

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**TESE**

**MICOTOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO: OCORRÊNCIA, EFEITOS DA**  
**OZONIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE UMA FORMA MODIFICADA**  
**DO DESOXINIVALENOL**

**FELIPE MACHADO TROMBETE**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**MICOTOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO: OCORRÊNCIA, EFEITOS DA  
OZONIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE UMA FORMA MODIFICADA  
DO DESOXINIVALENOL**

**FELIPE MACHADO TROMBETE**

*Sob a Orientação do Professor*

**DSc. Marcelo Elias Fraga**

*e Co-orientação da Professora*

**DSc. Tatiana Saldanha**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Março de 2016.

664.722  
T849m  
T

Trombete, Felipe Machado, 1988-  
Micotoxinas em grãos de trigo:  
ocorrência, efeitos da ozonização e  
determinação de uma forma modificada do  
desoxinivalenol / Felipe Machado Trombete. -  
2016.  
101 f.: il.

Orientador: Marcelo Elias Fraga.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, 2016.  
Bibliografia: f. 82-99.

1. Trigo - Microbiologia - Teses. 2.  
Alimentos - Contaminação - Teses. 3.  
Micotoxinas - Teses. 4. Ozonização - Teses.  
5. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Fraga,  
Marcelo Elias, 1967- II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**FELIPE MACHADO TROMBETE**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 18/03/2016



---

**Marcelo Elias Fraga. (Dr.) UFRRJ**  
(Orientador)



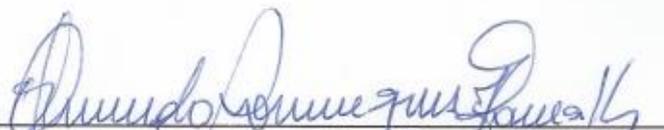
---

**Otniel Freitas-Silva. (PhD.) Embrapa Agroindústria de Alimentos**



---

**Flávia Beatriz Custódio. (Dr.<sup>a</sup>) UFRJ**



---

**Ormindo Domingues Gamallo. (Dr.) UFRRJ**



---

**Luiz Celso Hygino da Cruz. (Dr.) UFRRJ**

## AGRADECIMENTOS

- § Agradeço primeiramente ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela oportunidade da realização do doutorado e pelo suporte oferecido ao longo do curso;
- § À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado;
- § Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche, através do processo 201198/2014-2 – SWE;
- § Aos Professores Dr. Marcelo Elias Fraga e Dr<sup>a</sup>. Tatiana Saldanha, pela orientação, incentivo e ensinamentos transmitidos durante o mestrado e o doutorado;
- § À querida Professora Dr<sup>a</sup>. Glória Maria Direito, por todo o apoio e incentivo na execução dessa pesquisa e, pelos ensinamentos transmitidos;
- § Ao pesquisador PhD. Otniel Freitas Silva, pela orientação das atividades realizadas na Embrapa Agroindústria de Alimentos e, pela dedicação prestada a esse projeto;
- § Ao professor PhD. Armando Albino Dias Venâncio, pela orientação nas atividades realizadas no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, em Portugal;
- § Ao pesquisador PhD. Carlos Wanderlei Piler de Carvalho e à assistente de pesquisa M.Sc. Adriana Paula da Silva Minguita, pelo apoio e suporte na realização das análises no Laboratório de Cereais, da Embrapa Agroindústria de Alimentos;
- § Ao colega e parceiro de trabalho Yuri Duarte Porto por toda a ajuda e apoio na realização das atividades experimentais e; aos colegas doutorandos que contribuíram nas atividades experimentais e teóricas dessa pesquisa; em especial à Regiane Ribeiro dos Santos, Amanda Martins, Leandro Cappato e Fernanda Silva Ferreira;
- § Aos estagiários do projeto e demais bolsistas que auxiliaram nas atividades experimentais, em especial à Renata Vaqueiro e Thaís Barbosa;
- § Ao querido Dione Charles de Noronha pelo apoio e auxílio na revisão dos textos;
- § Aos familiares e amigos que sempre me incentivaram e sustentaram, sem os quais não seria possível a finalização desse curso, gratidão a todos!

*Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei  
Nada sei.  
(...)  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
De ser feliz.*

(Renato Teixeira)

## BIOGRAFIA

Felipe Machado Trombete, filho de Neide Joana Machado Trombete e Valter Trombete, nasceu em Americana, Estado de São Paulo, no dia 08 de setembro de 1988.

Formou-se em 2006 como Técnico em Agricultura e Zootecnia pelo então Centro Federal de Educação Tecnológica – CEFET Bambuí, MG.

Em 2010 graduou-se em Tecnologia em Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFMG Campus Bambuí. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica pela FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais), participando de pesquisas nas áreas de análises químicas e sensoriais com frutos do cerrado.

Em 2010 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), obtendo em 2012 o grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Durante o mestrado foi bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), desenvolvendo pesquisas nas áreas de determinação de micotoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e avaliações da qualidade química e microbiológica de queijos. Nesse período também foi estagiário voluntário no laboratório de resíduos e contaminantes de alimentos, da Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ, realizando atividades nas áreas de validação de métodos cromatográficos e determinação de micotoxinas em derivados lácteos.

Em 2012 foi aprovado no processo seletivo para doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo PPGCTA, com bolsa CAPES, desenvolvendo pesquisas nas áreas de determinação de micotoxinas em cereais e investigação dos efeitos da ozonização sobre micotoxinas, micro-organismos e qualidade de grãos de trigo. Durante o doutorado manteve o estágio voluntário na Embrapa Agroindústria de Alimentos, desenvolvendo pesquisas com aplicação de ozônio (O<sub>3</sub>) em cereais.

Durante o ano de 2015 foi investigador no Centro de Engenharia Biológica (CEB) da Universidade do Minho, Portugal, com bolsa de doutorado sanduíche pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), desenvolvendo pesquisas nas áreas de determinação de micotoxinas em cereais e validação de uma metodologia para identificação de micotoxina modificada em grãos de trigo. Em março de 2016 submeteu-se à defesa de tese para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo PPGCTA-UFRRJ, tendo sido aprovado pela banca examinadora.

## RESUMO

TROMBETE, Felipe Machado. **Micotoxinas em grãos de trigo: Ocorrência, efeitos da ozonização e determinação de uma forma modificada do desoxinivalenol**. 2016. 101p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

Micotoxinas são contaminantes naturais, produzidos por fungos filamentosos e, podem ocorrer em altos níveis nos alimentos. Nos grãos de trigo, a presença de tricotecenos, um grupo de micotoxinas produzidas por *Fusarium spp.* e, aflatoxinas, produzidas por *Aspergillus spp.*, representam um importante problema de saúde pública por serem tóxicas ao homem e animais e muito estáveis aos processos no qual o trigo é submetido para obtenção de produtos industrializados. Uma forma de reduzir a contaminação dos alimentos por micotoxinas é através do uso do ozônio (O<sub>3</sub>) no processamento do alimento. Devido ao alto potencial oxidante do O<sub>3</sub>, esse pode degradar as moléculas das micotoxinas, tendo como consequência a eliminação ou redução de seus efeitos tóxicos. Essa pesquisa teve como objetivos principais avaliar os efeitos de diferentes condições de ozonização na i) redução de micotoxinas (desoxinivalenol e aflatoxinas) em grãos de trigo; ii) redução nos níveis de fungos filamentosos; iii) influência nos parâmetros químicos, perfil de minerais e parâmetros tecnológico dos grãos e da farinha obtida após o processamento e; iv) influência nas características sensoriais da farinha elaborada a partir dos grãos ozonizados. Em uma segunda etapa do projeto, um método para determinação de uma forma modificada do desoxinivalenol (DON), o desoxinivalenol-3-glicosídeo (D3G) foi otimizada e validada intralaboratorialmente, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os resultados obtidos dos ensaios de ozonização demonstraram que o O<sub>3</sub>, nas condições experimentais utilizadas, reduziu a contagem de fungos totais em cerca 3,0 logs UFC/g de grãos e a contaminação por desoxinivalenol e aflatoxinas totais em até 64,3 % e 48,0 %, respectivamente. O processo de ozonização não influenciou de modo negativo a qualidade química, tecnológica e sensorial dos grãos de trigo, podendo ser utilizado como um excelente método para remediação da contaminação dos grãos por fungos e micotoxinas. Resultados adequados também foram obtidos na validação do método de determinação de D3G por CLAE-DAD, demonstrando que o método é confiável para a determinação dessa forma mascarada do DON em grãos e trigo e, pode ser utilizado como um método alternativo a espectrometria de massas para tal análise.

**Palavras chave:** Ozônio. Contaminação de alimentos. Aflatoxinas. Micotoxina modificada. D3G. Desoxinivalenol-3-glicosídeo.

## ABSTRACT

TROMBETE, Felipe Machado. **Mycotoxins in wheat grains: Occurrence, effects of ozonation and determination of a modified form of deoxynivalenol.** 2016. 101p. Thesis (Doctoral Program in Food Science and Technology) – Institute of Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

Mycotoxins are natural contaminants produced by filamentous fungi and they are widely present in food. In wheat grains, the presence of trichothecenes produced by *Fusarium spp.* and also aflatoxins, produced by *Aspergillus spp.* are a serious public health problem because they are toxic metabolites to man and animals that remain stable during the industrial processes to which wheat is subjected when manufacturing derived products. One way to reduce such contaminants is to use ozone (O<sub>3</sub>) in food processing. Due to its high potential as an oxidant, O<sub>3</sub> may react with mycotoxins and reduce their toxicity due to molecular degradation. This research aimed to evaluate the effects of different conditions of ozonation on the i) reduction in mycotoxins levels (deoxynivalenol and total aflatoxins); ii) reduction in total fungal count; iii) the effects on chemical, mineral and technological profiles and; iv) the possible differences sensorial profile of the flour obtained from the ozonized grains. In a second phase of this project, a methodology for determination of D3G (deoxynivalenol-3-glucoside), a masked form of DON, using High Performance Liquid Chromatography with photodiode array detector (HPLC-PDA) was optimized and in-house validated. Results obtained from ozonation study showed that O<sub>3</sub> reduced total fungal count in approximately 3.0 cycles log CFU/g of wheat grain and deoxynivalenol and total aflatoxins contamination up to 64.3% and 48.0%, respectively. The gaseous ozonation can be applied without negatively changing the chemical, technological and sensory characteristics of the grains and can be considered an excellent method for remediation of fungal and mycotoxin contaminations. Also, the method optimized and in-house validated for determination of D3G by HPLC-PDA showed adequate results and, it could be considered an alternative to mass spectrometry determination of D3G in wheat grains.

**Key words:** Ozone. Food contamination. Aflatoxins. Modified mycotoxin. D3G. Deoxynivalenol-3-glucoside.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estruturas moleculares das aflatoxinas e tricotecenos.....	08
<b>Figura 2</b> – Cromatogramas obtidos por CLAE-DF.....	22
<b>Figura 3</b> – Efeito de diferentes combinações de emissão e excitação do detector de fluorescência na sensibilidade das aflatoxinas.....	23
<b>Figura 4</b> – Curvas analíticas obtidas por padronização externa das aflatoxinas.....	23
<b>Figura 5</b> – Ocorrência de aflatoxinas B <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> em amostras positivas.....	30
<b>Figura 6</b> – Estrutura molecular das principais micotoxinas encontradas nos alimentos.....	38
<b>Figura 7</b> – Representação do sistema de ozonização utilizado no estudo.....	51
<b>Figura 8</b> – Reduções dos níveis de aflatoxinas e DON após ozonização.....	54
<b>Figura 9</b> – Diagrama de Pareto para as variáveis A: DON (% de redução) B: Aflatoxinas totais (% de redução).....	55
<b>Figura 10</b> – Gráfico de médias para as reduções nos níveis de DON e aflatoxinas totais após exposição ao O <sub>3</sub> .....	56
<b>Figura 11</b> – Contagem de fungos totais em amostras de grãos de trigo após ozonização em diferentes condições.....	56
<b>Figura 12</b> – Gráfico de médias para a redução de fungos totais em amostras contaminadas com conídios de <i>Fusarium spp.</i> e <i>Aspergillus spp.</i> , após ozonização.....	57
<b>Figura 13</b> – Diagrama de Pareto para o valor de P (tenacidade) da farinha de trigo obtido a partir dos grãos ozonizados.....	65
<b>Figura 14</b> – Gráfico de médias para a variável número de quedas da farinha de trigo obtida a partir dos grãos ozonizados.....	67
<b>Figura 15</b> – Avaliação sensorial de aroma e aparência geral da farinha de trigo obtida a partir dos grãos ozonizados e da amostra controle.....	68
<b>Figura 16</b> – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em amostras de grãos de trigo.....	77
<b>Figura 17</b> – Efeitos do comprimento de onda do detector (nm) no valor de área (%) dos picos de DON, D3G e NIV.....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Limites máximos estabelecidos por diferentes países para presença de aflatoxinas totais e desoxinivalenol em grãos de trigo para consumo humano.....	08
<b>Tabela 2</b> – Soluções de extração utilizadas para determinação de aflatoxinas e tricotecenos em trigo e produtos derivados.....	09
<b>Tabela 3</b> – Composição de diferentes fases móveis utilizadas em detecção de aflatoxinas e DON através de CLAE com coluna C <sub>18</sub> e detecção por fluorescência ou ultravioleta....	10
<b>Tabela 4</b> – Ocorrência de tricotecenos e aflatoxinas em trigo e produtos derivados.....	12
<b>Tabela 5</b> – Média dos ensaios de recuperação e Desvio Padrão de amostras de grãos de trigo fortificadas com 5 e 10 µg/Kg de cada uma das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	21
<b>Tabela 6</b> – Média dos ensaios de recuperação e Desvio Padrão de amostras de grãos de trigo e derivados adicionadas com 5 e 10 µg/Kg de cada aflatoxina.....	22
<b>Tabela 7</b> – Faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação e limites de detecção e quantificação de metodologia para quantificação de aflatoxinas.....	23
<b>Tabela 8</b> – Níveis de aflatoxinas totais em amostras de grãos de trigo, farinhas e farelo, comercializadas no Rio de Janeiro.....	24
<b>Tabela 9</b> – Níveis de aflatoxinas totais em amostras de grãos de trigo, farinhas e farelo, comercializadas no Rio de Janeiro.....	30
<b>Tabela 10</b> – Resumo das condições experimentais utilizadas em algumas pesquisas para descontaminação de micotoxinas através da ozonização.....	40
<b>Tabela 11</b> – Resumo das condições experimentais utilizadas em estudos para degradação de resíduos de pesticidas em alimentos.....	42
<b>Tabela 12</b> – Matriz do planejamento fatorial completo com as variáveis reais e codificadas.....	52
<b>Tabela 13</b> – Percentagem de recuperação de NIV, D3G e DON pela coluna IA.....	78
<b>Tabela 14</b> – Recuperações e CV % de amostras de grãos de trigo adicionadas de micotoxinas, em diferentes níveis.....	78
<b>Tabela 15</b> – Curva analítica, equação e valor do R <sup>2</sup> para NIV, D3G e DON.....	79
<b>Tabela 16</b> – Ocorrência natural de NIV, D3G e DON em amostras de grãos de trigo integral, comercializadas em Braga, Portugal.....	80

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>15ADON</b>	15-acetildesoxinivalenol
<b>3ADON</b>	3-acetildesoxinivalenol
<b>AACC</b>	American Association of Cereal Chemists
<b>ACGIH</b>	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
<b>AF</b>	Aflatoxin
<b>ALARA</b>	As low as reasonably achievable
<b>ANAVA</b>	Análise de variância
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>APHA</b>	American Public Health Association
<b>Aw</b>	Water activity
<b>BPA</b>	Boas práticas agrícolas
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CE</b>	Comissão Europeia
<b>CFT</b>	Contagem de fungos totais
<b>CFU</b>	Colony-forming unit
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CLUE</b>	Cromatografia líquida de ultra eficiência
<b>D3G</b>	Deoxynivalenol-3-glucoside
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de diodos
<b>DF</b>	Detector de fluorescência
<b>DON</b>	Deoxynivalenol
<b>DRBC</b>	Dichloran rose bengal chloramphenicol
<b>EC</b>	European Commission
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EM</b>	Espectrometria de massas
<b>EMAN</b>	European Mycotoxins Awareness Network
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FDA</b>	US Food and Drug Administration
<b>FSA</b>	Food Safety Authority
<b>GRAS</b>	Generally recognized as safe
<b>HILIC</b>	Hydrophilic interaction chromatography
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>IAL</b>	Istituto Adolfo Lutz
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>ICP</b>	Inductively coupled plasma
<b>IDA</b>	Ingestão diária aceitável
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LMP</b>	Limite máximo permitido
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MEA</b>	Malt extract agar
<b>meOH</b>	Metanol
<b>NIV</b>	Nivalenol
<b>OES</b>	Optical emission spectrometry
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde

<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar
<b>PDA</b>	Photodiode Array
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene fluoride
<b>QuEChERS</b>	Quick easy cheap effective rugged safe
<b>RASFF</b>	Rapid alert system for food and feed
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>TCT</b>	Tricotecenos
<b>TFC</b>	Total fungal count
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônias
<b>UFLA</b>	Universidade Federal de Lavras
<b>UHPLC</b>	Ultra-high performance liquid chromatography
<b>US EPA</b>	US Environmental Protection Agency
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WCBBC</b>	Workers' Compensation Board of British Columbia
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>ZEA</b>	Zearalenona

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>01</b>
<b>CAPÍTULO I - AFLATOXINAS E TRICOTECENOS EM TRIGO E DERIVADOS: OCORRÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO E MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO</b>	
<b>Resumo</b> .....	<b>04</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>05</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>06</b>
<b>2. Limites máximos permitidos para a presença de AFs e TCTs em trigo e derivados</b> .....	<b>07</b>
<b>3. Métodos para determinação de AFs e TCTs em alimentos</b> .....	<b>08</b>
<b>3.1. Extração</b> .....	<b>08</b>
<b>3.2. Separação e Quantificação</b> .....	<b>10</b>
<b>4. Ocorrência de AFs e TCTs em trigo e derivados</b> .....	<b>11</b>
<b>5. Considerações finais</b> .....	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO II - VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub> EM GRÃOS DE TRIGO E DERIVADOS</b>	
<b>Resumo</b> .....	<b>15</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>16</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>17</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1. Padrões, solventes e reagentes</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2. Métodos de extração e quantificação</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.1. Método 1</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.2. Método 2</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.3. Método 3</b> .....	<b>19</b>
<b>Condições cromatográficas</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3. Parâmetros de validação</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1. Metodologia de determinação e otimização das condições analíticas</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2. Determinação de aflatoxinas em amostras comerciais</b> .....	<b>24</b>
<b>4. Conclusões</b> .....	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO E DERIVADOS DESTINADO AO CONSUMO HUMANO, COMERCIALIZADOS NO RIO DE JANEIRO-RJ</b>	
<b>Resumo</b> .....	<b>26</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>27</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>28</b>
<b>2. Material e métodos</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1. Amostragem</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2. Reagentes e solventes</b> .....	<b>29</b>

2.3. Preparo das soluções padrão .....	29
2.4. Determinação das aflatoxinas .....	29
2.5. Análises por CLAE-DF .....	29
2.6. Análise estatística .....	29
3. Resultados e Discussão .....	29
4. Conclusão .....	31

#### CAPÍTULO IV - OZÔNIO CONTRA MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS: APLICAÇÕES ATUAIS E PERPECTIVAS

Resumo .....	33
Abstract .....	34
1. Introdução .....	35
2. Produção industrial do O <sub>3</sub> e legislação para uso no processamento de alimentos .....	36
3. Micotoxinas em alimentos e uso do O <sub>3</sub> na redução da contaminação .....	37
4. Aplicações do O <sub>3</sub> na redução de resíduos de agrotóxicos em alimentos .....	41
5. Alterações na qualidade dos alimentos devido a ozonização .....	42
6. Perspectivas da ozonização aplicada no processamento de alimentos .....	44
7. Conclusão .....	45

#### CAPÍTULO V - EFICÁCIA DA OZONIZAÇÃO NA REDUÇÃO DE MICOTOXINAS E FUNGOS EM GRÃOS DE TRIGO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS

