210
ENB	C33H57N3O9	657.4438	657.4420	214; 196
ENB1	C34H59N3O9	671.4595	671.4559	214; 196

O papel das etapas de elaboração da cerveja nos níveis de ENs foi mostrado na Figura 1. ENA, ENA1, ENB e ENB1 foram encontradas no malte em níveis médios de 23,3, 28,8, 103,5 e 72,7 µg kg⁻¹. A redução nos níveis das quatro ENs foi verificada ao longo das etapas de elaboração de cerveja (Figura 1). Os níveis de ENA, ENA1, ENB e ENB1 no mosto doce foram 86, 88, 87 e 87%, respectivamente, mais baixos do que no malte. As etapas de moagem e filtragem são responsáveis por esta redução nos níveis de ENs. O bagaço do malte é o principal subproduto do processo cervejeiro, no qual permanecem 25, 21, 25 e 25% de ENA, ENA1, ENB e ENB1, respectivamente.

A fervura também reduziu significativamente os níveis dos quatro ENs. ENA1 e ENB mostraram uma redução de 93 e 95%, respectivamente, após a fervura, conforme verificado quando o mosto fervido foi analisado, enquanto ENB e ENB1 não foram detectados no mosto fervido (100% de redução). Após as etapas seguintes (fermentação, carbonatação e maturação), nenhuma EN foi detectada garantindo cervejas livres dessas micotoxinas.

É importante ressaltar que esses subprodutos (bagaço do malte, precipitado pós-fervura e precipitado pós-fermentação) são destinados principalmente à alimentação animal devido ao seu alto teor de proteínas, fibras, vitaminas e minerais. Além disso,

Figura 1: Efeito das etapas de elaboração de cerveja Ale sobre os níveis de eniatinas. Para cada eniatina (ENA, ENA1, ENB e ENB1), as barras seguidas da mesma letra indicam que os níveis não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 425755 / 2016-9). A bolsa de Laura O. Lago foi concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- CIMBALO, A.; FRANGIAMONE, M.; JUAN, C.; FONT, G.; LOZANO, M.; MANYES, L. Proteomics evaluation of enniatins acute toxicity in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, v. 151, n. February, p. 112130, 2021.
- Comissão Europeia 2017. Commission Regulation (EU) 2017/1017 of 15 June 2017 amending Regulation (EU) No 68/2013 on the Catalogue of feed materials. Official Journal of the European Union, 48-119.
- DRAKOPOULOS, Dimitrios; SULYOK, Michael; KRSKA, Rudolf; LOGRIECO, Antonio F.; VOGELGSANG, Susanne. Raised concerns about the safety of barley grains and straw: A Swiss survey reveals a high diversity of mycotoxins and other fungal metabolites. *Food Control*, v. 125, p. 107919, 2021.
- HABLER, Katharina; GEISSINGER, Cajetan; HOFER, Katharina; SCHÜLER, Jan; MOGHARI, Sarah; HESS, Michael; GASTL, Martina; RYCHLIK, Michael. Fate of fusarium toxins during brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 1, p. 190-198, 2017.
- HU, Ling; GASTL, Martina; LINKMEYER, Andrea; HESS, Michael; RYCHLIK, Michael. Fate of enniatins and beauvericin during the malting and brewing process determined by stable isotope dilution assays. *LWT - Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 469-477, 2014.
- ICH - International Conference on Harmonization (Conferência Internacional de Harmonização). 2005. Validation of analytical procedures: Text and Methodology, Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline, London. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
- IWASE, Caio H.T.; PIACENTINI, Karim C.; GIOMO, Patrícia P.; ČUMOVÁ, Martina; WAWROSZOVÁ, Simona; BĚLÁKOVÁ, Sylvie; MINELLA, Euclides; ROCHA, Liliana O. Characterization of the *Fusarium sambucinum* species complex and detection of multiple mycotoxins in Brazilian barley samples. *Food Research International*, v. 136, n. March, 2020.
- LAGO, Laura Oliveira; NIEVIEROWSKI, Tássia Henrique; MALLMANN, Luana Peixoto; RODRIGUES, Eliseu; WELKE, Juliane Elisa. QuEChERS-LC-QTOFMS for the simultaneous determination of legislated and emerging mycotoxins in malted barley and beer using matrix-matched calibration as a solution to the commercial unavailability of internal standards for some mycotoxins. *Food Chemistry*, v. 345, n. October 2020, p. 1-13, 2021.
- MASTANJEVIĆ, Kristina; LUKINAC, Jasmina; JUKIĆ, Marko; ŠARKANJ, Bojan; KRSTANOVIĆ, Vinko; MASTANJEVIĆ, Krešimir. Multi-(Mycotoxins) in malting and brewing by-products. *Toxins*, v. 11, n. 1, 2019.
- ORLANDO, Béatrice; GRIGNON, Guénolé; VITRY, Cindy; KASHEFIFARD, Kambiz; VALADE, Romain. Fusarium species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Research*, v. 35, n. 4, p. 369-380, 2019.
- PANEL, Efsa; CHAIN, Food. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal*, v. 12, n. 8, 2014.
- PARKER, D.K. *Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis*. [S. l.]: Woodhead Publishing Limited, 2012.
- PASCARI, Xenia; RODRIGUEZ-CARRASCO, Yelko; JUAN, Cristina; MAÑES, Jordi; MARIN, Sonia; RAMOS, Antonio J.; SANCHIS, Vicente. Transfer of Fusarium mycotoxins from malt to boiled wort. *Food Chemistry*, v. 278, p. 700-710, 2019.
- PROSPERINI, A.; JUAN-GARCÍA, A.; FONT, G.; RUIZ, M. J. Reactive oxygen species involvement in apoptosis and mitochondrial damage in Caco-2 cells induced by enniatins A, A1, B and B1. *Toxicology Letters*, v. 222, n. 1, p. 36-44, 2013.
- VACLAVIKOVA, Marta; MALACHOVA, Alexandra; VEPRIKOVA, Zdenka; DZUMAN, Zbynek; ZACHARIASOVA, Milena; HAJJSLOVA, Jana. "Emerging" mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry*, v. 136, n. 2, p. 750-757, 2013.

pode ser usado como substrato para cultivo de microrganismos e produção de enzimas, e ainda na indústria de panificação como fonte de fibras alimentares (β -glucanas) (MASTANJEVIĆ *et al.*, 2019). Portanto, a análise desses subprodutos é recomendada para monitorar micotoxinas a fim de garantir a segurança de alimentos e rações (COMISSÃO EUROPEIA 2017).

Conclusões

Os níveis de ENA, ENA1, ENB e ENB1 foram significativamente reduzidos durante os estágios de produção da cerveja Ale, garantindo que as cervejas estivessem livres dessas micotoxinas emergentes. O destino dos ENs na fabricação de cerveja parece ser impulsionado principalmente por sua baixa solubilidade em água e sua sensibilidade ao calor durante a fervura. O acúmulo das ENs nos subprodutos da produção de cerveja (bagaço do malte, precipitado pós-fervura e precipitado pós-fermentação) pode ser uma preocupação quando esses subprodutos são adicionados a alimentos e rações para aumentar seu conteúdo de fibra e proteína.