Resumo .....	47
Abstract .....	48
1. Introdução .....	49
2. Materiais e Métodos .....	50
2.1. Amostragem .....	50
2.2. Reagentes e solventes .....	50
2.3. Contaminação artificial das amostras .....	50
2.3.1. Contaminação com micotoxinas .....	50
2.3.2. Contaminação com fungos .....	50
2.4. Produção do O <sub>3</sub> e aplicação nos silos experimentais .....	51
2.5. Planejamento experimental .....	51
2.6. Efeitos da ozonização nos níveis de micotoxinas .....	52
2.6.1. Determinação de DON .....	52
2.6.2. Determinação de aflatoxinas .....	53
2.7. Efeitos da ozonização na CFT .....	53
2.8. Teor de umidade e Atividade de Água (Aw) .....	53
2.9. Análise estatística .....	54
3. Resultados .....	54
3.1. Efeitos da ozonização nos níveis de micotoxinas .....	54
3.2. Efeitos da ozonização na redução fúngica .....	55
3.3. Efeitos da ozonização no teor de umidade e Aw .....	57
4. Discussão .....	57
5. Conclusão .....	58

**CAPÍTULO VI - EFEITOS DA OZONIZAÇÃO NAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS, QUÍMICAS E SENSORIAIS DE GRÃOS DE TRIGO (*Triticum aestivum*)**

<b>Resumo</b> .....	<b>60</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>61</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>62</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>63</b>
<b>2.1. Amostragem</b> .....	<b>63</b>
<b>2.2. Sistema de ozonização</b> .....	<b>63</b>
<b>2.3. Planejamento experimental</b> .....	<b>63</b>
<b>2.4. Moagem dos grãos</b> .....	<b>63</b>
<b>2.5. Efeitos da ozonização na qualidade tecnológica da farinha de trigo</b> .....	<b>63</b>
<b>2.6. Efeitos da ozonização nas propriedades químicas</b> .....	<b>64</b>
<b>2.7. Efeitos da ozonização na composição mineral</b> .....	<b>64</b>
<b>2.8. Análises sensoriais e colorimétricas</b> .....	<b>64</b>
<b>2.9. Análise estatística</b> .....	<b>65</b>
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>65</b>
<b>3.1. Efeitos da ozonização dos grãos nas propriedades tecnológicas da farinha</b> .....	<b>65</b>
<b>3.2. Efeitos da ozonização na composição química e mineral</b> .....	<b>67</b>
<b>3.3. Resultados da avaliação sensorial e colorimétrica</b> .....	<b>68</b>
<b>4. Conclusão</b> .....	<b>69</b>

**CAPÍTULO VII - DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DESOXYNIVALENOL, DESOXINIVALENOL-3-GLICOSÍDEO E NIVALENOL EM GRÃOS DE TRIGO POR CLAE-DAD COM PURIFICAÇÃO POR COLUNA DE IMUNOAFINIDADE**

<b>Resumo</b> .....	<b>71</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>72</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>73</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>74</b>
<b>2.1. Reagentes e padrões</b> .....	<b>74</b>
<b>2.2. Extração e purificação das amostras</b> .....	<b>74</b>
<b>2.3. Análises por CLAE-DAD</b> .....	<b>75</b>
<b>2.4. Validação do método</b> .....	<b>75</b>
2.4.1. Retenção das micotoxinas pela coluna IA.....	75
2.4.2. Recuperação das micotoxinas nas amostras de grãos.....	75
2.4.3. Curvas analíticas, Limites de Detecção e Limites de Quantificação.....	75
2.4.4. Otimização cromatográfica.....	76
<b>2.5. Determinação de micotoxinas em amostras comerciais de trigo</b> .....	<b>76</b>
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>76</b>
<b>3.1. Otimização e validação do método</b> .....	<b>76</b>
<b>3.2. Ocorrência das micotoxinas em amostras comerciais</b> .....	<b>79</b>
<b>4. Conclusões</b> .....	<b>80</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>82</b>

<b>DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>100</b>
<b>Artigos completos em periódicos</b> .....	<b>100</b>
<b>Resumos apresentados em congressos, seminários e encontros</b> .....	<b>100</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo e apresenta grande importância na alimentação humana, contribuindo principalmente como fonte de energia e fibras. Essas características nutricionais, associadas às condições inadequadas de cultivo, colheita ou armazenamento, podem constituir um substrato ideal para o desenvolvimento de fungos.

A presença de fungos filamentosos, ainda no campo, está diretamente relacionada com importantes doenças do cultivo do trigo que, além de causarem perdas nutricionais do alimento, promovem déficit na produção pelos defeitos quantitativos e qualitativos nos grãos.

Além do problema da deterioração do alimento causada pela contaminação microbiológica, algumas espécies de fungos filamentosos, tais como *Aspergillus spp.* e *Fusarium spp.* podem promover a formação de toxinas no alimento, denominadas micotoxinas, as quais são consideradas problema de saúde pública em todo o mundo devido aos efeitos tóxicos que causam aos animais e seres humanos.

Dentre estas toxinas fúngicas, as aflatoxinas (AFLs) possuem relevância devido ao alto potencial carcinogênico que apresentam, enquanto o desoxinivalenol (DON), pertencente ao grupo dos tricotecenos, se destaca devido a alta ocorrência no trigo. O DON pode apresentar-se ainda nos alimentos conjugado com uma molécula de glicose, formando o composto desoxinivalenol-3-glucósido (D3G), o qual é classificado como uma micotoxina modificada, uma vez que não é detectado pelos métodos tradicionais de análise mas contribui como fator de risco para saúde humana e animal.

No Brasil, tais micotoxinas estão amplamente distribuídas nos alimentos de grande consumo no país, já que, são moléculas parcialmente estáveis aos processamentos nos quais os grãos e outros alimentos são submetidos para a fabricação de produtos derivados.

No ano de 2011, numa tentativa de harmonização com algumas regulamentações internacionais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA estabeleceu limites máximos para a presença de diversas micotoxinas até então não legisladas no país, já que a legislação anterior contemplava somente as aflatoxinas e em matrizes limitadas. Para algumas micotoxinas, como o DON, tais limites foram gradativamente reduzidos até o ano de 2016.

A melhor forma de evitar tal contaminação dos alimentos por micotoxinas é a prevenção do desenvolvimento fúngico nos alimentos, através da colheita na época adequada e armazenamento com baixa umidade do grão, em condições ventiladas e secas. No entanto, a execução de tais medidas pode ser de difícil implementação em algumas regiões de países de clima úmido e quente, tal como o Brasil.

Uma vez que o grão pode apresentar contaminação por micotoxinas, alguns métodos de descontaminação podem ser aplicados objetivando a degradação dessas substâncias. Métodos alternativos como o controle biológico e microbiológico, radiação ionizante, micro-ondas e ozonização, capazes de destruir ou remover a toxina em níveis aceitáveis, têm sido foco de diversas pesquisas. Tais metodologias, embora sejam consideradas promissoras, ainda necessitam de estudos para aplicação em larga escala, principalmente referentes à eficácia, custos empregados e alterações das características químicas, nutricionais e tecnológicas dos alimentos processados.

A ozonização, aplicação do gás ozônio (O<sub>3</sub>) nos alimentos, é um método que tem apresentado interessantes resultados para redução dos níveis de micotoxinas e como agente bactericida e fungicida na descontaminação de superfícies, ambientes fechados, conservação e processamento de alimentos. Tais aplicações devem-se a alta capacidade oxidante do O<sub>3</sub> que não deixa resíduos no alimento após sua aplicação, uma vez que o oxigênio é o produto final de sua decomposição.

Os efeitos diretos da ozonização na redução dos níveis de diferentes micotoxinas têm sido relatados na literatura científica, sendo encontrados importantes resultados que qualificam o O<sub>3</sub> como potente agente de degradação das toxinas fúngicas. No entanto, a ozonização de alimentos visando melhoria da qualidade também pode causar efeitos indesejáveis. Em alguns casos pode influenciar nas propriedades tecnológicas do alimento e promover degradação oxidativa dos constituintes químicos, ocasionando perda de cor, desenvolvimento de aromas e sabores indesejáveis e descaracterização da qualidade nutricional e sensorial do produto.

Tendo em vista que a ozonização pode ser uma alternativa para o controle e melhoria da qualidade do trigo, são necessários trabalhos que objetivem avaliar os efeitos desse processo também nas características químicas e tecnológicas dos grãos e da farinha, permitindo estabelecer condições do processo que não promovam alterações na qualidade do alimento.

Desta forma, esse trabalho tem como objetivo principal avaliar diferentes condições de ozonização de grãos de trigo na redução de micotoxinas e contagem de fungos, bem como avaliar a influência do processo na qualidade química, tecnológica e sensorial dos grãos ozonizados. Em uma segunda etapa da pesquisa, um método para determinação da micotoxina D3G em grãos de trigo foi otimizado e validado intralaboratorialmente, através de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta.

Essa tese foi estruturada em 7 capítulos, organizados da seguinte forma: No Capítulo 1 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a ocorrência de tricotecenos e aflatoxinas em trigo e derivados. No Capítulo 2 são apresentados os resultados da validação de um método para determinação de aflatoxinas em grãos de trigo e derivados. No Capítulo 3 são apresentados os resultados de uma pesquisa de aflatoxinas em amostras de grãos de trigo e derivados comercializados no Rio de Janeiro, RJ. No Capítulo 4 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a aplicação do O<sub>3</sub> para redução dos níveis de resíduos e contaminantes em alimentos. No Capítulo 5 são apresentados os resultados da ozonização de grãos de trigo nos níveis de micotoxinas e fungos. No Capítulo 6 são apresentados os resultados dos efeitos do processo de ozonização nas características químicas, tecnológicas e sensoriais de grãos de trigo. No Capítulo 7 são apresentados os resultados da validação intralaboratorial de uma metodologia para determinação da micotoxina D3G em grãos de trigo.

## **CAPÍTULO I**

### **AFLATOXINAS E TRICOTECENOS EM TRIGO E DERIVADOS: OCORRÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO E MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO**

## **Resumo**

Os tricotecenos e as aflatoxinas são contaminantes naturais produzidos por fungos filamentosos que podem ocorrer em alta frequência no trigo e derivados. A presença dessas micotoxinas nos grãos de trigo é um problema importante de saúde pública por serem moléculas tóxicas e muito estáveis aos processos de industrialização nos quais os grãos são submetidos para a obtenção de derivados. O objetivo dessa revisão foi abordar os principais temas relacionados com a ocorrência e os métodos de determinação de tricotecenos (desoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2 e HT-2) e aflatoxinas em trigo e derivados. Nos últimos anos ocorreu um aumento de trabalhos publicados em periódicos internacionais sobre o tema e em muitos estudos foram relatados níveis de contaminações superiores aos limites máximos permitidos. A presença de aflatoxinas e tricotecenos têm sido associadas com ocorrência simultânea de outras micotoxinas no trigo. A melhor forma de reduzir a contaminação do trigo por essas micotoxinas continua sendo a adoção de boas práticas agrícolas durante o cultivo, colheita e armazenamento dos grãos, uma vez que, mesmo existindo métodos experimentais para degradação, esses ainda não são aplicados em escala industrial.

**Palavras-chave:** Micotoxinas. DON. CLAE. *Fusarium spp.* *Aspergillus spp.*

## **Abstract**

Trichothecenes and aflatoxins are natural contaminants produced by filamentous fungi and they are widely present in wheat. The presence of these mycotoxins are a serious public health problem because they are toxic metabolites that remain stable during the industrial processes to which wheat is subjected when manufacturing derived products. The aim of this review was to address the main topics related with the occurrence and quantification methods commonly used for determination of trichothecens (deoxynivalenol, nivalenol, T2-toxin and HT-2 toxin) and aflatoxins in wheat and wheat products. In the last years, there was an increase in the number of papers published in international journals containing these subjects and many studies reported levels above the maximum allowable limits. The presence of aflatoxins and trichothecenes have also been associated with the simultaneous occurrence of other mycotoxins. The best way to reduce aflatoxin and trichothecene contamination in wheat and wheat products is still the application of good agricultural practices for growing, harvesting and storage of grains, because although there are methods for degradation, these are not yet implemented on an industrial scale.

**Key words:** Mycotoxins. DON. HPLC. *Fusarium spp.* *Aspergillus spp.*

## 1. Introdução

Micotoxinas são definidas, em geral, como metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular, produzidas por várias espécies de fungos filamentosos em substratos onde estão se desenvolvendo, quando em condições ideais de umidade e temperatura (EFSA, 2012). São consideradas contaminantes naturais de grande importância nos alimentos, devido à alta ocorrência em produtos de origem vegetal como em cereais e especiarias, mas também, em produtos de origem cárnea e laticínios (RASFF, 2012).

A contaminação por micotoxinas pode ocorrer tanto na fase agrícola como durante o armazenamento e processamento dos alimentos, representando um problema de saúde pública devido à alta toxicidade destas substâncias para saúde humana e animal e, também, por serem moléculas altamente estáveis aos processos industriais nos quais os alimentos são submetidos durante o processamento (EFSA, 2012; KABAK, 2009). Mais de 300 micotoxinas são conhecidas, entretanto, cerca de 30 são consideradas de maior importância devido à alta toxicidade e ampla ocorrência nos alimentos (EFSA, 2009).

Nos cereais, a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* estão diretamente relacionadas com a contaminação dos alimentos por micotoxinas, além de causarem importantes danos fitossanitários (AYDIN *et al.*, 2008; ZAIED *et al.*, 2012). As principais micotoxinas produzidas por diferentes espécies de fungos e de grande ocorrência nos cereais são os tricotecenos (principalmente desoxinivalenol - DON, nivalenol - NIV, toxina T-2 e HT-2), zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), fumonisinas e aflatoxinas do grupo B e G (FSA, 2007; JUAN *et al.*, 2012; PLEADIN *et al.*, 2012; ROOHI *et al.*, 2012).

No trigo e em outros cereais de inverno, o fungo *Fusarium graminearum* (fase sexual: *Gibberella zeae*) é considerado um importante patógeno, causador da doença de cultivo denominada *Fusarium* “Head Blight” (ou fusariose) que além de causar perdas na qualidade do grão também pode contaminar o alimento por tricotecenos, ZEA e outras toxinas de *Fusarium* (SON e LEE, 2012; INFANTINO *et al.*, 2012).

Em geral, a ingestão de alimentos contaminados por tricotecenos (TCTs), como o DON, NIV, T-2 e HT-2, provoca nos animais a inibição de síntese proteica, danos celulares e consequente imunossupressão, inibição de apetite, vômitos, diarreia, dermatites e hemorragias, com sintomas similares em humanos (EC, 2002; MINERVINI *et al.*, 2004).

No grupo dos TCTs, DON é a micotoxina mais frequente na dieta humana (EC, 2002; WARTHA *et al.*, 2012). A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) não classifica os TCTs como cancerígenos para os humanos (IARC, 2002), no entanto, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), a presença de DON é um problema de saúde pública e os sintomas da intoxicação aguda, tais como vômitos, podem ser confundidos com a intoxicação causada por *Bacillus cereus* (WHO, 2002).

Em países de temperaturas mais elevadas, a contaminação por aflatoxinas (AFs) produzidas por *Aspergillus* (principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*) também tem sido frequentemente identificada em altos níveis no trigo e alimentos derivados (AYDIN *et al.*, 2008; GHALI *et al.*, 2008; JOUBRANE *et al.*, 2011). As aflatoxinas são consideradas os agentes carcinogênicos naturais de maior potencial tóxico para o homem, sendo reconhecidas pela IARC como agentes hepatotóxicos e cancerígenos para humanos, capaz de induzir câncer de fígado, cirrose hepática e reduzir a resistência imune (IARC, 2002).

Em 2011, o relatório apresentado pela Comissão Europeia (CE) através do sistema RASFF (“Rapid Alert System for Food and Feed”) teve 585 casos de alimentos contaminados com aflatoxinas e 11 notificações para DON. Deste total, 24 estavam relacionados com farinha de trigo e outros produtos de panificação (RASFF, 2012).

A contaminação por TCTs e aflatoxinas em trigo é considerada uma preocupação constante em muitos países devido à alta ocorrência e aos altos índices encontrados tanto na

matéria prima quanto nos produtos derivados. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura abordando as questões principais relacionadas com a ocorrência e os métodos de determinação dos tricotecenos (DON, NIV, T-2 e HT-2) e aflatoxinas no trigo e derivados, através de estudos publicados em periódicos internacionais nos últimos anos.

## **2. Limites máximos permitidos para a presença de AFs e TCTs em trigo e derivados**

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação – FAO (2004) estabelecer normas para micotoxinas é uma atividade complexa que envolve muitos fatores. Estes incluem informações sobre os efeitos na saúde humana e animal, níveis de exposição humana, fatores comerciais e também a disponibilidade de métodos eficazes de análise. Em relação a contaminação por micotoxinas em trigo e seus derivados, a presença dessas substâncias deve seguir o princípio ALARA (“As Low As Reasonably Achievable”), presentes em níveis tão baixos quanto razoavelmente possível (EFSA, 2012).

Os limites relacionados às aflatoxinas se referem geralmente a presença de aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e/ou às aflatoxinas totais, sendo esta última a somatória dos índices de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. O valor máximo aceitável nos países que estipulam limites para níveis de aflatoxinas em trigo, geralmente correspondem a 5 µg/Kg. O valor mais alto é estabelecido pela Índia, correspondendo a 30 µg/Kg (ÍNDIA, 2011).

Em relação aos TCTs, os limites normativos são direcionados para a presença de DON, NIV e toxina HT-2. Até o momento, apenas a Rússia estipula níveis máximos para a toxina T-2. De acordo com a Comissão Europeia (CE) a legislação para presença de DON é suficiente para proteger os consumidores da exposição a outras toxinas de *Fusarium spp.*, dada a ocorrência simultânea destas substâncias (EC, 2002).

O nível máximo aceitável para a presença de DON varia de 750 µg/Kg na União Europeia (UE) (EC, 2002), até 2000 µg/Kg no Canadá e Brasil (CANADÁ, 2012; BRASIL, 2011). De forma geral, os limites mais restritos são estabelecidos na UE, o qual se aplica aos 27 estados membros. No entanto, mesmo entre os países pertencentes a UE existe uma discrepância nos valores máximos para micotoxinas. Na Espanha, o limite máximo para aflatoxinas em que alimento é de 10 µg/Kg e na Áustria este valor corresponde a 1 µg/Kg (EC, 2006; EMAN, 2012).

Na Tabela 1 estão resumidos os limites máximos para a presença de aflatoxinas e DON em grãos de trigo, estipulados por diferentes países. Cabe ressaltar que, em alguns países, como os EUA, Canadá e os pertencentes a UE também são estabelecidos limites específicos e mais rigorosos para produtos destinados ao consumo por bebês e crianças.

Como pode ser observado na Tabela 1, os níveis para a presença dessas micotoxinas se encontram em partes por bilhão (µg/Kg). Desta forma, para avaliar a ocorrência em alimentos são necessárias metodologias de determinação que sejam precisas, exatas, sensíveis e ao mesmo tempo, rápidas e confiáveis.

Tabela 1 - Limites máximos estabelecidos por diferentes países para presença de aflatoxinas totais e desoxinivalenol em grãos de trigo para consumo humano

Micotoxina	País	Máximo aceitável	Fonte
Aflatoxinas totais (Soma de AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> )	União Europeia	4	EC (2010)
	Turquia	4	Turkish (2002)
	Chile	5	Chile (2007)
	Brasil	5	Brasil (2011)
	Índia	30	EMAN (2012)
Desoxinivalenol	Rússia	700	EMAN (2012)
	União Europeia	750	EC (2006))
	EUA	1000	FDA (2010)
	China	1000	China (2011)
	Japão	1100	EMAN (2012)
	Canadá	2000	Canadá (2012)
	Brasil	2000	Brasil (2011)

### 3. Métodos para determinação de AFs e TCTs em alimentos

#### 3.1. Extração

AFs e TCTs são moléculas solúveis em solventes polares como o metanol, acetonitrila e água. Desta forma, esses são os mais empregados para a extração em grãos e derivados de trigo. Na Figura 1 estão demonstradas as estruturas moleculares dos principais TCTs e AFs. As proporções dos solventes utilizados nas soluções de extração destas micotoxinas são variáveis de acordo com o tipo de amostra. Desta forma, os autores otimizam a composição da solução de acordo com os melhores resultados de recuperação obtidos. Na Tabela 2 estão detalhadas as diferentes composições das soluções de extração utilizadas na determinação AFs e DON em trigo e derivados.

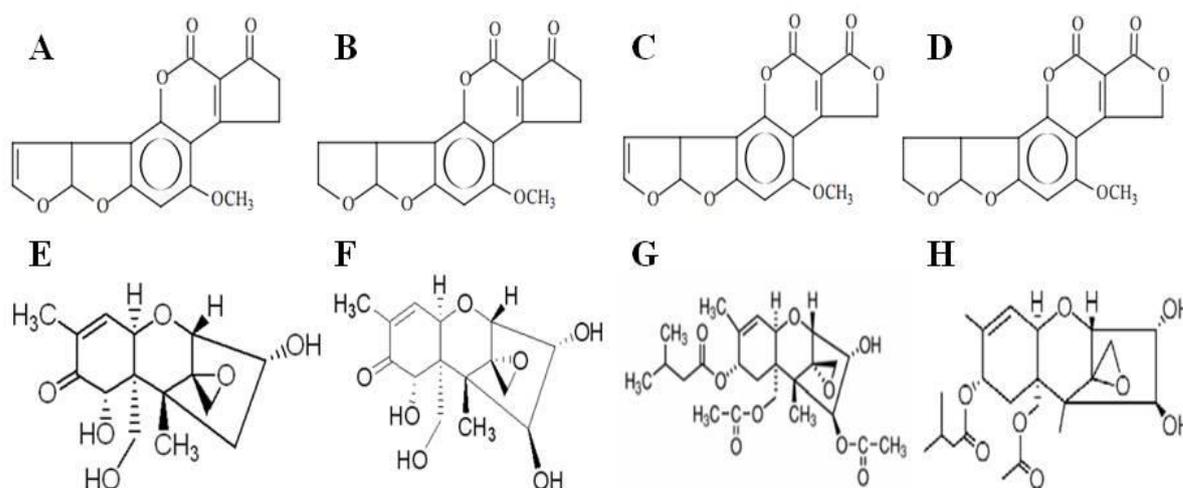


Figura 1 - Estruturas moleculares das aflatoxinas e tricotecenos. A - Aflatoxina B<sub>1</sub>; B - Aflatoxina B<sub>2</sub>; C - Aflatoxina G<sub>1</sub>; D - Aflatoxina G<sub>2</sub>- E - Desoxinivalenol; F - Nivalenol; G - Toxina T-2; H - Toxina HT-2. Fonte: Adaptado de European Comission (EC, 2011).

Tabela 2 - Soluções de extração utilizadas para determinação de aflatoxinas e tricotecenos em trigo e produtos derivados

Micotoxina	Matriz	Solvente de extração	Proporção	Fonte*	
Aflatoxinas	Grãos, farinha e derivados	metanol: água	80: 20	1, 2, 3, 4	
			70: 30	5	
			50: 50	6	
	Grãos	acetona: água	84: 16	7	
			acetona: água (pH 1,5)	70: 30	8
			acetonitrila: sol. NaCl 4% a pH 1,5	90: 10	9 10
Desoxinivalenol	Grãos e farinha	água + polietilenoglicol	20: 1	1, 11	
	Grãos	metanol: água	50: 50	6	
		água	1	12	
	Grãos e farinha integral	acetonitrila: água	84: 16	13, 14	
			70: 30	15	
T-2 e HT-2	Grãos	metanol: água + NaCl	90: 10	16	
			70: 30	12	
		metanol: água	70: 20	6	

\*1- Abdulkadar *et al.* (2004); 2- Campone *et al.* (2011); 3- Gallo *et al.* (2008); 4- Giray *et al.* (2007) 5- Aydın *et al.* (2008); 6-Muthomi *et al.* (2008); 7- Saleemullah *et al.* (2006); 8- Ibáñez-Vea *et al.* (2011); 9- Joubrane *et al.* (2011); 10- Riba *et al.* (2010); 11- Haidukowski *et al.* (2005); 12- Stankovic *et al.* (2012); 13- Kolmanic *et al.* (2010); 14- Tutelyan (2004); 15- Del Ponte *et al.* (2012); 16- Pascale *et al.* (2012).

De forma geral, em pesquisas com TCTs, é utilizada uma única solução capaz de extrair todas as substâncias de interesse, tais como DON, NIV, T-2 e HT-2. Deste modo, nas determinações denominadas multimicotoxinas são otimizadas as proporções de solventes nas quais em uma única etapa de extração seja possível a solubilização de diversas micotoxinas. Skrbic *et al.* (2012) propuseram o uso de uma solução de acetonitrila: água (84: 16, v/v) para extração de AFs, OTA, ZEA, DON, T 2-, HT-2 e fumonisinas. Sulyok *et al.* (2006), avaliaram uma solução de extração para 39 micotoxinas em trigo e milho utilizando acetonitrila: água: ácido acético (79: 20: 1, v/v/v), obtendo bons resultados analíticos.

Também após o processo de extração, as colunas de imunoafinidade (Immunoaffinity Column - IAC) têm sido amplamente utilizadas para purificação do extrato e concentração das micotoxinas através de anticorpos específicos que interagem com a toxina presente no alimento. Desta forma são eliminados os interferentes presentes na matriz e a análise torna-se mais confiável (SANTOS *et al.*, 2011; ZAIED *et al.*, 2012).

No entanto, de acordo com Ramos *et al.* (2008), a metodologia para quantificação de aflatoxinas que utiliza purificação por IAC tem a desvantagem de ser seis vezes mais cara do que o método onde estas não são empregadas, assim, deve ser avaliada a necessidade ou não do uso deste método após a etapa de extração das micotoxinas.

### 3.2. Separação e quantificação

Para a quantificação de AFs e TCTs em trigo têm sido desenvolvidas, otimizadas e validadas diferentes metodologias. Na maioria dos estudos são utilizadas as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) ou Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

A detecção das aflatoxinas é comumente realizada por detector de fluorescência (DF), já que estas fluorescem quando expostas a luz UV, e, para detecção de TCTs geralmente são utilizados detectores de ultravioleta (UV) ou espectrometria de massas (EM ou EM/EM) (HOPE e MAGAN, 2005; JOUBRANE *et al.*, 2011; DEL PONTE *et al.*, 2012). Para ambos os grupos de micotoxinas, a detecção também pode ser feita diretamente na placa de CCD.

Para Fujii *et al.* (2004), as metodologias por CCD possuem a vantagem de serem simples e de baixo custo, com visualização direta dos perfis cromatográficos baseados na cor, fluorescência e aspecto da corrida. Desta forma, é uma técnica que ainda tem sido utilizada em estudos para determinação de micotoxinas em trigo (ODOEMELAM *et al.*, 2009; SAHAR *et al.*, 2009).

CLAE é a técnica mais utilizada para separação de tais micotoxinas. A coluna que se utiliza com maior frequência é a de fase reversa (C18), e a fase móvel varia muito entre os trabalhos. Na Tabela 3 estão detalhadas as composições de diversas fases móveis utilizadas em estudos de quantificação de AFs e DON através de CLAE-DF ou CLAE-UV.

Tabela 3 – Composição de diferentes fases móveis utilizadas em detecção de aflatoxinas e desoxinivalenol através de CLAE com coluna C<sub>18</sub> e detecção por fluorescência ou ultravioleta

Micotoxina	Fase Móvel	Proporção (volume)	Fonte
Aflatoxinas	água: acetonitrila: ac. acético	99: 99: 2 65: 20: 15 55: 45: 2	Joubrane <i>et al.</i> (2011) Gallo <i>et al.</i> (2008) Atalla <i>et al.</i> (2003)
	água: metanol: acetonitrila	64: 18: 18 62: 22: 16 60: 20: 20	Abdulkadar <i>et al.</i> (2004) Giray <i>et al.</i> (2007) Riba <i>et al.</i> (2010)
DON	água: acetonitrila	96: 2: 2 → 0: 0: 1 93: 7 85: 15	Kolmanic <i>et al.</i> (2010) Del Ponte <i>et al.</i> (2012) Abdulkadar <i>et al.</i> (2003)
	água: metanol	85: 15 → 78: 22 88: 12	Atalla <i>et al.</i> (2003) Hope e Magan (2005)

Outros métodos baseados em reações imunoenzimáticas e detecções rápidas, denominado "ensaio de imunoabsorção enzimática" ou ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), também tem sido utilizado para tal propósito. São métodos econômicos e proporcionam resultados precisos e reprodutíveis, capazes de identificar a presença de micotoxinas em níveis de ppm e ppb, com obtenção de resposta visual baseado em presença/ausência. Desta forma, podem ser utilizados como métodos de quantificação direto ou como procedimento de triagem, devido a facilidade de manipulação (GHALI *et al.*, 2008; LUPU *et al.*, 2010).

Entretanto, os métodos baseados em ELISA possuem a desvantagem de apresentar possíveis resultados falso-positivos e, desta forma, podem requerer uma confirmação adicional do resultado (GARCIA *et al.*, 2003). A CE recomenda a confirmação dos resultados positivos por CLAE-DF (EC, 2002b).

Novas metodologias, tais como a microextração líquido-líquido dispersiva (CAMPONE *et al.*, 2011) e o uso de isótopos estáveis como marcadores (PÉAN *et al.*, 2007; CERVINO *et al.*, 2008) também são uma opção para a determinação de AFs e TCTs em trigo e derivados.

Dentre as metodologias existentes, a seleção dependerá de fatores econômicos, do propósito da análise, da equipe de analistas, entre outros. É fundamental a utilização de métodos confiáveis e, desta forma, a validação constante é essencial nas pesquisas de AFs e TCTs em trigo. Atualmente, o uso de CLAE-UV e CLAE-EM são os métodos mais utilizados e adotados como oficiais pelos países produtores ou importadores de trigo e derivados para a quantificação de aflatoxinas e tricotecenos.

#### **4. Ocorrência de AFs e TCTs em trigo e derivados**

Devido à alta ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* em trigo, quando são realizadas a colheita e armazenamento incorreto, com condições de altas temperaturas e umidade, presença de insetos, danos mecânicos aos grãos ou transporte inadequado, é possível observar o aumento dos níveis de contaminação por micotoxinas nos grãos e conseqüentemente nos produtos derivados (JUAN *et al.*, 2012; KACHUEI *et al.*, 2009). Na literatura científica, vários estudos têm sido publicados objetivando quantificar os níveis de contaminação por AFs e TCTs no trigo e seus derivados comercializados em diferentes países. Nesses trabalhos, pode-se observar que tais micotoxinas estão amplamente distribuídas e algumas vezes em níveis superiores aos limites máximos permitidos. Na Tabela 4 estão resumidos alguns desses estudos.

De forma geral, a contaminação por micotoxinas ocorre de forma simultânea e não apenas por um grupo isolado. Ghali *et al.* (2008) e Terken *et al.* (2005) relacionaram a presença de aflatoxinas com a ocorrência de OTA em grãos de trigo e farinhas. Muthomi *et al.* (2008) associaram a presença de DON, T-2 e ZEA em grãos de trigo comercializados no Quênia. Tais relatos são preocupantes, uma vez que não são bem conhecidos os possíveis efeitos sinérgicos associados a ingestão simultânea de diferentes micotoxinas na saúde humana.

Para a redução ou descontaminação de micotoxinas nos produtos destinados ao consumo humano, diferentes métodos baseados em processos físicos, químicos e microbiológicos têm sido desenvolvidos e adaptados. Entre estes, podem ser citados o uso de agentes químicos, biotransformadores, adsorventes, métodos baseados na classificação pela cor, radiação ionizante, ozonização e outros (EFSA, 2009). Entretanto, apesar dos métodos citados serem considerados promissores, o procedimento principal para o controle da contaminação do trigo por micotoxinas continua sendo a adoção das Boas Práticas Agrícolas em toda a cadeia tritícola.

Tabela 4 – Ocorrência de tricotecenos e aflatoxinas em trigo e produtos derivados

País	Micotoxina	Matriz	Técnica*	n	Positivas	Faixa (µg/Kg)	Média (µg/Kg)	Fonte**
BRA	DON	Grãos	CLAE-EM	65	64 (98%)	ND - 1250	540	1
SRB	DON	Grãos	ELISA	10 3	94 (91%)	50-3306	444,18	2
SRB	DON	Farinha	CLUE-EM	15	13 (87%)	17,5-976	325	3
KEN	DON	Grãos	ELISA	82	56 (68%)	105-303	122	4
BRA	DON	Grãos	CLAE-EM	16 4	80 (48%)	ND-8310	290 <sup>AP</sup>	5
BRA	DON	Farelo	CLAE-EM	44 9	217 (48%)	ND-3129	424 <sup>AP</sup>	5
RUS	DON	Grãos	CLAE-DF	21 66	1498 (69%)	50-8600	0,4	6
QAT	DON	Grãos e Farinha	CLAE-UV	10	2 (20%)	148-183	-	7
BRA	NIV	Grãos	CLAE-EM	65	54 (83%)	ND - 781	337	1
SRB	T-2	Grãos	ELISA	10 3	66 (64%)	60-495	129,13	2
KEN	T-2	Grãos	ELISA	80	61 (76%)	20-66	26	4
LBN	AFs	Grãos	CLAE-DF	15 6	119 (76%)	ND-12,2	-	8
ESP	AFs	Grãos	CLUE-DF	14	0	-	-	9
TUR	AFs	Farinha	ELISA	10 0	45 (45%)	0,05-14	0,79	10
TUN	AFs	Grãos	ELISA	51	15 (30%)	4-19,2	6,7	11
TUR	AFs	Grãos	CLAE-DF	41	24 (59%)	0,01 - 0,64		7
KEN	AFB <sub>1</sub>	Grãos	ELISA	41	23 (56%)	0-7	1,9	4

DON - Desoxinivalenol. AFs - Aflatoxinas totais. NIV – Nivalenol. \*CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Resolução. EM - Espectrometria de massas. ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. DF - Detector de fluorescência. UV - Detector de Ultravioleta. n = número de amostras analisadas. AP = Médias de amostras positivas. \*\* 1-Del Ponte *et al.* (2012); 2- Stankovic *et al.* (2012); 3- Skrbic *et al.* (2012); 4-Muthomi *et al.* (2008); 5-Mallmann *et al.* (2008); 6- Tutelyan (2004); 7- Abdulkadar *et al.* (2004); 8- Joubrane *et al.* (2011); 9- Ibáñez-Vea *et al.* (2011); 10-Aydin *et al.* (2008); 11-Ghali *et al.* (2008)

## **5. Considerações finais**

A partir desta revisão, pode ser observado que a incidência de aflatoxinas e tricotecenos em grãos de trigo para consumo humano tem sido objetivo de vários estudos na área micotoxicológica e considerado problema de saúde pública. Os níveis encontrados em muitos trabalhos são superiores aos limites máximos para a presença destas mitoxinas nas legislações específicas de cada país. Para a avaliação e monitoramento desta contaminação são necessários o uso de metodologias analíticas confiáveis. A cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia em camada delgada e kits de detecção rápida baseados em reações imunoenzimáticas são as metodologias mais empregadas. Várias outras técnicas também têm sido otimizadas e validadas para tal propósito. Para a descontaminação das aflatoxinas e tricotecenos em trigo e derivados, procedimentos alternativos, utilizando novas tecnologias, têm sido estudados, no entanto, a adoção das boas práticas agrícolas em toda a cadeia produtiva do trigo continua sendo a melhor maneira de prevenir a contaminação dos grãos.

## **CAPÍTULO II**

### **VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> E G<sub>2</sub> EM GRÃOS DE TRIGO E DERIVADOS**

## Resumo

Aflatoxinas são contaminantes naturais de elevado potencial carcinogênico e têm sido identificadas em trigo e produtos derivados. O uso de métodos analíticos confiáveis para o monitoramento de tais contaminantes em alimentos é de extrema importância. Este trabalho teve como objetivo validar intralaboratorialmente uma metodologia para determinação de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em grãos de trigo através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF). A metodologia mais adequada para tal propósito, dentre três métodos avaliados, baseou-se na extração com clorofórmio, remoção de interferentes por filtração e partição líquido-líquido com metanol-água-hexano, metanol-água-clorofórmio e derivatização pré-coluna com ácido trifluoracético. O método apresentou variação de repetibilidade inferior a 15% e recuperação na faixa de 70 a 110%, com limites de detecção e quantificação inferiores ao nível máximo permitido para a presença de aflatoxinas em trigo. Através da metodologia validada, foram quantificadas aflatoxinas em 20 amostras aleatórias de grãos, farelo de trigo e farinha de trigo integral e refinada destinada ao consumo humano. Seis amostras (30%) foram positivas para aflatoxinas e todas apresentaram-se dentro do limite regulatório permitido pela legislação brasileira, com níveis menores que 5 µg/Kg. Fazem-se necessários mais estudos avaliando a presença de aflatoxinas nestes alimentos, já que são amplamente consumidos pela população brasileira e poucos estudos sobre o tema têm sido publicados em periódicos científicos nos últimos anos.

**Palavras-chave:** *Triticum aestivum*. *Aspergillus spp.* Micotoxinas. Farelo de trigo. Farinha de trigo integral.

## Abstract

Aflatoxins are naturally occurring carcinogenic substances, extremely toxic to humans, which have been identified in wheat and wheat by-products. The use of reliable analytical methods to evaluate and monitor such contaminants is extremely important. This study aimed to in-house validate a methodology to determine aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in wheat grains using pre-column derivatization and quantification by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Three methods were evaluated and the most suitable one was the method based on the extraction with chloroform, removal of interfering chemicals by filtration, liquid-liquid partition with hexane-methanol-water and methanol-water-chloroform and pre-column derivatization with trifluoroacetic acid. The method showed a Relative Standard Deviation lower than 15% and recovery values in the 70-110% range, with limits of detection and quantification (0.6 µg/Kg and 1.2 µg/Kg, respectively) below the maximum level of aflatoxins allowed in wheat and wheat by-products by the European Commission (4.0 µg/Kg) and by the Brazilian legislation (5.0 µg/Kg). Using the validated method, aflatoxins were quantified in 20 commercial samples of wheat grains, wheat bran, whole wheat flour and refined wheat flour intended for direct human consumption. Six samples (30%) were positive for aflatoxins and all samples presented levels below the maximum limit stipulated by the Brazilian legislation

**Key words:** *Triticum aestivum*. *Aspergillus spp.* Mycotoxins. Wheat bran. Whole-wheat flour.

## 1. Introdução

O trigo (*Triticum aestivum*) é um cereal cultivado mundialmente e possui grande importância na dieta humana, contribuindo diretamente como fonte de energia, proteína, vitaminas, minerais e fibras (MCKEOWN *et al.*, 2013; KARL; SALTZMAN, 2012). A maior parte dos grãos de trigo são destinadas para a produção de farinha, a qual é tradicionalmente usada na formulação de pães, massas e bolos. O farelo originado deste processamento possui alto teor de fibras e é um alimento de grande consumo pela população, seja de forma direta ou como ingrediente em alimentos industrializado (EMBRAPA TRIGO, 2013). O consumo regular de fibra de trigo é associado com efeito laxativo, redução do tempo de trânsito intestinal e uma potencial redução no risco do desenvolvimento de câncer de cólon (DALTON *et al.*, 2012).

No entanto, quando não são adotadas as Boas Práticas Agrícolas durante o cultivo e armazenamento dos grãos, fungos filamentosos, tais como *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, podem se desenvolver e produzir metabólitos tóxicos secundários, denominados micotoxinas (GREGORI *et al.*, 2013; MYLONA *et al.*, 2012). O trigo contaminado com micotoxinas representa um problema de saúde pública pela alta toxicidade destas substâncias à saúde humana e animal e, também, devido à alta estabilidade aos processos industriais nos quais o trigo é submetido para a fabricação de produtos derivados (EFSA, 2012).

Em climas tropicais, as aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* têm sido identificadas em altos níveis no trigo e produtos derivados (JOUBRANE *et al.*, 2011; AYDIN *et al.*, 2008; GHALI *et al.*, 2008). As aflatoxinas são substâncias altamente tóxicas para humanos e reconhecidas pela Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer - IARC (2002) como agentes hepatotóxicos e carcinogênicos, capazes de induzir câncer de fígado, cirrose e reduzir imunorresistência, causando surtos de hepatite viral tipo B.

O uso de metodologias analíticas confiáveis é de extrema importância para a avaliação e monitoramento destes contaminantes em alimentos. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e kits rápidos de detecção baseados em reações imunoenzimáticas (ELISA) são as metodologias mais comumente utilizadas. A escolha do método depende de fatores econômicos, do propósito da análise, da equipe de analistas, dentre outros fatores (RAMOS *et al.*, 2008; TROMBETE *et al.*, 2013).

O estudo de determinados parâmetros de validação de um método é importante para demonstrar a confiabilidade deste na obtenção de resultados adequados para a determinação proposta. Se, por exemplo, um método existente for modificado para atender a requisitos específicos, ou um método novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar de que as características de desempenho de tal método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2006). Este trabalho objetivou validar intralaboratorialmente um método para determinação de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em grãos de trigo, farelo de trigo e farinha de trigo integral e refinada utilizando CLAE com detecção por fluorescência e derivatização pré-coluna.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Padrões, solventes e reagentes

Os padrões das aflatoxinas B<sub>1</sub> (5 mg), B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (1 mg) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) e as soluções estoque (50 µg/mL) e de trabalho (2 µg/mL) foram preparadas em metanol grau HPLC, sendo armazenadas a -18 °C. Para confirmação das concentrações das soluções estoque, realizou-se leitura das absorvâncias em

espectrofotômetro Shimadzu UV-1201 (Kyoto, Japan), conforme metodologia preconizada pela AOAC (2005).

Acetonitrila e metanol grau HPLC/UV usados na fase móvel e preparo das soluções padrões foram adquiridos da Tedia (São Paulo, SP, Brasil). Os demais solventes de extração e reagentes foram de grau analítico, obtidos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). A água utilizada foi obtida por sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore). Para filtração das amostras utilizou-se papel filtro Whatman (qualitativo, n° 1) e membrana PVDF 0,45 µm (Durapore<sup>®</sup> 13 mm, Millipore).

## 2.2. Métodos de extração e quantificação

Com o objetivo de estabelecer o método mais adequado para extração das aflatoxinas em grãos de trigo, foram avaliadas três diferentes metodologias, utilizando-se como critério os parâmetros de recuperação e repetitividade.

A metodologia 1 foi otimizada do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), realizando extração com clorofórmio e posterior remoção dos interferentes por filtração, partição líquido-líquido com metanol-água-hexano e metanol-água-clorofórmio, derivatização pré-coluna com ácido trifluoracético e quantificação por CLAE-DF.

A metodologia 2 foi otimizada a partir do método multimicotoxinas proposto por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) através de extração com metanol e KCl, purificação por filtração, precipitação com (NH)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, adição de celite e partição líquido-líquido com metanol-água-hexano e metanol-água-clorofórmio, derivatização pré-coluna com ácido trifluoracético e quantificação por CLAE-DF.

A metodologia 3 foi realizada conforme descrito por Sirhan *et al.* (2011), a qual é baseada no método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), realizando extração com metanol: água: acetonitrila (51: 40: 9, v/v/v), MgSO<sub>4</sub> e NaCl, seguido de centrifugação, filtração e injeção de uma alíquota no sistema CLAE-DF, sem derivatização. Os procedimentos realizados em cada método estão detalhados a seguir.

### 2.2.1. Método 1

Foram pesados 15 g de amostra, previamente triturada, adicionados 5 mL de água a 60 °C e homogeneizado com bastão de vidro. Cinquenta mL de clorofórmio foram adicionados ao Erlenmeyer e então agitado em Shaker (Orbit Shaker 3520) por 30 min. O extrato clorofórmico foi filtrado em papel de filtro e recolhidos 25 mL, sendo então evaporado até *secura* em banho-maria a 65 °C sob fluxo de N<sub>2</sub>. O extrato seco foi ressuscitado com 25 mL de metanol em banho de ultrassom (Thornton T7) por 10s e transferido para funil de separação previamente adicionado de 25 mL de solução aquosa de NaCl 4% (m/v). Foram adicionados 2 x 25 mL de hexano ao funil e agitado vigorosamente por 30s e a fase hexânica (superior) descartada. Posteriormente, adicionou-se ao funil de separação 2 x 25 mL de clorofórmio, agitando vigorosamente por 30s. A fase clorofórmica (inferior) foi recolhida e evaporada em banho-maria a 65 °C com fluxo de N<sub>2</sub> até *secura*. O extrato foi ressuscitado com 600 µL de acetonitrila, submetido a banho de ultrassom por 30s e adicionados 1200 µL da solução derivatizante constituída por água: ácido trifluoracético: ácido acético glacial (7: 2: 1, v/v/v), permanecendo em banho-maria a 65 °C durante 9min, conforme procedimento de derivatização descrito pela AOAC (2005). O extrato foi filtrado em membrana 0,45 µm e injetado no sistema CLAE-DF.

### **2.2.2. Método 2**

Foram pesados em frasco Erlenmeyer 25 g de amostra previamente triturada em moinho de facas e adicionado 15 mL de solução aquosa KCl 4% (m/v), homogeneizando com bastão de vidro. Após, 135 mL de metanol foram adicionados ao frasco e então agitado em Shaker por 30min. O extrato metanólico foi filtrado em papel de filtro e recolhido 75 mL, adicionando-se a este 75 mL de solução aquosa de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30% (m/v), agitando lentamente com bastão de vidro. Após tempo suficiente para precipitação, adicionou-se 25 mL de celite e novamente filtrou-se em papel de filtro, recolhendo 75 mL. O filtrado foi então transferido para o funil de separação e adicionados 2 x 25 mL de hexano, agitando vigorosamente por 30s. A fase hexânica (superior) foi descartada e então adicionados ao balão 2 x 25 mL de clorofórmio, agitando vigorosamente por 30s. A fase clorofórmica (inferior) foi recolhida e evaporada em banho-maria a 65 °C com fluxo de  $\text{N}_2$  até securo. O extrato foi ressuspendido com 600  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, submetido a banho de ultrassom por 30s e derivatizado, conforme descrito anteriormente. O extrato foi filtrado em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  e injetado no sistema CLAE-DF.

### **2.2.3. Método 3**

Foram pesados em tubo de polipropileno (15 mL) 2 g de amostra e adicionados 10 mL da solução de extração, composta por metanol: água: acetonitrila: (51: 40: 9, v/v/v), agitando-se manualmente por 1min. Posteriormente foi adicionado 1,5 g de  $\text{MgSO}_4$  anidro e 0,5 g de NaCl, agitando-se manualmente por mais 1min. O tubo foi submetido à centrifugação por 5min a 4000 rpm e subsequentemente, foram coletados 1 mL do extrato, filtrado em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  e injetado no sistema CLAE-DF.

## **2.3. Condições cromatográficas**

A quantificação das aflatoxinas ocorreu em sistema CLAE composto por um detector de fluorescência Agilent 1100 Series (Waldbronn, Alemanha), injetor Rheodyne (20  $\mu\text{L}$ ), coluna C18 Ace (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e fase móvel em modo isocrático composta por água: metanol: acetonitrila, em fluxo de 1,0 mL/min. Para as metodologias 1 e 2, a proporção da fase móvel correspondeu a 70: 20: 10 (v/v/v), com detecção a 365 nm de excitação e 450 nm de emissão. Para a metodologia 3 utilizou-se as condições do método original, sendo a proporção da fase móvel em 65: 25: 10 (v/v/v) e sinal do detector em 365/440 nm de excitação e emissão, respectivamente.

## **2.4. Parâmetros de validação**

O estudo dos principais parâmetros de validação foi conduzido segundo os documentos EC 401/2006 da Comissão Europeia, o qual é específico para determinação de micotoxinas e, também, de acordo com as recomendações gerais da AOAC (2002a). Foram avaliados a seletividade, linearidade da faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, recuperação e repetitividade.

A seletividade do método foi avaliada através da ausência de interferentes que coincidissem com os tempos de retenção das aflatoxinas estudadas, sendo verificado através da adição das micotoxinas em amostras nas quais não foram previamente detectadas a presença destas, com posterior extração e identificação dos picos e concentrações correspondentes no cromatograma.

A linearidade foi estudada por padronização externa através da construção de curvas analíticas constituídas por 7 pontos de diferentes concentrações dos padrões das aflatoxinas em metanol. Cada curva foi preparada em quintuplicata em concentrações variando de 0,005 a 0,1 µg/mL, para as quatro aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>). Para a verificação do ajuste dos dados à curva, adotou-se como critério o valor do coeficiente de correlação R<sup>2</sup>, considerado adequado quando > 0,99.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através da adição em concentrações decrescentes da solução padrão contendo as quatro aflatoxinas nas amostras de grãos de trigo. Tais amostras foram então submetidas à extração e posterior quantificação por CLAE-DF, até a menor concentração detectável (LD) e quantificável (LQ) sob condições adequadas de repetibilidade ( $n= 5$ , CV <15%). Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,6 e 1,2 µg/Kg, respectivamente, para as 4 aflatoxinas.

Os estudos de recuperação foram realizados em amostras onde não foram detectadas a presença das quatro aflatoxinas, procedendo-se a adição com 2 níveis diferentes de concentração (5 e 10 µg/Kg) para cada micotoxina (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>). Foram analisadas 5 amostras para cada nível de adição e armazenadas sob temperatura ambiente por 12 h antes da realização do procedimento de extração.

A recuperação foi obtida pela relação entre a concentração de aflatoxina adicionada na amostra e a concentração detectada após sua extração, sendo expressa em porcentagem. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e obtida pela repetibilidade dos experimentos de recuperação, para cada nível de fortificação, sendo adotada a variação máxima ≤ 15%. Como critério de avaliação do parâmetro de exatidão, foi adotado como referência os valores definidos pela Comissão Europeia para determinação de aflatoxinas em níveis de até 10 µg/Kg, correspondendo entre 70 a 110% (EC, 2006).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Metodologia de determinação e otimização das condições analíticas

As metodologias avaliadas apresentaram diferentes valores de recuperação e repetibilidade, conforme apresentado na Tabela 1. Apenas a metodologia 1, proposta pelo IAL (2008) apresentou valores de recuperação dentro da faixa de 70 a 110% para os dois níveis de fortificação (5 e 10 µg/Kg).

A metodologia 2 foi adequada para o nível de 10 µg/Kg, no entanto, apresentou baixos valores de recuperação para B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> quando as amostras foram adicionadas de 5 µg/Kg.

A metodologia 3, baseada na técnica QuEChERS, não se mostrou adequada para determinação de aflatoxinas em grãos de trigo, apresentado valores inadequados de recuperação, principalmente para AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>. Tal fato deve-se principalmente a ausência de uma etapa de derivatização destas aflatoxinas, já que a quantificação foi realizada por fluorescência. De acordo com Espinosa-Calderón *et al.* (2011) e Bakırdere *et al.* (2012), a etapa de derivatização pré ou pós-coluna é importante quando se utiliza CLAE-DF pois aumenta a fluorescência natural de tais moléculas, aumentando a sensibilidade de detecção através da conversão das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> à seus derivados B<sub>2a</sub> e G<sub>2a</sub>, respectivamente.

Tabela 5 – Média dos ensaios de recuperação e Desvio Padrão (DP) de amostras de grãos de trigo fortificadas com 5 e 10 µg/Kg de cada uma das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>

Aflatoxina	Metodologia	Nível de adição (µg/Kg)	Recuperação (%) <sup>1</sup>	DP
B <sub>1</sub>	1	10	94,5	4,1%
		5	71,4	11,4%
	2	10	84,2	6,9%
		5	66,8	4,9%
	3	10	14,8	4,7%
		5	Nd	-
B <sub>2</sub>	1	10	101,5	1,6%
		5	91,6	3,7%
	2	10	107,6	8%
		5	82,2	2,8%
	3	10	58,6	2,8%
		5	39,1	3,4%
G <sub>1</sub>	1	10	97,8	2,1%
		5	85,2	6,0%
	2	10	104,1	7,8%
		5	65	3,6%
	3	10	18%	10,4%
		5	Nd	-
G <sub>2</sub>	1	10	85	3,6%
		5	77,6	13,9%
	2	10	95,5	9,7%
		5	66,8	4,7%
	3	10	62,1	10,4%
		5	37,3	11,2%

<sup>1</sup>Média referente a 5 extrações. Nd= Não detectado. DP= Desvio Padrão. Metodologia 1- IAL (2008), Metodologia 2 - Soares e Rodriguez-Amaya (1989), Metodologia 3 - Sirhan *et al.* (2011)

Desta forma, a metodologia adotada para determinação de aflatoxinas em grãos de trigo, foi a Metodologia 1, otimizada do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), conforme descrito anteriormente. A aplicabilidade de tal método também foi estudada na determinação de aflatoxinas em farinha de trigo, farinha de trigo integral e farelo de trigo, o qual demonstrou-se adequado para a extração em tais matrizes, com bons níveis de recuperação e repetitividade, conforme apresentado na Tabela 6.

Com o objetivo de otimizar a resolução cromatográfica das quatro aflatoxinas, foram avaliadas diferentes proporções da fase móvel constituída por água: metanol: acetonitrila, nas proporções de 60: 20: 20, 65:15:10 e 70: 20: 10 (v/v/v). Utilizando as duas primeiras fases não foi possível a identificação da AFG<sub>2a</sub> (forma derivatizada da aflatoxina G<sub>1</sub>) devido a coeluição de um interferente. No entanto, a terceira fase móvel (70: 20: 10, v/v/v), em fluxo de 1 mL/min, proporcionou adequada separação e quantificação das quatro aflatoxinas, sendo escolhida para a quantificação.

Tabela 6 – Média dos ensaios de recuperação e Desvio Padrão (DP) de amostras de grãos de trigo e derivados adicionadas com 5 e 10 µg/Kg de cada uma das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>

Aflatoxina	Adição (µg/Kg)	Grãos de trigo	Farinha refinada	Farinha integral	Farelo de trigo
Média da recuperação <sup>1</sup> (%) ± DP					
B <sub>1</sub>	10	94,5 ± 4,1%	85,7 ± 2,2%	91,7 ± 3,8%	77,8 ± 5,5%
	5	71,4 ± 11,4%	73,8 ± 2,5%	74,5 ± 10,3%	77,5 ± 10,3%
B <sub>2</sub>	10	101,5 ± 1,6%	92,8 ± 2,7%	100,5 ± 1,9%	95,4 ± 8,2%
	5	91,6 ± 3,7%	82,2 ± 3,2%	95,4 ± 4,5%	104,9 ± 8,3%
G <sub>1</sub>	10	97,8 ± 2,1%	85,9 ± 1,0%	91,8 ± 5,2%	92,8 ± 13,6%
	5	85,2 ± 6,0%	73,8 ± 2,5%	80,4 ± 4,1%	108,5 ± 6,1%
G <sub>2</sub>	10	85 ± 3,6%	105,8 ± 9,6%	89,7 ± 4,2%	70,2 ± 3,2%
	5	77,6 ± 13,9%	78,1 ± 1,2	82,4 ± 2,9%	109,6 ± 9,3%

<sup>1</sup>Média referente a cinco extrações. DP = Desvio Padrão

Nestas condições, os tempos de retenção foram de aproximadamente 9, 13, 20 e 32 min, para as aflatoxinas G<sub>2a</sub>, B<sub>2a</sub>, G<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>. Na Figura 2 estão apresentados os cromatogramas dos padrões e dos ensaios de recuperação realizados.

Foram avaliados também, a influência dos sinais de excitação e emissão do detector, objetivando estabelecer as melhores condições de fluorescência para as quatro aflatoxinas. A partir da observação de trabalhos publicados na literatura, foram estudadas as seguintes combinações de excitação e emissão, respectivamente: 360/440; 360/445; 360/450; 365/440; 365/445 e 365/450 nm. Na Figura 3 estão ilustrados os resultados obtidos, onde, os valores de 365 e 450 nm de emissão e excitação, respectivamente, apresentaram os maiores valores de área do pico para as quatro aflatoxinas, sendo tais valores utilizados nesta pesquisa.

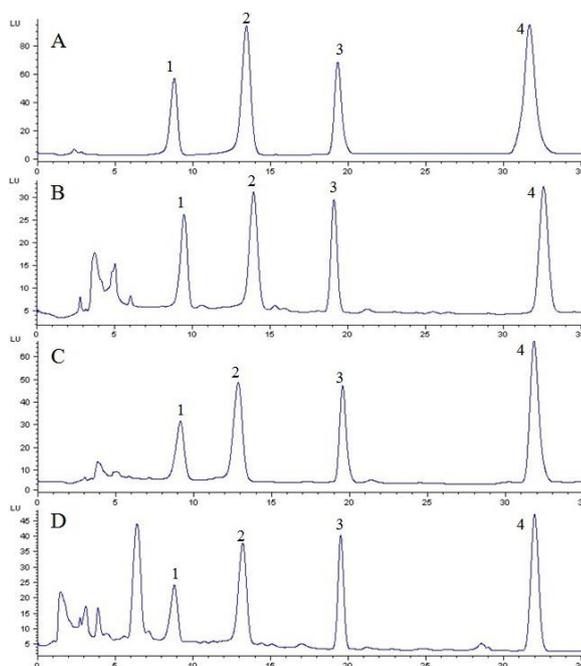


Figura 2 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DF dos padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> a 0,1 µg/mL cada (A) e, ensaios de recuperação nas matrizes: grãos de trigo (B), farinha de trigo refinada (C) e farelo de trigo (D). 1- Aflatoxina G<sub>2a</sub> (forma derivatizada da G<sub>1</sub>); 2 - Aflatoxina B<sub>2a</sub> (forma derivatizada da B<sub>1</sub>); 3 - Aflatoxina G<sub>2</sub>; 4 – Aflatoxina B<sub>2</sub>.

As curvas analíticas demonstraram linearidade adequada ( $R^2 > 0,99$ ) na faixa de trabalho estudada, conforme apresentado na Figura 4 e Tabela 7.

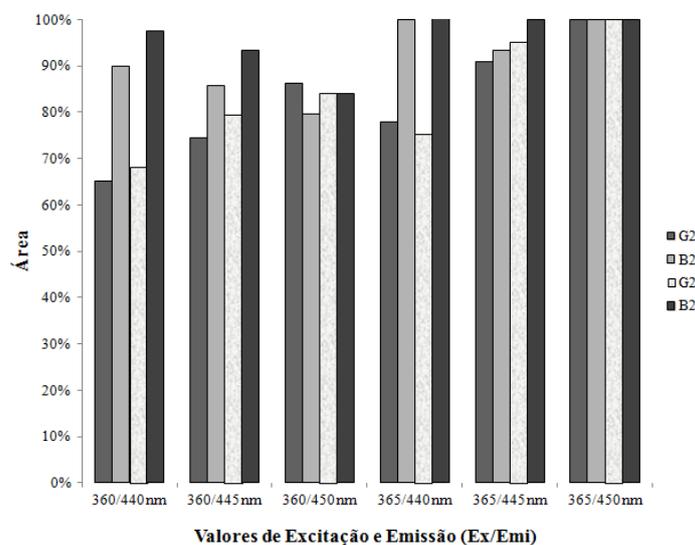


Figura 3 – Efeito de diferentes combinações e emissão e excitação do detector de fluorescência sob a sensibilidade das aflatoxinas G<sub>2a</sub>, B<sub>2a</sub>, G<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>.

Tabela 7 – Faixa linear, equação da reta, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e limites de detecção e quantificação de metodologia para quantificação de aflatoxinas em grãos de trigo

Aflatoxina	Linearidade ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Equação $y = ax + b$	$R^2$	LD ( $\mu\text{g/Kg}$ )	LQ ( $\mu\text{g/Kg}$ )
B <sub>2a</sub>	1,20 – 24,00	$y = 40,55x + 141,5$	0,998	0,6	1,2
G <sub>2a</sub>	1,20 – 24,00	$y = 12,24x + 39,80$	0,998	0,6	1,2
G <sub>2</sub>	1,20 – 24,00	$y = 18,41x + 52,33$	0,998	0,6	1,2
B <sub>2</sub>	1,20 – 24,00	$y = 51,33x + 123,0$	0,999	0,6	1,2

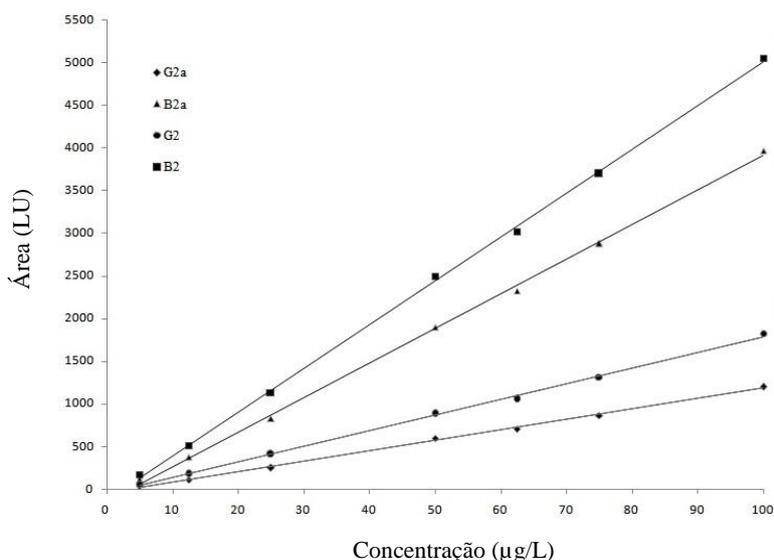


Figura 4 – Curvas analíticas obtidas por padronização externa através de 7 pontos de diferentes concentrações dos padrões das aflatoxinas.

### 3.2. Determinação de aflatoxinas em amostras comerciais

Através da metodologia validada, foram quantificadas aflatoxinas em 20 amostras aleatórias de grãos de trigo, farelo, farinha integral e refinada destinadas à consumo humano. As amostras foram adquiridas em diferentes supermercados do município de Seropédica, RJ, Brasil. Os resultados desta determinação estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Aflatoxinas Totais ( $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ ) em amostras de grãos de trigo, farelo e farinha integral e refinada

Amostra	Alimento	Aflatoxinas Totais <sup>1</sup>	Amostra	Alimento	Aflatoxinas Totais <sup>1</sup>
01		2,14 $\mu\text{g/Kg}$	11		Nd
02	Farelo de trigo	Nd	12	Farinha de trigo integral	Nd
03		1,27 $\mu\text{g/Kg}$	13		Nd
04		1,25 $\mu\text{g/Kg}$	14		Nd
05		1,86 $\mu\text{g/Kg}$	15		3,33 $\mu\text{g/Kg}$
06		Nd	16		Nd
07	Grãos de trigo	Nd	17	Farinha de trigo refinada	Nd
08		Nd	18		Nd
09		4,00 $\mu\text{g/Kg}$	19		Nd
10		Nd	20		Nd

<sup>1</sup>Média de três extrações. Nd – Não detectado

Aflatoxina  $B_1$  foi identificada em todas as amostras positivas e em 3 amostras (grãos e farelo)  $AFG_1$  também foi detectada.  $AFB_2$  e  $AFG_2$  não foram detectadas. Todas as amostras apresentaram-se em acordo com a legislação brasileira, com níveis de aflatoxinas totais  $< 5 \mu\text{g/Kg}$ .

Mesmo que as amostras avaliadas não apresentaram níveis de contaminação acima do limite permitido, mais estudos devem ser conduzidos objetivando avaliar a presença de aflatoxinas em trigo e produtos derivados, já que esses alimentos são largamente consumidos pela população e poucos estudos têm sido conduzidos e publicados sobre esse tema nos últimos anos.

### 4. Conclusões

O método validado neste estudo apresentou adequados parâmetros de seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão para determinação de aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  e  $G_2$  em amostras de grãos de trigo, farelo de trigo, farinha de trigo integral e refinada. O método é de simples aplicação e pode ser reproduzido sem a necessidade do uso de cartuchos de purificação ou de colunas de imunoafinidade. Das 20 amostras de grãos de trigo e derivados analisadas, 30% (6) foram positivas para aflatoxinas, entretanto, todas as amostras apresentaram níveis de contaminação abaixo do máximo permitido pela legislação brasileira para tais matrizes ( $5 \mu\text{g/Kg}$ ).

### **CAPÍTULO III**

#### **DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM GRÃOS DE TRIGO E DERIVADOS DESTINADO AO CONSUMO HUMANO, COMERCIALIZADOS NO RIO DE JANEIRO-RJ**

## Resumo

O consumo de farelo de trigo, grãos integrais e outros derivados integrais tem crescido nos últimos anos no Brasil. Esses alimentos são considerados mais nutritivos em relação aos refinados e seu consumo têm sido associados com redução do risco de algumas doenças crônicas não transmissíveis. Por outro lado, algumas pesquisas realizadas no país têm demonstrado a presença de diferentes grupos de toxinas fúngica, denominadas micotoxinas, em tais alimentos. Dentre essas, estão as aflatoxinas, moléculas genotóxicas e carcinogênicas produzidas pelo fungo *Aspergillus spp.* Esse estudo objetivou determinar os níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amostras de grãos de trigo e derivados integrais, destinados ao consumo humano, comercializadas na região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. Um total de 108 amostras, compostas de grãos de trigo integral ( $n=35$ ), farelo de trigo ( $n=32$ ), farinha de trigo integral ( $n=26$ ) e farinha de trigo refinada ( $n=15$ ) comercializadas em hipermercados, supermercados e lojas de produtos naturais foram analisadas por CLAE-DF. Trinta e três amostras (30,6%) foram positivas para ao menos uma aflatoxina e a B<sub>1</sub> teve a maior prevalência nas amostras. A média geral correspondeu a 0,69  $\mu\text{g/Kg}$  e a contaminação foi maior nas amostras de grãos de trigo, seguido do farelo de trigo, farinha integral e farinha refinada. Apenas uma amostra demonstrou níveis de aflatoxinas totais (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (5  $\mu\text{g/Kg}$ ). Os níveis encontrados nesse estudo indicam que a presença de aflatoxinas em trigo e derivados consumido no Rio de Janeiro, Brasil, não parece representar um risco elevado para saúde humana.

**Palavras-chave:** Micotoxinas. Aflatoxina B<sub>1</sub>. Farelo de trigo. Produtos integrais. CLAE.

## Abstract

The consumption of wheat bran, whole-wheat grains and other whole-wheat products has grown in recent years in Brazil. These foods are considered more nutritious than the refined ones and have been associated with a reduced risk of some major chronic diseases. On the other hand, other research, carried out in Brazil, has found different groups of fungi toxins, called mycotoxins, contaminating these wheat products. Among these mycotoxins, are the aflatoxins, a group of genotoxic and carcinogenic compounds produced by *Aspergillus spp.* This study aimed to determine the levels of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in samples of whole-wheat grains and derivatives, intended for human consumption, marketed in the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. One hundred and eight samples of whole-wheat grains ( $n=35$ ), wheat bran ( $n=32$ ), whole-wheat flour ( $n=26$ ) and refined wheat flour ( $n=15$ ) marketed in hypermarkets, supermarkets and health food stores were analyzed by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL). Thirty-three samples (30.6%) were positive for at least one aflatoxin and the B<sub>1</sub> form had the highest prevalence in the samples. The overall average was 0.69  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the contamination was the highest in the grain samples, followed by bran, whole-flour and refined flour. Just one sample showed total aflatoxins levels (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) higher than the limit established by Brazilian legislation (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). The levels found in this study indicated that the presence of aflatoxins in wheat and wheat products consumed in Rio de Janeiro, Brazil, are not a risk for public health

**Key words:** Mycotoxins. AFB<sub>1</sub>. Wheat bran. Whole-wheat products. HPLC.

## 1. Introdução

Aflatoxinas são um grupo de compostos tóxicos produzidos por certas espécies do fungo *Aspergillus spp.*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*, quando se desenvolvem em alimentos e rações em condições favoráveis de temperatura e umidade (FSA, 2013). As principais aflatoxinas são denominadas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, e G<sub>2</sub>, sendo classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como agentes carcinogênicos para humanos (IARC, 2002). Tais formas são geralmente detectadas juntas em diferentes tipos de alimentos e a forma B<sub>1</sub> possui o maior potencial carcinogênico dentre todas as micotoxinas (EFSA, 2013a; FDA, 2012). Uma vez que não existe uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para aflatoxinas, por serem substâncias carcinogênicas, a presença nos alimentos deve ser mantida tão baixo quanto possível (EFSA, 2013b). Para proteger os consumidores desse perigo, diferentes países tem definidos limites para aflatoxinas em trigo e derivados, variando de 4 µg/Kg na União Europeia, até 30 µg/Kg na Índia (TROMBETE *et al.*, 2013).

Grãos de cereais contaminados com aflatoxinas representam um problema de saúde pública devido a alta toxicidade dessas substâncias e também pelo fato de permanecerem parcialmente estáveis durante os processos industriais no qual o grão é submetido para fabricação de produtos derivados (BULLERMAN e BIANCHINI, 2007; GIMÉNEZ *et al.*, 2013). O processo de moagem do trigo promove a formação de diferentes frações do grãos, sendo que a contaminação por micotoxinas é maior no farelo por ser a fração mais externa do grão, o qual é destinado em maior parte para o consumo animal (CHELI *et al.*, 2013; HERRERA *et al.*, 2009). Entretanto, o consumo humano do farelo de trigo como fonte direta de fibra dietética tem crescido nos últimos anos, principalmente porque é um produto barato e de alto teor de fibras (VIDAL *et al.*, 2013). Por essa razão, o farelo de trigo destinado ao consumo humano deve possuir níveis de micotoxinas que não comprometam a segurança do produto final (BRASIL, 2011).

Apesar dos produtos elaborados com trigo integral, ou que utilizam o farelo em sua composição serem considerados mais nutritivos do que os elaborados com farinha de trigo refinada (STEVENSON *et al.*, 2012), algumas pesquisas têm demonstrado contaminação por micotoxinas em tais alimentos, principalmente àquelas produzidas pelo fungo *Fusarium spp*, tais como desoxinivalenol, nivalenol e zearalenona (ALMEIDA-FERREIRA *et al.*, 2013; SAVI *et al.*, 2014).

São poucos os estudos relacionados com a ocorrência de aflatoxinas em grãos e derivados de trigo comercializados no Brasil. Em outros países, tal como na Tunísia, Líbano e Turquia, altos níveis de aflatoxinas foram reportados em tais alimentos, representando um risco à saúde dos consumidores (AYDIN *et al.*, 2008; GHALI *et al.*, 2008; JOUBRANE *et al.*, 2011). O objetivo dessa pesquisa foi determinar os níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amostras de grãos de trigo integral e derivados, destinados ao consumo humano e comercializados no Rio de Janeiro, Brasil.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Amostragem

Durante o período de janeiro de 2013 a fevereiro de 2014, amostras de grãos de trigo integral ( $n=35$ ), farelo de trigo ( $n=32$ ), farinha de trigo integral ( $n=26$ ) e farinha de trigo refinada ( $n=15$ ) foram adquiridas de diferentes hipermercados, supermercados e lojas de produtos naturais situados na região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, totalizando 108

amostras. Embalagens contendo de 500 g a 1 Kg foram coletadas e então transportadas ao laboratório para análises.

## **2.2. Reagentes e solventes**

Os padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Acetonitrila e metanol grau CLAE foram adquiridos da Tedia (São Paulo, SP, Brasil). Outros solventes e reagentes usados para extração foram de grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Água ultra purificada foi obtida de um sistema Milli- Q® (Millipore, MA, USA). Papel filtro (nº 1) foi adquirido da Whatman (Maidstone, UK) e membranas 0,45 µm PVDF (Durapore® 13 mm, Millipore) foram utilizadas para filtração.

## **2.3. Preparo das soluções padrão**

Alíquotas dos padrões das aflatoxinas B<sub>1</sub> (ampola contendo 5 mg), B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (1 mg) foram dissolvidos em metanol. As soluções estoque (50 µg/mL) e de trabalho (2 µg/mL) foram preparadas através de diluições em metanol e as concentrações foram confirmadas por leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1201, Kyoto, Japão), de acordo com AOAC (2002b).

## **2.4. Determinação das aflatoxinas**

A determinação das aflatoxinas ocorreu em triplicatas para cada uma das 108 amostras analisadas. A metodologia utilizada para tal foi de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), com algumas adaptações, conforme descrito no CAPÍTULO II.

## **2.5. Análises por CLAE-DF**

A quantificação das aflatoxinas ocorreu em sistema CLAE composto por um detector de fluorescência Agilent 1100 Series (Waldbronn, Alemanha), com excitação e emissão em 365 nm e 450 nm, respectivamente; injetor Rheodyne (20 µL), coluna C18 (Ace, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel em modo isocrático, composta por água: metanol: acetonitrila (7: 2: 1, v/v/v) em fluxo de 1,0 mL/min. Os resultados obtidos foram expressos pela média das três triplicatas, em µg/Kg. A metodologia utilizada nesse estudo foi previamente validada e demonstrou ser adequada para a determinação de aflatoxinas nas matrizes estudadas (grãos, farelo e farinha de trigo), com adequados limites de detecção e quantificação, exatidão e repetibilidade, conforme apresentado em Trombete *et al.* (2014).

## **2.6. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software Sisvar® 5.3 Build 77 (UFLA, Brasil), através de Análise de Variância (ANAVA) e Teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

## **3. Resultados e Discussão**

Cento e oito amostras de grãos e derivados de trigo, comercializados no Rio de Janeiro, foram analisados para presença de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>. Trinta e três amostras (30,6%) foram positivas para ao menos uma aflatoxina e a forma B<sub>1</sub> teve a maior ocorrência nas amostras, com 27,8% positivas e maior nível detectados correspondente a 4,2

$\mu\text{g}/\text{Kg}$ . As formas G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram detectadas em apenas 10,2 % e 0,9% das amostras, respectivamente. A forma B<sub>2</sub> não foi detectada em nenhuma das amostras. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados de aflatoxinas totais encontrados. Na Figura 2 estão ilustradas as proporções de cada aflatoxina presente nas amostras positivas.

Tabela 9 - Níveis de aflatoxinas totais em amostras de grãos de trigo, farinhas e farelo, comercializadas no Rio de Janeiro.

Alimento	<i>n</i>	Amostras positivas	Média das amostras positivas <sup>1</sup> ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	Maior valor encontrado ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	NMP ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
Grãos de trigo	35	45,7%	2,2 <sup>a</sup>	6,2	5
Farelo de trigo	32	40,6%	2,4 <sup>a</sup>	4,8	5
Farinha de trigo integral	26	7,7%	2,3 <sup>a</sup>	3,4	5
Farinha de trigo refinada	15	6,7%	1,2 <sup>a</sup>	1,2	5
Total	108	30,6%	2,2 <sup>a</sup>	6,2	5

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem ( $p>0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey. *n* – número de amostras analisadas. NMP – Nível máximo permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2011)

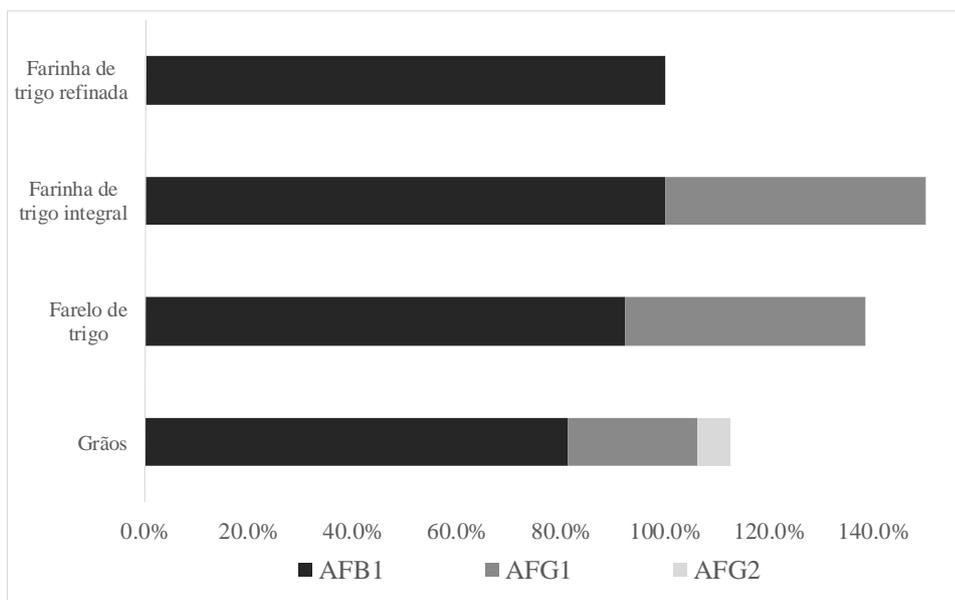


Figura 5 - Ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amostras positivas. A forma B<sub>2</sub> não foi detectada.

Apenas uma amostra (grão de trigo contendo 6,2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de aflatoxinas totais) apresentou nível maior do que o limite estabelecido pela legislação brasileira para aflatoxinas em cereais (5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). A média geral correspondeu a 0,69  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  e a maior contaminação correspondeu nas amostras de grãos, seguida das de farelo, farinha integral e farinha refinada. Os níveis de aflatoxinas nas amostras positivas não diferiram entre si ( $p>0,05$ ) entre as diferentes amostras avaliadas.

Se fosse considerado o limite estipulado na União Europeia para a presença de aflatoxinas em trigo para consumo humano (4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), uma amostra de farelo de trigo

contendo 4,79  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  também seria considerada imprópria para consumo humano (EU, 2010). Essa diferença entre legislações é devido a diferentes fatores, principalmente àqueles relacionados com a exposição humana e fatores comerciais. A atual legislação sobre micotoxinas vigente no Brasil foi fixada em 2011 pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2011). Após tal data, o presente estudo foi o primeiro trabalho publicado com o objetivo de avaliar os níveis de aflatoxinas em trigo e produtos derivados destinados ao consumo humano, comercializados no país. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados objetivando avaliar a ocorrência de aflatoxinas e outros grupos de micotoxinas no trigo e derivados consumidos em diferentes regiões do país, uma vez que tais alimentos representam uma das principais fontes de nutrientes para a população brasileira.

#### **4. Conclusão**

De um total 108 amostras analisadas, 33 (30,5%) foram positivas para ao menos uma aflatoxina e em apenas uma amostra (grãos de trigo) os níveis de aflatoxinas totais foram maiores do que o permitido pela legislação brasileira (5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). A contaminação foi maior em amostras de grãos de trigo, seguido de farelo, farinha integral e farinha refinada. Os resultados encontrados nesse estudo indicam que a presença de aflatoxinas em grãos e derivados de trigo consumidos no Rio de Janeiro-RJ não parece ser um risco elevado para a saúde humana.

## **CAPÍTULO IV**

### **OZÔNIO CONTRA MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS: APLICAÇÕES ATUAIS E PERSPECTIVAS**

## Resumo

A segurança do alimento pode ser comprometida pela presença de contaminantes químicos, tais como as micotoxinas. Micotoxinas são contaminantes naturais produzidos por fungos filamentosos e que podem ser tóxicos à saúde humana. Resíduo de agrotóxico é qualquer substância presente no alimento, resultante do uso de agrotóxico e que possui relevância toxicológica. Com o intuito de proteger os consumidores dessas substâncias, diferentes agências reguladoras têm estipulado Limites Máximos Permitidos (LMP) para resíduos de agrotóxicos em diferentes matérias primas alimentícias e alimentos processados. Ainda assim, pesquisas recentes têm demonstrado alta incidência tanto de micotoxinas quanto de resíduos de agrotóxicos em alimentos comercializados em diferentes países, inclusive com níveis maiores do que os permitidos pelas agências reguladoras. Uma forma de reduzir tais contaminações é através do uso do ozônio ( $O_3$ ) no processamento do alimento. Devido ao seu alto potencial oxidante, o  $O_3$ , ou os radicais gerados no processo, reagem com as micotoxinas e resíduos de agrotóxicos eliminando ou reduzindo o potencial tóxico devido a degradação molecular promovida. Nesse trabalho de revisão foram discutidas as pesquisas recentes sobre aplicação da ozonização gasosa e da água ozonizada na descontaminação de alimentos, através da redução/eliminação de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos. As alterações promovidas na qualidade do alimento, a possível formação de produtos de degradação de relevância tóxica e, as perspectivas para pesquisas futuras com o uso dessa tecnologia no processamento de alimentos também foram abordadas.

**Palavras-chave:** Segurança do alimento. Contaminação química.  $O_3$ . Ozonização gasosa. Água ozonizada.

## **Abstract**

Food safety may be compromised by the presence of chemical contaminants, such as mycotoxins and pesticide residues. Mycotoxins are natural contaminants produced by certain species of filamentous fungi and can cause toxic effects on human health. Pesticide residues are any specified substance in food resulting from the use of a pesticide with toxicological significance. To protect consumers from these toxic substances, different food regulatory agencies have set maximum levels permitted in different raw materials and processed food. However, recent research has demonstrated a high incidence of both mycotoxins and pesticide residues in foods marketed all around the world, sometimes with levels higher than limit allowed by the regulations. One way to reduce such contaminants is to use ozone (O<sub>3</sub>) in food processing. Due to its high potential as an oxidant, O<sub>3</sub> or the radicals generated in the ozonation process react with mycotoxins and pesticide residues that lose their toxicity due to molecular degradation. In this review paper the recent research into using O<sub>3</sub> for gaseous ozonation and ozonized water to decontaminate food by eliminating and/or reducing mycotoxins and pesticide residues are discussed. Also the changes promoted in the food quality, the possible formation of degradation products of toxic relevance due to ozonation as well as some future perspectives for the use of this technology in food processing are explored.

**Key words:** Food safety. Chemical contaminants. O<sub>3</sub>. Gaseous ozonation. Ozonized water.

## 1. Introdução

A cada dia mais consumidores estão conscientes e preocupados com a segurança dos alimentos que consomem, bem como dos riscos associados com a contaminação por micro-organismos e substâncias tóxicas (KHER *et al.*, 2013). A presença de resíduos e contaminantes nos alimentos, tais como, resíduos de agrotóxicos e micotoxinas, tem se destacado em termos de saúde pública e segurança do alimento.

Agrotóxicos são usados na agricultura para aumentar a produtividade das culturas através da proteção contra doenças e pragas. Entretanto, os agrotóxicos devem ser aplicados em acordo com as Boas Práticas Agrícolas (BPA) e os níveis de tais substâncias presente no alimento para consumo devem estar abaixo do LMP. Os LMPs para resíduos de agrotóxicos diferem a nível mundial, já que os diferentes países usam diferentes critérios para a definição de normas regulatórias (EFSA, 2015; HANDFORD *et al.*, 2015).

Atualmente, o uso global de agrotóxicos, de aproximadamente dois milhões de toneladas por ano (DE *et al.*, 2014), somado ao constante aumento da resistência das pragas e doenças, tem gerado preocupação em relação a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos (LIU *et al.*, 2015). A ingestão de alimentos contaminados com resíduos de agrotóxicos tem sido associada com desordens endócrinas, reprodutivas e neurológicas, incluindo risco de desenvolvimento de câncer (US EPA, 2014; BLAZNIK *et al.*, 2015; CHIU *et al.*, 2015). Tal contaminação é especialmente preocupante para crianças devido à baixa capacidade de detoxificação e a alta ingestão de alimentos por Kg de peso corpóreo (LOMBARD, 2014).

Apesar da vigilância realizada pelas autoridades competentes, pesquisas recentes têm demonstrado altos níveis dessas substâncias em diferentes tipos de alimentos, muitas vezes com valores superiores aos LMP. Alguns exemplos de alimentos com altos níveis de contaminação são: vegetais (AKOTO *et al.*, 2015; CHOURASIYA *et al.*, 2015), café (OLIVEIRA *et al.*, 2016), mel (BARGAÑSKA *et al.*, 2013), maçãs (LOZOWICKA, 2015), goiaba, caqui, pêssego (JARDIM *et al.*, 2014) e cereais (MIN *et al.*, 2012; LOZOWICKA *et al.*, 2014).

Micotoxinas também são contaminantes presente nos alimentos de grande relevância para a saúde pública. São metabólitos tóxicos produzidos por diferentes fungos filamentosos, tais como *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*, que podem contaminar os alimentos ainda na fase de plantio e cultivo ou quando imprópriamente armazenados (EFSA, 2013; CHELI *et al.*, 2014). Os efeitos das micotoxinas na saúde humana depende da substância associada e pode variar desde intoxicação leve até desenvolvimento de câncer e, em casos extremos, morte (IARC, 2002; MARROQUÍN-CARDONA *et al.*, 2014).

As BPA incluem procedimentos para prevenir a infestação de fungos principalmente nos produtos armazenados e, dessa forma, evitar a consequente contaminação por micotoxinas, entretanto, como são contaminantes naturais, humanos e animais estão expostos a tais perigos. Pesquisas recentes realizadas em diferentes países, utilizando biomarcadores urinários e também os presentes no leite materno têm demonstrado uma alta exposição humana a diferentes micotoxinas, tais como aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona e desoxinivalenol (SREY *et al.*, 2014; IHA *et al.*, 2014; GERDING *et al.*, 2015; RUBERT *et al.*, 2014).

Estudos recentes têm demonstrado que a ozonização pode ser usada para descontaminação de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos em alimentos, principalmente em vegetais frescos, frutas e cereais. O ozônio molecular (O<sub>3</sub>) ou os radicais hidroxil gerados no processo, especialmente na água ozonizada, reagem com tais resíduos e contaminantes promovendo sua degradação, com formação de produtos de baixo peso molecular, e, dessa forma, reduzindo ou eliminando a atividade biológica dessas substâncias em termos de

toxicidade (IKEHATA *et al.*, 2006; DIAO *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2014a). O FDA (US Food and Drug Administration) reconheceu, desde 2001, o O<sub>3</sub> como substância GRAS (Generally Recognized as Safe) para processamento e armazenamento de alimentos e água (FDA, 2001). A vantagem do uso do O<sub>3</sub> para descontaminação de alimentos em relação a outros agentes oxidantes é que sua produção e aplicação são ambientalmente corretas, não deixando resíduos no alimento por se dissociar em oxigênio. Dessa forma, o O<sub>3</sub> é reconhecido como uma “tecnologia verde” (O’DONNEL *et al.*, 2012; GREENE *et al.*, 2012).

A eficácia da ozonização para degradação de resíduos de micotoxinas e pesticidas depende de sua concentração, tempo de exposição, tipo de alimento, teor de umidade, forma de aplicação (se gasosa ou aquosa), dentre outros fatores. Como efeitos secundários da descontaminação, a ozonização pode promover alterações positivas na qualidade do alimento, tais como, aumento no volume de pães e bolos ou aumento na força e claridade da farinha de trigo (CABALLERO *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2012a). Entretanto, alterações negativas também podem ocorrer, tais como oxidação lipídica, alterações nas características sensoriais, perda de cor, degradação de compostos fenólicos e algumas vitaminas, dentre outras (PATIL *et al.*, 2010; GABLER *et al.*, 2010). Tais alterações negativas devem ser estudadas para que se conheça as limitações dessa tecnologia.

Nesse trabalho foram revisados os estudos mais recentes sobre a redução de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos promovidos pela ozonização, incluindo as alterações na qualidade do alimento devido ao processo. Possível formação de produtos de degradação de relevância tóxica e as perspectivas para pesquisas futuras para o uso industrial do O<sub>3</sub> na ciência e tecnologia de alimentos também foram discutidas.

## **2. Produção industrial do O<sub>3</sub> e legislação para o uso no processamento de alimentos**

A produção do O<sub>3</sub> deve ocorrer no local onde será realizada a ozonização e seu uso deve ser realizado imediatamente após produzido, devido sua instabilidade e rápida dissociação em O<sub>2</sub>. Quando utilizado em estudos para descontaminação de alimentos, o O<sub>3</sub> têm sido gerado predominantemente por descarga de corona. Nesse tipo de ozonizador as moléculas de O<sub>2</sub> são expostas a uma alta descarga elétrica, capaz de dissociar o O<sub>2</sub> em oxigênio atômico, com conseqüente formação de O<sub>3</sub> (WCBBC, 2006). Através do método de descarga de corona é possível obter altas concentrações de ozônio por L de ar ambiente ou de oxigênio industrial a baixo custo, entretanto, a radiação UV também pode ser utilizada para produzir O<sub>3</sub>, mas, com menor concentração e menores rendimentos de produção (TAPP e RICE, 2012).

O O<sub>3</sub> pode ser aplicado na forma gasosa diretamente no alimento, como ocorre na ozonização de grãos de cereais, ou, também pode ser borbulhado em água para a produção da água ozonizada, a qual é principalmente utilizada para ozonização de matérias primas que necessitam de um processo de higienização durante o processamento, tais como frutas e hortaliças (COELHO *et al.*, 2015).

Na forma gasosa e em presença de alimentos, o tempo de meia vida do O<sub>3</sub> é de poucas horas, no entanto, em ar seco a 0 % de umidade pode atingir estabilidade de até 25 h (McCLURKIN *et al.*, 2013). Quando borbulhado em água, o O<sub>3</sub> se dissolve parcialmente, formando radicais hidroxil (-OH) que podem oxidar os contaminantes com mais eficácia do que o O<sub>3</sub> (TAKAHASHI *et al.*, 2007). A água ozonizada pode ser utilizada para lavar diversos tipos de alimentos, principalmente vegetais, mas também alguns tipos de cereais que necessitam de uma etapa de acondicionamento em alta umidade antes do processo de moagem, como os grãos de trigo (IBANOĞLU, 2001).

Não existe uma concentração limite para o uso do O<sub>3</sub> em alimentos e sua concentração deve ser de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) da indústria alimentícia. A

Conferência Governamental Americana de Higienistas Industriais (ACGIH) definiu o limite de 0,2 mg de O<sub>3</sub>/m<sup>3</sup> para uma exposição de 8h de trabalho/dia (FDA, 2014), enquanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda 0,1 mg/m<sup>3</sup> para um regime de 8h de trabalho/dia (WHO, 2006). Como o O<sub>3</sub> é um gás tóxico, níveis maiores que esse podem causar efeitos tóxicos, com efeitos no sistema nervoso, coração e visão (PubChem, 2015).

### 3. Micotoxinas em alimentos e uso do O<sub>3</sub> na redução da contaminação

A contaminação de alimentos por micotoxinas é um sério problema de saúde pública pois essas podem causar diferentes tipos de problemas de saúde devido aos diferentes efeitos tóxicos que podem desencadear, dentre esses a citotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade (STOEV, 2015a). As principais micotoxinas relacionadas com contaminação de alimentos são as aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, citrinina, patulina, ocratoxina A, desoxinivalenol e outros tricotecenos (ROCHA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Em grãos de cereais, as toxinas de *Fusarium*, tal como os tricotecenos, zearalenona e fumonisinas são as mais comumente detectadas, principalmente na fase de pré-colheita do alimento (RUYCK *et al.*, 2015). Tricotecenos, tal como o desoxinivalenol (DON), são conhecidos por sua capacidade de interferir na síntese proteica e causar imunossupressão (ANTONISSEN *et al.*, 2014). As fumonisinas são associadas com câncer de esôfago e podem interferir na biossíntese de esfingolipídeos com consequente desordem celular. Zearalenona é um potente estrogênico e pode causar infertilidade, aborto e desordens do sistema reprodutivo (YAZAR e OMURTAG, 2008).

*Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* são fungos de grande importância durante o armazenamento dos alimentos. Quando esses fungos encontram adequadas condições de umidade e temperatura, pode ocorrer a contaminação dos alimentos por aflatoxinas, especialmente em sementes oleaginosas, como o amendoim e, em diversos tipos de cereais (GORAYEB *et al.*, 2009). As aflatoxinas são um dos grupos de toxinas de maior importância ambiental e a forma B<sub>1</sub> é a de maior potencial tóxico nesse grupo, com alta atividade hepatocarcinogênica e imunossupressiva (MAGNUSSEN, 2013). Ambos *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* podem produzir ocratoxina que contaminam principalmente uvas e derivados, como o vinho. A ocratoxina A é a mais relevante nesse grupo e é associada com efeitos nefrotóxicos e carcinogênicos (SORRENTI *et al.*, 2013). Esses fungos podem ainda produzir patulina em suco de maçã, uma micotoxina citotóxica e genotóxica (GLASER e STOPPER, 2012). Certas espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e principalmente *Monascus* podem produzir citrinina em arroz, a qual é uma micotoxina associada com efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos e carcinogênicos (LI *et al.*, 2012b). Na Figura 1 estão ilustradas as estruturas moleculares das principais micotoxinas de ocorrência em alimentos.

A produção de micotoxinas depende das condições ambientais durante o crescimento da planta e durante o armazenamento do alimento, podendo ser difícil o controle total das condições. Assim, a presença das micotoxinas no produto final é muitas vezes inevitável (Stoev, 2015a). Outro fator que dificulta a prevenção de tal contaminação é o fato de serem substâncias muito estáveis aos tradicionais processamentos que são aplicados nas matérias primas alimentares. Dessa forma, se a matéria prima estiver contaminada, as micotoxinas irão também estar presente nos alimentos processados (EFSA, 2013; TIBOLA *et al.*, 2015).

Quando o O<sub>3</sub> é aplicado em baixas concentrações durante o armazenamento de frutas e cereais por um longo período de tempo ocorre a inibição do desenvolvimento de esporos fúngicos, prevenindo dessa forma a formação das micotoxinas (FELIZIANI *et al.*, 2014; HANSEN *et al.*, 2013). Entretanto, tais efeitos depende de fungo envolvida, do estágio de

crescimento, da concentração de O<sub>3</sub> e do tempo de exposição (FREITAS-SILVA e VENÂNCIO, 2010).

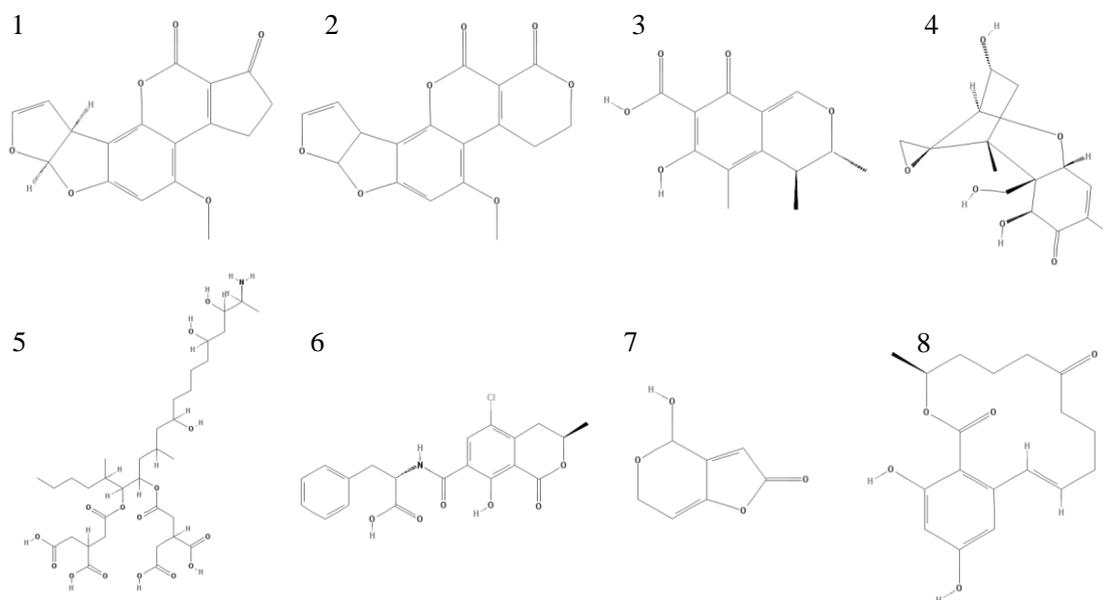


Figura 6 - Estrutura molecular das principais micotoxinas encontradas nos alimentos. 1- aflatoxina B<sub>1</sub>, 2- aflatoxina G<sub>1</sub>, 3- citrinina, 4- desoxinivalenol, 5- fumonisina B<sub>1</sub>, 6- oratoxina A, 7- patulina, 8- zearalenona. Adaptado de PubChem (2015).

Por outro lado, para que seja promovida a degradação molecular das micotoxinas, altas concentrações de O<sub>3</sub> são necessárias. O tempo de exposição, tipo de alimento, teor de umidade e temperatura também são fatores que afetam diretamente a eficácia da descontaminação (IKEURA *et al.*, 2011a; LI *et al.*, 2014).

Os valores de degradação de micotoxinas por O<sub>3</sub> reportados na literatura variam muito em relação as diferentes condições experimentais utilizadas em cada estudo. Na Tabela 1 estão resumidas as condições experimentais de alguns estudos recentes envolvendo a descontaminação de micotoxinas pela ozonização em diferentes tipos de alimentos, incluindo os valores de redução (%) obtidos.

Além dos trabalhos realizados em nível laboratorial, McDonough *et al.* (2011) avaliou o uso da ozonização em escala comercial, aplicando O<sub>3</sub> a 4,7 % em ar, para descontaminação de grãos de milho em um sistema de fluxo contínuo. Nesse estudo, o O<sub>3</sub>, em contato com os grãos por 1,8 min foi capaz de reduzir cerca de 30% das aflatoxinas totais.

Alguns estudos têm demonstrado a eficácia do O<sub>3</sub> em degradar padrões de micotoxinas em solução, um método que pode auxiliar a entender o mecanismo de ação do O<sub>3</sub> na degradação de tais substâncias. Young *et al.* (2006), estudou os efeitos da água ozonizada a 25 ppm na degradação de DON, nivalenol (NIV) e outros tricotecenos. Os autores concluíram que a degradação de tais micotoxinas inicia com o ataque do O<sub>3</sub> na ligação C9-C10 com consequente quebra molecular e formação de compostos menores, tais como ácidos orgânicos, aldeídos e cetonas. O uso da água ozonizada nesse estudo reduziu significativamente os níveis de tricotecenos em solução.

Dudziak (2012), estudou a degradação de zearalenona por água ozonizada a 1 mg/L durante 20 min. O tratamento reduziu a concentração da micotoxina até níveis indetectados. Os autores concluíram que quanto maior o tempo de exposição da micotoxina na solução ozonizada, maior é a eficácia da degradação. Freitas-Silva (2011), também demonstrou o

potencial da água ozonizada a 20 mg/L na degradação de uma solução da micotoxina ácido ciclopiazônico, ressaltando que a água ozonizada pode ser utilizada para descontaminar não apenas micotoxinas em solução, mas também matérias primas, equipamentos e utensílios de laboratório e ainda reagentes para descarte.

Para estudar a eficácia do tratamento com O<sub>3</sub> sobre as micotoxinas, além da verificação da redução nos níveis, que é determinada por técnicas analíticas, é essencial identificar os produtos moleculares que são formados durante o processamento, para que se conheça o potencial tóxico de tais substâncias. Nesse sentido, Luo *et al.* (2014a), identificaram seis produtos de degradação da aflatoxina B<sub>1</sub> em água ozonizada em diferentes concentrações e, através das estruturas moleculares identificadas os autores confirmaram que a ozonização elimina as estruturas responsáveis pela toxicidade da micotoxina. Ainda de acordo com os autores, as moléculas insaturadas são mais facilmente atacadas pelo O<sub>3</sub>, enquanto que as saturadas são mais resistentes a detoxificação.

Diao *et al.* (2012) demonstrou que a oxidação da AFB<sub>1</sub> em acetonitrila, através da ozonização gasosa em concentração de 6,28 mg de O<sub>3</sub>/L, forma treze produtos de degradação e elimina as estruturas responsáveis pelos efeitos tóxicos da molécula, tal como a instauração no anel furano e a lactona no anel benzênico.

Outra forma de comprovar que a ozonização elimina ou diminui os efeitos tóxicos de alimentos contaminados por micotoxinas são os estudos envolvendo experimentação animal. Diao *et al.* (2013) demonstrou que amendoins contaminados por AFB<sub>1</sub> e submetidos a ozonização a 50 mg/L durante 60h não causou sintomas de intoxicação ou alterações na aparência e comportamento de ratos fêmeas Wistar. Os autores demonstraram que os efeitos tóxicos da AFB<sub>1</sub> foram reduzidos pela ozonização sem afetar a saúde dos animais que se alimentaram do milho ozonizado. Gaou *et al.* (2005), também investigou se o consumo de grãos de trigo ozonizados com 5 g de O<sub>3</sub>/Kg poderia promover efeitos adversos na saúde ratos Dark Agouti. Após os animais se alimentarem por 4 semanas com os grãos, análises hematológicas, bioquímicas, urinária e histopatológica foram realizadas e demonstraram não haver diferença com os animais controle, podendo concluir que o consumo de grãos ozonizados foi seguro para a saúde desses.

Luo *et al.* (2014c) estudaram a toxicidade dos produtos de degradação formados pela ozonização da AFB<sub>1</sub> em milho, utilizando células do carcinoma hepatocelular (HepG2) como modelo. Os autores relataram que os efeitos causados pelo milho contaminado e ozonizado não apresentaram diferença do milho livre de micotoxinas.

As diferentes técnicas utilizadas para avaliar a segurança do consumo de alimentos ozonizados demonstram que o processo de ozonização gasosa ou a água ozonizada utilizada para o tratamento de alimentos contaminados por micotoxinas são eficazes na descontaminação e não produzem produtos de degradação de toxicidade conhecida.

Tabela 10 - Resumo das condições experimentais utilizadas em algumas pesquisas para descontaminação de micotoxinas através da ozonização

<b>Alimento</b>	<b>Micotoxina</b>	<b>Condições</b>	<b>Nível de redução</b>	<b>Referência</b>
Amendoim	AFT	6,0 mg de O <sub>3</sub> /L por 30min	65,8%	Chen <i>et al.</i> (2014)
	AFB <sub>1</sub>		65,9%	
	AFB <sub>1</sub>	50 mg de O <sub>3</sub> /L por 60h	89,4%	Diao <i>et al.</i> (2013)
Castanha do Pará	AFT	14 mg de O <sub>3</sub> /L por 30 dias	100%	Giordano <i>et al.</i> (2010)
	AFB <sub>1</sub>		78,7%	
Farinha de milho	AFG <sub>1</sub>	75 mg de O <sub>3</sub> /L por 60min	73,7%	Luo <i>et al.</i> (2014b)
	AFB <sub>2</sub>		70,6%	
	AFT		30%	
Figo seco	AFT	21 mg/L por 96h	25%	Alencar <i>et al.</i> (2012)
	AFT	14 mg de O <sub>3</sub> /L por 30 dias	100%	Giordano <i>et al.</i> (2010)
Farinha de milho	AFB <sub>1</sub>	75 mg de O <sub>3</sub> /L por 60min	78,7%	Luo <i>et al.</i> (2014b)
	AFG <sub>1</sub>		73,7%	
Figo seco	AFT	13,8 mg de O <sub>3</sub> /L por 180min	95,2%	Zorlugenç <i>et al.</i> (2008)
	AFB <sub>1</sub>	Água ozonizada (1,71 mg/L) por 180 min	88,6%	
Pimenta em flocos	AFB <sub>1</sub>	66 mg de O <sub>3</sub> /L por 60min	93%	Inan <i>et al.</i> (2007)
Pistache	AFB <sub>1</sub>	9 mg de O <sub>3</sub> /L por 420min	23%	Akbas and Ozdemir (2006a)
	AFT		24%	
Grãos de trigo	AFB <sub>1</sub>	40 ppm por 20min	96,6%	El-Desouky <i>et al.</i> (2012)
	AFB <sub>1</sub>	60 µmol/mol por 180min	96,6%	Savi <i>et al.</i> (2014b)
	AFB <sub>2</sub>		84,5%	
	Citrinina	60 µmol/mol por 180min	75,27%	Savi <i>et al.</i> (2014c)
Suco de maçã	DON	60 µmol/mol por 180min	100%	Savi <i>et al.</i> (2014c)
	Patulina		12% de O <sub>3</sub> borbulhado no suco	100%

AF: Aflatoxinas. AFT: Aflatoxinas totais. DON: Desoxinivalenol.

#### 4. Aplicações do O<sub>3</sub> na redução de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Resíduos de agrotóxicos são quaisquer substâncias presentes nos alimentos, resultantes do uso de agrotóxicos, incluindo seus metabólitos, produtos de reação e outras impurezas, e que apresentem relevância toxicológica (FAO, 2001). O impacto na saúde humana devido ao uso dos agrotóxicos na agricultura tem aumentado nos últimos anos, devido as evidências dos efeitos tóxicos de tais substâncias e da alta exposição humana, tendo como consequência a ocorrência de diversas doenças crônicas, tais como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e desordens do sistema reprodutivo (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013; PARRÓN *et al.*, 2014).

Alimentos que contenham resíduos de agrotóxicos são fontes diretas de exposição para o homem e, mesmo que alguns processos industriais reduzam a concentração de tais substâncias, tais como a remoção de casca e cozimento dos alimentos, esses resíduos podem permanecer no produto final, representando um risco à saúde se ingeridos em altas concentrações, ou durante longo período de tempo (KAUSHIK *et al.*, 2009). Os LMP para resíduos de pesticidas em alimentos são regulamentados por diversos países, no entanto não existem normas harmonizadas a nível global (MALIK *et al.*, 2010). De forma geral, os países desenvolvidos possuem legislações mais restritivas do que os países em desenvolvimento e tal diferença pode ser considerada uma barreira técnica para comercialização e para a proteção da saúde pública (HANDFORD *et al.*, 2015).

Em anos recentes, novos métodos analíticos, tal como a espectrometria de massas, têm sido de grande importância na identificação e quantificação de tais substâncias em uma grande variedade de matrizes alimentícias (MALIK *et al.*, 2010; ROMERO-GONZÁLEZ, 2015). Através de tais métodos, os resíduos de agrotóxicos também têm sido identificados em sangue humano, urina, leite materno e cabelo por diversos autores, indicando uma alta exposição humana em nível mundial (EL-MORSI e RAHMAN, 2012; DEWAN *et al.*, 2013; YUSA *et al.*, 2015).

O número de estudos investigando o potencial do uso da ozonização na redução de resíduos de agrotóxicos em alimentos tem aumentado na última década, especialmente envolvendo o uso de água ozonizada para lavar vegetais e da ozonização gasosa para o tratamento de cereais. O princípio da degradação de tais resíduos pode ser explicado pelo efeito oxidante do O<sub>3</sub> na molécula dos agrotóxicos, onde através de reações seletivas (via direta), especialmente as envolvendo as duplas ligações de hidrocarbonetos, ou reações não seletivas (via indireta), tais as que envolvem radicais de alto potencial oxidante que atacam moléculas orgânicas e inorgânicas, degradam as moléculas de agrotóxicos, eliminando seu potencial tóxico (IKEHATA *et al.*, 2006; ORMAD *et al.*, 2008).

Para o tratamento de água potável, condições mais drásticas em termos de concentração e tempo de exposição podem ser aplicadas em relação ao tratamento de alimentos. Lafi and Al-Qodah (2006) estudaram a ozonização associada a radiação UV para o tratamento de água potável e reportaram 100% de degradação do inseticida deltamethrin e também 80% de redução de compostos halogenados e não halogenados. Ormad *et al.* (2008), investigaram a redução de 44 agrotóxicos pelo cloro e pelo O<sub>3</sub> e concluíram que o O<sub>3</sub> foi mais eficiente do que o cloro, eliminando 70% das substâncias estudadas, com a vantagem sobre o cloro de não formar compostos trihalometanos após o tratamento. Quando os autores incorporaram uma etapa de adsorção por carbono ativado junto da ozonização, os níveis de agrotóxicos em água reduziram 90%, demonstrando o alto potencial da ozonização quando aplicada junto de outras tecnologias para o tratamento de água potável.

Ikeura *et al.* (2011b; 2013), estudaram a aplicação de microbolhas de O<sub>3</sub> (<50 µm em diâmetro) em água a baixas concentrações (1 a 2 ppm) para lavar frutas e vegetais, concluindo que tal técnica foi altamente eficiente na rápida remoção de resíduos de diferentes tipos de

agrotóxicos. De acordo com os autores, as microbolhas de O<sub>3</sub>, são facilmente dissolvidas na água, formando grande quantidade de radicais hidroxil que são altamente eficazes na decomposição de moléculas orgânicas, ao contrário do O<sub>3</sub> que é altamente insolúvel em água.

Já a ozonização aplicada em alimentos, ao contrário da usada para tratamento de água, possui a limitação de não poder ser drástica devido as alterações na qualidade do alimento. Conseqüentemente, a otimização das condições de descontaminação deve ser estudada para cada alimento e para cada grupo de agrotóxico. Na Tabela 11 estão resumidas as condições utilizadas em pesquisas recentes envolvendo a ozonização para degradação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Tabela 11 – Resumo das condições experimentais utilizadas em estudos para degradação de resíduos de pesticidas em alimentos

<b>Alimento</b>	<b>Agrotóxico</b>	<b>Condições</b>	<b>Redução obtida</b>	<b>Referência</b>
Grãos de trigo	Fenitrothion	60 µmol/mol de O <sub>3</sub> por 180min	66,7%	Savi <i>et al.</i> (2015)
	Deltamethrin		89,8%	
Repolho branco	Chlorfluazuron Chlorothalonil	Água ozonizada, exposta a 250 mg de O <sub>3</sub> /h durante 15min	60% 55%	Chen <i>et al.</i> (2013)
Folhas de caqui	Fenitrothion	Microbolhas de O <sub>3</sub> em água a 2 ppm por 15min	56%	Ikeura <i>et al.</i> (2013)
	Benomyl		50%	
Frutas cítricas	Chlorothalonil	10 ppm de O <sub>3</sub> por 5min	100%	Kusvuran <i>et al.</i> (2012)
	Tetradifon Chloropyrifos		98,6% 94,2%	
Alface	Fenitrothion	Microbolhas de O <sub>3</sub> em água a 1 ppm por 5min	58%	Ikeura <i>et al.</i> (2011b)
Uvas de mesa	Fenhexamid	Fumigação por 1h (10 mL de O <sub>3</sub> /L)	68,5%	Gabler <i>et al.</i> (2010)
	Cyprodinil		75,4%	
	Pyrimethanil		83,7%	
	Pyraclostrobin		100,0%	
Couve	Diazinon	Água ozonizada de 1,4 a 2,0 mg/L por 30min	60 a 90%	Wu <i>et al.</i> (2007)
	Parathion			
	Methyl-parathion			
	Cypermethrin			

## 5. Alterações na qualidade dos alimentos devido a ozonização

Quando o O<sub>3</sub> é usado durante o armazenamento ou processamento dos alimentos objetivando a redução de micotoxinas ou resíduos de agrotóxicos, sua alta capacidade oxidante pode promover alterações indesejadas na qualidade do alimento. Frutas e vegetais são os mais afetados devido ao alto teor de umidade, enzimas e compostos fenólicos. Patil *et al.* (2010), borbilharam suco de maçã com 0,048 mg de O<sub>3</sub> por 10min e observaram alterações de cor e redução de compostos fenólicos. Os autores descreveram que o O<sub>3</sub> e os

radicais  $\text{OH}^\cdot$  gerados no processo podem degradar os anéis aromáticos dos compostos fenólicos e eliminar as duplas ligações de cadeias insaturadas, causando perda de cor.

Gabler *et al.* (2010) também observaram perda de cor e injúrias em uvas quando utilizadas água ozonizada a 5 mg/L por 1h no processo de higienização das frutas. Entretanto, é importante ressaltar que tais alterações negativas promovidas pelo  $\text{O}_3$  também ocorrem quando são utilizados outros agentes oxidantes, alguns exemplos são a perda de flavonoides em cebolas fatiadas lavadas com solução de hipoclorito de sódio (PÉREZ-GREGORIO *et al.*, 2011); escurecimento de folhas de alface devido ao uso de  $\text{ClO}_2$  (MAHMOUD *et al.*, 2008); e alterações de cor em pimentões vermelho e em morango devido a sanitização com solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ALEXANDRE *et al.*, 2012).

Diversos estudos envolvendo ozonização demonstraram que a ozonização pode causar perda significativa no teor de vitamina C. Beltrán *et al.* (2005), reportou perda de ácido ascórbico em alfaces quando foi utilizada água ozonizada a 20 mg/L para higienização das folhas. Tiwari *et al.* (2010) demonstrou perda semelhante e também redução no teor de antocianinas em suco de morango borbulhado com  $\text{O}_3$  a 7,8% durante 10min. Perda de ácido ascórbico e também de carotenoides foram descritas por Chauhan *et al.* (2011) quando utilizaram água ozonizada para lavar cenouras por 10min.

Por outro lado, Karaca e Velioglu (2014) utilizaram água ozonizada a 12 mg/L para higienização de folhas de alface e salsinha durante 15 min e não observaram alterações nos níveis de ácido ascórbico, clorofila, fenólicos totais e atividade antioxidante. Aguayo *et al.* (2013), também não reportaram alterações na qualidade de tomates fatiados quando utilizado água ozonizada a 0,4 mg/L para lavagem durante 3min. Tzortzakis *et al.* (2007) também não observaram alterações na qualidade de tomates armazenados por 6 dias a 1  $\mu\text{mol/mol}$  de  $\text{O}_3$ .

Alterações positivas na qualidade do alimento também podem ocorrer devido a ozonização, tal como descrito por Ali *et al.* (2014), quando armazenaram mamão em atmosfera contendo  $\text{O}_3$  a 2,5 ppm durante 10 dias. Maior teor de sólidos totais, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, licopeno e atividade antioxidante foram obtidos em relação ao controle. Resultados semelhantes foram descritos por Yeoh *et al.* (2014), quando utilizaram  $\text{O}_3$  a 9,2 mg/L durante 20 min para lavar fatias de mamão. Os autores observaram que o teor de fenólicos totais aumentou em cerca de 10% devido a ativação de determinadas enzimas que são estimuladas por diferentes fatores abióticos. No estudo, os autores relacionam tal aumento devido ao estresse promovido pelo  $\text{O}_3$ .

Quando aplicado em grãos de cereais, os efeitos do  $\text{O}_3$  podem ser observados na qualidade das farinhas obtidas a partir dos grãos ozonizados. Violleau *et al.* (2012) aplicaram 5 g de  $\text{O}_3/\text{Kg}$  de grãos de trigo e observou um aumento na força e diminuição da extensibilidade da massa, devido a oxidação do glúten, o qual interfere diretamente nas propriedades tecnológicas da farinha. Li *et al.* (2012), utilizaram 5 g de  $\text{O}_3$  durante 60min e reportaram aumento no tempo de desenvolvimento da massa e aumento na estabilidade da farinha, alterações que também ocorrem quando outros agentes oxidantes são utilizados, tal como o bromato de potássio e cloro. Sandhu *et al.* (2011) reportaram alterações semelhantes quando expuseram farinha de trigo a ozonização com 1500 mg de  $\text{O}_3$  por 45min. Nesse sentido, o  $\text{O}_3$  possui a vantagem de promover efeitos semelhantes aos outros agentes oxidantes, mas, sem deixar resíduos no alimento.

Sandhu *et al.* (2012) também reportaram que o uso de  $\text{O}_3$  em farinha de trigo, a 1500 mg/Kg durante 45min, resulta em despolimerização das amilopectinas de alto peso molecular, com consequente aumento em polímeros de baixo peso, o que pode ser útil quando são desejadas farinhas de baixa viscosidade, alta claridade e baixa estabilidade térmica.

De forma semelhante a que ocorre em frutas ricas em pigmentos, a ozonização também pode resultar na quebra de duplas ligações de carotenoides presentes na farinha de trigo, diminuindo sua cor naturalmente amarelada, tornando a farinha mais branca (SANDHU

*et al.*, 2011). Li *et al.* (2012a) reportaram esse efeito quando aplicaram 5 g de O<sub>3</sub>/h em farinha de trigo durante 60min, e sugeriu que a ozonização pode ser utilizada como um processo de clarificação da farinha de trigo.

Um efeito indesejável do O<sub>3</sub>, quando aplicado em farinhas, é a formação de um aroma indesejável após o processamento, devido a formação de compostos voláteis de baixo peso molecular, como descrito por Chittrakorn *et al.* (2014) e Li *et al.* (2012). Entretanto, de acordo com os autores, a aeração de farinha ou o armazenamento em condições de ventilação pode eliminar facilmente esse problema.

Em produtos de origem animal, o O<sub>3</sub> também pode ser aplicado para o controle de microrganismos sem promover alterações indesejadas na qualidade do alimento, tal como apresentado por Iacumin *et al.* (2012), que armazenaram salsichas em atmosfera contendo 1 ppm de O<sub>3</sub>. Kamotani *et al.* (2010) utilizaram 9,7% de O<sub>3</sub> em oxigênio durante 40min para processar ovos, como uma alternativa a pasteurização desse alimento, demonstrando que o processo não causou mudanças significativas nas características do produto, tendo ainda como vantagem o não uso do calor. Por outro lado, Uzun *et al.* (2012) observaram redução na solubilidade de proteínas do soro de leite e de clara de ovo, como consequência do uso de água ozonizada e da ozonização gasosa. Em tal estudo, o tratamento por O<sub>3</sub> afetou de forma negativa o poder emulsificante e reduziu a estabilidade dos isolados proteicos.

## **6. Perspectivas da ozonização aplicada no processamento de alimentos**

A partir da evolução nos estudos envolvendo a ozonização de alimentos, especialmente em relação aos estudos realizados na última década, mais pesquisas podem ser esperadas objetivando a integração da ozonização gasosa ou da água ozonizada nos sistemas tradicionais de processamento de alimentos, visando a remoção de resíduos e contaminantes, especialmente resíduos de agrotóxicos e micotoxinas. De fato, alguns estudos foram realizados recentemente com esse propósito e demonstraram resultados muito interessantes. Chauhan *et al.* (2011) estudaram a lavagem de cenouras com água ozonizada em diferentes condições, seguido de armazenamento em atmosfera controlada, demonstrando que o uso de tais tecnologias reduziu a lignificação e manteve a qualidade do alimento por 30 dias.

Chen *et al.* (2013) avaliaram os efeitos do processamento com ultrassom combinado com a água ozonizada na degradação de resíduos de agrotóxicos organofosforados em alface e obtiveram redução máxima de 82 % em tais substâncias, sem afetar negativamente a qualidade do vegetal

Puzyr *et al.* (2010) estudaram a eficácia da ozonização de aflatoxina B<sub>1</sub> seguida a adsorção por hidrosóis de nanodiamantes. De acordo com os autores, enquanto a ozonização degrada a micotoxina, o processo de adsorção remove os níveis remanescentes com alta eficácia, sendo tal sistema considerado pelos autores como uma nova ferramenta para a remoção de micotoxinas.

Dudziak (2012) avaliou a aplicação de um sistema integrado por uma etapa de ozonização, seguida de nanofiltração por membrana de acetato de celulose na remoção de zearalenona em água e demonstraram que com o uso combinado dessas tecnologias é possível obter 100% de remoção da micotoxina.

O O<sub>3</sub> possui ainda grande potencial para ser aplicado como substituto de agentes químicos tradicionalmente utilizados para sanitização de vegetais, processos de fumigação de grãos e no armazenamento de alimentos, especialmente pelo fato de não deixar resíduos nos alimentos após tais processos. Atenção especial para o uso do O<sub>3</sub> deve ser dada também para o processamento de alimentos orgânicos, pois, de acordo com o Departamento de Agricultura Americano (“US Department of Agriculture”), alimentos orgânicos podem ser tratados por ozonização, sendo o alimento processado ainda classificado como “100 % orgânico” ou

“orgânico”, dependendo da forma de aplicação do O<sub>3</sub> (USDA, 2011). Agências reguladora de alimentos de outros países não possuem regulamentos restritivos para o uso do O<sub>3</sub> nesse sentido, tornando seu uso muito promissor no setor de produtos orgânicos.

Devido ao aumento do interesse dos consumidores por novas tecnologias e, aos excelentes resultados promovidos pela ozonização na melhoria da qualidade dos alimentos, o desenvolvimento de novos equipamentos ozonizadores são esperados para o uso não apenas industrial, mas também doméstico. Dessa forma, mais pesquisas devem ser realizadas avaliando os efeitos da ozonização na remoção de outros resíduos e contaminantes alimentícios, a possível formação de resíduos tóxicos e os custos do processamento para que tal tecnologia seja difundida e aceita de forma mais prática pelos consumidores

## **7. Conclusão**

A percepção atual dos consumidores pela segurança dos alimentos, aliada a crescente preocupação em relação a presença de resíduos e contaminantes tem aberto novos campos de pesquisa para tecnologias emergentes de processamento dos alimentos. A ozonização gasosa ou aquosa é uma interessante tecnologia não térmica capaz de remover com grande eficácia resíduos de agrotóxicos e micotoxinas em diferentes tipos de alimentos. De acordo com as pesquisas recentes, através da relação “estrutura molecular/atividade tóxica” os compostos gerados pela degradação de agrotóxicos e micotoxinas, através da ozonização, não possuem relevância toxicológica. Os estudos utilizando experimentação animal também corroboram para tal conclusão. Alguns efeitos negativos da ozonização na qualidade do alimento, especialmente em vegetais frescos, são a redução de compostos fenólicos e de ácido ascórbico, inativação de algumas enzimas e alterações de cor; entretanto, com a otimização do processo para cada alimento, tais efeitos negativos podem ser reduzidos até níveis insignificantes. Mais estudos são necessários para que se conheça os efeitos do O<sub>3</sub> em outros grupos de micotoxinas e de resíduos de agrotóxicos, assim como a influência do processo na qualidade de uma variedade maior de alimentos.

## **CAPÍTULO V**

### **EFICÁCIA DA OZONIZAÇÃO NA REDUÇÃO DE MICOTOXINAS E FUNGOS EM GRÃOS DE TRIGO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS**

## Resumo

Os efeitos da concentração de O<sub>3</sub>, tempo de exposição e massa de grãos foram avaliados nos níveis de desoxinivalenol, aflatoxinas e contagem de fungos totais (CFT) em grãos de trigo, através de um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>. Amostras de grãos foram artificialmente contaminadas com padrões das micotoxinas e conídios de fungos, sendo então submetidas a diferentes condições de ozonização. As maiores reduções obtidas nos níveis de desoxinivalenol e aflatoxinas totais corresponderam a 64,3% and 48,0%, respectivamente. CFT teve redução de aproximadamente 3,0 log UFC/g de grãos. As variáveis concentração de O<sub>3</sub> e tempo de exposição influenciaram (p<0.05) positivamente as reduções de micotoxinas e CFT, enquanto a variável massa de grãos teve efeito negativo para ambas as respostas. A redução mais significativa na CFT e nos níveis de micotoxinas foram obtidas através do uso de 60 mg/L de O<sub>3</sub> durante 300min de exposição, utilizando 2 Kg de amostra. Conclui-se que a ozonização gasosa pode ser considerada um excelente método para diminuição da contaminação por micotoxinas e fungos filamentosos em grãos de trigo.

**Palavras-chave:** Ozonização. O<sub>3</sub>. *Triticum aestivum*. Desoxinivalenol. Aflatoxina.

## **Abstract**

The effects of O<sub>3</sub> concentration, exposure time and grain mass were evaluated on the levels of deoxynivalenol, aflatoxins and total fungal count (TFC) in wheat grains, using a full 2<sup>3</sup> factorial design. Grain samples were contaminated with fungal conidia and spiked with mycotoxins standards and then submitted to ozonation treatments. The most significant reductions obtained for deoxynivalenol and total aflatoxins corresponded to 64.3% and 48.0%, respectively. TFC reduced approximately 3.0 cycles log CFU/g of wheat grain. O<sub>3</sub> concentration and exposure time influenced (p<0.05) positively the reductions of both mycotoxins and TFC, while the grain mass had a negative effect on both responses. The most significant reduction in TFC and mycotoxin levels was achieved by using 60 mg/L of O<sub>3</sub> for 300 min, with 2 kg samples. Gaseous O<sub>3</sub> can be considered an excellent method for remediation of these contaminants in wheat grains.

**Key words:** Ozonation. O<sub>3</sub>. *Triticum aestivum*. Deoxynivalenol. Aflatoxin.

## 1. Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certos fungos filamentosos, tais como *Aspergillus spp.* e *Fusarium spp.* Esse fungos e suas toxinas podem contaminar grãos de cereais e outros alimentos quando imprópriamente armazenados (IARC, 2002; EFSA, 2013a). A presença de micotoxinas em alimentos é considerado um problema de saúde pública e tanto humanos quanto animais podem ser expostos a tais substâncias quando ingerem os alimentos contaminados (MARROQUÍN-CARDONA *et al.*, 2014; STOEV, 2015).

Um dos grupos de micotoxinas mais importantes, devido ao alto potencial tóxico, são as aflatoxinas. Duas espécies do gênero *Aspergillus*, *A. flavus* e *A. parasiticus*, são os maiores produtores de aflatoxinas (AF). As formas AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> são consideradas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer como agentes carcinogênicos (IARC, 2002). Alguns estudos recentes tem reportado altos níveis de aflatoxinas no trigo e em derivados comercializados em diferentes países (LUTFULLAH e HUSSAIN, 2012; IQBAL *et al.*, 2014).

As micotoxinas de *Fusarium*, tais como o desoxinivalenol (DON), são o grupo maior ocorrência no trigo e são comumente encontrados em altos níveis tanto nos grãos quanto nos derivados desse cereal (STANKOVIĆ *et al.*, 2012; JI *et al.*, 2014). DON não é classificado como genotóxico pela IARC mas é uma micotoxina associada com importantes efeitos tóxicos, tais como a inibição de síntese proteica, vômito, anorexia, disfunções endócrinas e imunossupressão (PESTKA, 2010; EFSA, 2013b).

A presença das micotoxinas nos grãos de trigo não são eliminadas no processo de moagem, sendo que o farelo permanece com maior concentração, já que esta ocorre em maior parte na superfície do grão, enquanto a farinha possui menores níveis (GIMÉNEZ *et al.*, 2013; TIBOLA *et al.*, 2015). Além da moagem, os tradicionais processamentos do grão para obtenção de derivados também não eliminam de forma eficaz a contaminação, como por exemplo a panificação e fabricação de macarrão (ZHANG; WANG, 2014), o cozimento da massa (BRERA *et al.*, 2013), o processo de extrusão (CASTELLS *et al.*, 2005) ou a fritura (SAMAR *et al.*, 2007).

Uma vez que não é possível eliminar totalmente a presença das micotoxinas nos grãos, o monitoramento e o controle dos níveis no alimento são de grande importância, sendo tais procedimentos realizados tanto por agências reguladoras quanto pelos produtores dos alimentos (CHELI *et al.*, 2014; CODEX ALIMENTARIUS, 2014).

A aplicação do ozônio (O<sub>3</sub>) no processamento de alimentos é uma tecnologia emergente que tem sido investigada para a degradação de micotoxinas devido a sua alta capacidade oxidante. O O<sub>3</sub> é reconhecido pelo FDA (“US Food and Drug Administration”) como agente antimicrobiano para o tratamento, armazenamento e processamento de alimentos (FDA, 2001) e, dessa forma, também tem sido aplicado em diversos processos objetivando eliminar ou reduzir bactérias e fungos presentes nos alimentos (ALWI e ALI, 2014; KYING e ALI, 2015). Sua alta capacidade oxidante é responsável por promover a degradação molecular das micotoxinas e, a eficácia de tal processo depende de alguns fatores, tais como o tipo de alimento, a concentração do O<sub>3</sub> e o tempo de exposição (DIAO *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2014a; LUO *et al.*, 2014b).

Esse trabalho teve como objetivo investigar a eficácia da ozonização, aplicada em diferentes condições de tempo de exposição, concentração e massa de grãos, nos níveis de DON, aflatoxinas e contagem de fungos totais (CFT) em grãos de trigo artificialmente contaminados.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Amostragem**

Amostras de grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) não limpos foram obtidos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) no Rio de Janeiro-RJ, sendo então armazenados a 5 °C até o início dos experimentos.

### **2.2. Reagentes e solventes**

Os padrões de DON, AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Acetonitrila e metanol grau CLAE foram obtidos da Tedia (São Paulo, SP, Brasil). Os demais solventes e reagentes utilizados para extração foram de grau analítico, obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ). Água ultra purificada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, MA, USA). Filtro de papel (nº1) foi adquirido da Whatman (Maidstone, UK) e membranas de filtração PVDF de 0,45 µm (Durapore® 13 mm, Millipore) foram adquiridas da Merck (São Paulo, Brasil). Meios de cultura MEA (Malt Extract Agar), DRBC (“Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol”), PDA (“Potato Dextrose Agar”) e pepetona bacteriológica utilizadas nas análises de fungos foram obtidas da Himedia (Curitiba, Paraná).

### **2.3. Contaminação artificial das amostras**

#### **2.3.1. Contaminação com micotoxinas**

Com o objetivo de obter altos níveis de micotoxinas nas amostras de grãos de trigo, para então estudar os efeitos da ozonização na redução da contaminação, amostras de grãos foram adicionadas dos padrões de DON e de aflatoxinas, separadamente. O padrão de DON (1 mg) foi diluído em metanol, obtendo-se solução correspondente a 40 µg/mL. Amostras de 30 g foram adicionadas de volume suficiente dessa solução para que a concentração final na amostra correspondesse a 1000 µg/Kg. As amostras contaminadas foram então embaladas em tecido de organza (100% poliamida) e mantidas a -3 °C até a realização dos experimentos de ozonização.

Os padrões das aflatoxinas B<sub>1</sub> (5 mg), B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (1 mg cada) foram diluídos em metanol. As soluções de trabalho (4 µg/mL) de cada aflatoxina foram utilizadas para a contaminação das amostras em níveis correspondentes a 50 µg/Kg de cada aflatoxina e, consequentemente, 200 µg/Kg de aflatoxinas totais (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>).

#### **2.3.2. Contaminação com fungos**

Os fungos *Fusarium spp.* e *Aspergillus spp.* foram isolados dos grãos de trigo e identificados a nível de gênero com auxílio de microscópio ótico (Olympus, BX51, Melville, USA), de acordo com o método proposto por Samson *et al.* (2010), utilizando os meios MEA e DRBC. As colônias isoladas foram inoculadas separadamente em tubos contendo ágar PDA e incubadas durante 5 dias a 25 °C para produção de biomassa fúngica. Após esse período, 3 mL de solução estéril Tween (0,01%) foi adicionada aos tubos e então agitado por 30 s para obtenção da suspensão de conídios, os quais foram quantificados através de câmara de Neubauer. Alíquotas suficientes da suspensão foram adicionadas em amostras de 25 g de

grãos, até concentração equivalente a  $1,0 \times 10^5$  conídios/g de grãos. As amostras foram então embaladas em tecido de organza e armazenadas a  $5^\circ\text{C}$  até serem realizadas as ozonizações.

## 2.4. Produção do $\text{O}_3$ e aplicação nos silos experimentais

Um ozonizador industrial baseado em descarga de corona (O&L 3.0 RM, Ozone&Life<sup>®</sup>, Brasil) foi utilizado para produção do  $\text{O}_3$ , utilizando como insumo para produção oxigênio de alto grau de pureza (99,99%). O  $\text{O}_3$  gerado foi então injetado nos silos experimentais (60 x 15 cm, altura x diâmetro) preenchido com os grãos, os quais foram suspensos a 10 cm da base através de tecido de organza. Sobre a massa de grãos foram colocados os pacotes contendo as amostras contaminadas por fungos e micotoxinas e então 500 g de grãos foram adicionados a fim de cobrir totalmente os pacotes. Na saída do sistema de ozonização o  $\text{O}_3$  foi neutralizado através do borbulhamento em três frascos contendo solução de iodeto de potássio (2%). Na Figura 7 está ilustrado o sistema de ozonização e seus componentes. Como amostras controle foi passado apenas o  $\text{O}_2$  pelos grãos, sem produção de  $\text{O}_3$ , utilizando o mesmo fluxo que nos tratamentos (0,5 L/min).

Uma vez que a produção de  $\text{O}_3$  pode variar de acordo com a pureza do  $\text{O}_2$  utilizado, estabilidade da corrente elétrica e outros fatores não previstos, para a confirmação da concentração apresentada pelo fabricante, foi utilizado o método iodométrico APHA (1998). A quantificação do  $\text{O}_3$  foi realizada após a saída do ozonizador, antes desse entrar nos silos experimentais.

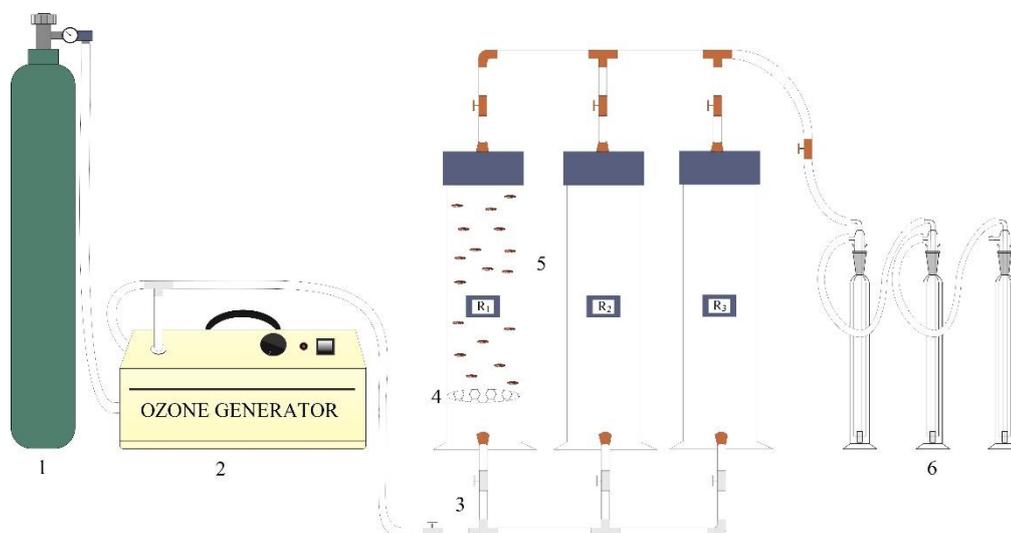


Figura 7 - Representação do sistema de ozonização utilizado no estudo. 1- Cilindro de  $\text{O}_2$ . 2- Gerador de  $\text{O}_3$ . 3- Representação das conexões (em cobre). 4- Suporte para sustentação dos grãos em tecido de organza. 5- Cilindros de armazenamento dos grãos. 6- Frascos contendo iodeto de potássio para neutralização do  $\text{O}_3$ .

## 2.5. Planejamento experimental

As ozonizações foram conduzidas através de um planejamento fatorial completo  $2^3$ , utilizando-se diferentes combinações das variáveis independentes: concentração de  $\text{O}_3$ , tempo de exposição e massa de grãos. Os níveis de aflatoxinas totais, DON e CFT foram selecionados como variáveis dependentes do processo. Três repetições foram incluídas no

ponto central, totalizando 11 tratamentos. Na Tabela 12 está apresentada a matriz do planejamento, contendo os valores reais e codificados das variáveis estudadas.

Tabela 12 - Matriz do planejamento fatorial completo com as variáveis reais e codificadas

Tratamento	Concentração de O <sub>3</sub> (mg/L)	Tempo de exposição (min)	Massa de grãos (Kg)
1	-1 (10)	-1 (120)	-1 (2)
2	-1 (10)	+1 (300)	-1 (2)
3	+1 (60)	-1 (120)	-1 (2)
4	+1 (60)	+1 (300)	-1 (2)
5	-1 (10)	-1 (120)	+1 (5)
6	-1 (10)	+1 (300)	+1 (5)
7	+1 (60)	-1 (120)	+1 (5)
8	+1 (60)	+1 (300)	+1 (5)
9	0 (35)	0 (210)	0 (3,5)
10	0 (35)	0 (210)	0 (3,5)
11	0 (35)	0 (210)	0 (3,5)

## 2.6. Efeitos da ozonização nos níveis de micotoxinas

### 2.6.1. Determinação de DON

Após a ozonização, as amostras de 30 g contaminadas com DON foram trituradas e 15 g foram pesados para as extrações da micotoxina, em duplicatas. A extração ocorreu de acordo com as recomendações do fabricante das colunas de imunoafinidade (IA) utilizadas para purificação dos extratos (DonTest<sup>®</sup>Wb, Vicam, Watertown, MA, USA), conforme apresentado em Cahill *et al.* (1999), com pequenas adaptações, como segue. Cada amostra de 15 g foi transferida para um frasco Erlenmeyer e então 60 mL de água foram adicionados e homogeneizado por 30min (Orbit Shaker 3520). O extrato obtido foi filtrado em filtro de papel, seguido de filtro com membrana de 0,45 µm de poro. Após filtração, 3 mL foram passados em coluna IA, procedendo-se de acordo com as recomendações do fabricante. A micotoxina foi eluída da coluna com acetonitrila e seca em fluxo de N<sub>2</sub>. Para injeção no sistema CLAE, 200 µL da fase móvel foi adicionado nos tubos contendo a micotoxina seca e então agitado por 30s em vórtex.

A quantificação do DON foi realizada em sistema CLAE (Waters) composto por detector de arranjo de diodos, com leitura a 218 nm, injetor Rheodyne (loop de 100 µL) e volume de injeção igual a 50 µL, coluna Ace C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel em modo isocrático, composta por água: acetonitrila (9: 1, v/v) em fluxo de 0,6 mL/min. Nessas condições o tempo de retenção (Tr) do DON correspondeu a 11,9 min. A curva analítica para quantificação foi construída utilizando 5 concentrações diferentes da micotoxina em fase móvel, correspondente à faixa de 192 a 1000 µg/Kg e valor R<sup>2</sup> igual a 0,994. Os ensaios de recuperação foram realizados em triplicatas, através de adição da toxina em concentrações de 250 e 1000 µg/Kg, obtendo-se valores correspondentes a 85,1 ± 8,7% e 91,7 ± 2,3%, respectivamente. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) corresponderam a 83,6 e 192,7 µg/Kg, respectivamente.

### **2.6.2. Determinação de aflatoxinas**

Os pacotes de grãos, contendo 60 g de amostras ozonizadas foram triturados e divididos em 30 g, em duplicatas, para extração das aflatoxinas. O método foi realizado de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) com pequenas adaptações, como segue. Cada amostra de 30 g foi transferida para um frasco Erlenmeyer e então 10 mL de água a 60 °C foi adicionado ao frasco e homogeneizado com auxílio de bastão de vidro. Após, 100 mL de clorofórmio foram adicionados ao frasco e homogeneizado por 30min em agitador tipo Shaker. O extrato foi filtrado em filtro de papel e 50 mL foram coletados e então evaporado até secar em banho maria a 65 °C. O extrato seco foi ressuscitado em 50 mL de metanol com banho de ultrassom (Thornton T7, São Paulo, Brasil), sendo então transferido para um funil de separação contendo 50 mL de solução salina (NaCl 4%, m/v). Foram adicionados ao funil 50 mL de hexano, com agitação por 30s, seguido de remoção da fase superior (hexânica). Essa etapa foi realizada novamente com mais 50 mL de hexano. Em seguida, 25 mL de clorofórmio foram adicionados ao funil, com agitação por 30s. A fase clorofórmica (inferior) foi recolhida e mais 25 mL de clorofórmio foi adicionado ao funil, com nova agitação por mais 30s. A fase clorofórmica foi recolhida, incorporada a inferior e então seca em banho maria a 65 °C com fluxo de ar. A derivatização das aflatoxinas ocorreu de acordo com o método AOAC (2005).

A quantificação foi realizada em sistema CLAE composto por detector de fluorescência (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Alemanha) a 365 nm de excitação e 450 nm de emissão, um injetor Rheodyne (20 µL), coluna C<sub>18</sub> (Ace, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel em modo isocrático, composta por água: metanol: acetonitrila (7: 2: 1, v/v/v) em fluxo de 1,0 mL/min. Nessas condições, o Tr correspondeu a 9, 13, 20 e 32min para as aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente. As curvas analíticas foram construídas com 5 pontos de concentração para cada uma das aflatoxinas, equivalentes a concentração variando de 1,2 até 50 µg/Kg. Os valores R<sup>2</sup> foram maiores que 0,99 para todas as aflatoxinas. Os experimentos de recuperação foram realizados a partir de adição das micotoxinas nos grãos em três níveis: 5, 25 e 50 µg/Kg, com resultados variando de 90 a 110%. O LD e LQ para as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> corresponderam a 0,6 e 1,2 µg/Kg e para as aflatoxinas G<sub>2</sub> e B<sub>2</sub> o LD e LQ corresponderam a 0,3 e 0,6 µg/Kg, respectivamente.

### **2.7. Efeitos da ozonização na CFT**

Para avaliar os efeitos da ozonização na redução fúngica, os pacotes contendo os grãos adicionados de conídios e ozonizados foram analisados de acordo com o método oficial para enumeração de fungos totais em alimentos, do MAPA (2003). Cada pacote contendo 25 g de amostra foi transferido para um frasco Erlenmeyer e adicionados de 225 mL de solução salina peptonada (0,1%). As amostras foram homogeneizadas por 60 s, correspondendo a diluição 10<sup>-1</sup>. A partir dessa diluição, foram preparadas as diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>, utilizando tubos de diluição contendo 9 mL de solução salina peptonada (0,1%). Alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas em superfície em ágar DRBC, sendo então incubadas por 5 dias a 25 °C em incubadora B.O.D. Após esse período, as colônias foram contadas e os resultados expressos como UFC/g de grãos e log UFC/g de grãos.

### **2.8. Teor de umidade e Atividade de Água (Aw)**

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método AACC (1981), utilizando 20 g de amostra triturada mantidas a 130 °C por 1h. A Aw foi verificada através do

equipamento Aqualab CX-2T (Decagon Devices Inc., USA), procedendo a análise conforme as recomendações do fabricante.

## 2.9. Análise estatística

A avaliação dos resultados obtidos do planejamento fatorial ocorreu através do software STATISTICA® 7.0, conforme Rodrigues e Lemma (2009) e Calado e Montgomery (2003). Para os demais resultados foi utilizado ANAVA e estatística descritiva, realizados no com auxílio do software Sisvar® 5.0.

## 3. Resultados

### 3.1. Efeitos da ozonização nos níveis de micotoxinas

Os valores de reduções nos níveis de micotoxinas foram diferentes nos 11 tratamentos avaliados. As reduções mais significativas nos valores de DON foram obtidas nos tratamentos 4, 8 e 3, nos quais foi utilizada a maior concentração de O<sub>3</sub> (60 mg/L). A maior redução nos níveis de DON e aflatoxinas totais foram obtidas no tratamento 4, com valores correspondentes a 64,3% e 48,0%, respectivamente. As maiores porcentagens de redução obtidas para as quatro aflatoxinas estudadas corresponderam a 54,4%, 63,2%, 40,3% e 34,0% para as aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente. A AFB<sub>2</sub> foi a menos influenciada pela ozonização, em todos os tratamentos. Na Figura 8 estão ilustradas as porcentagens de redução obtidas, considerando a amostra controle como 0% de redução.

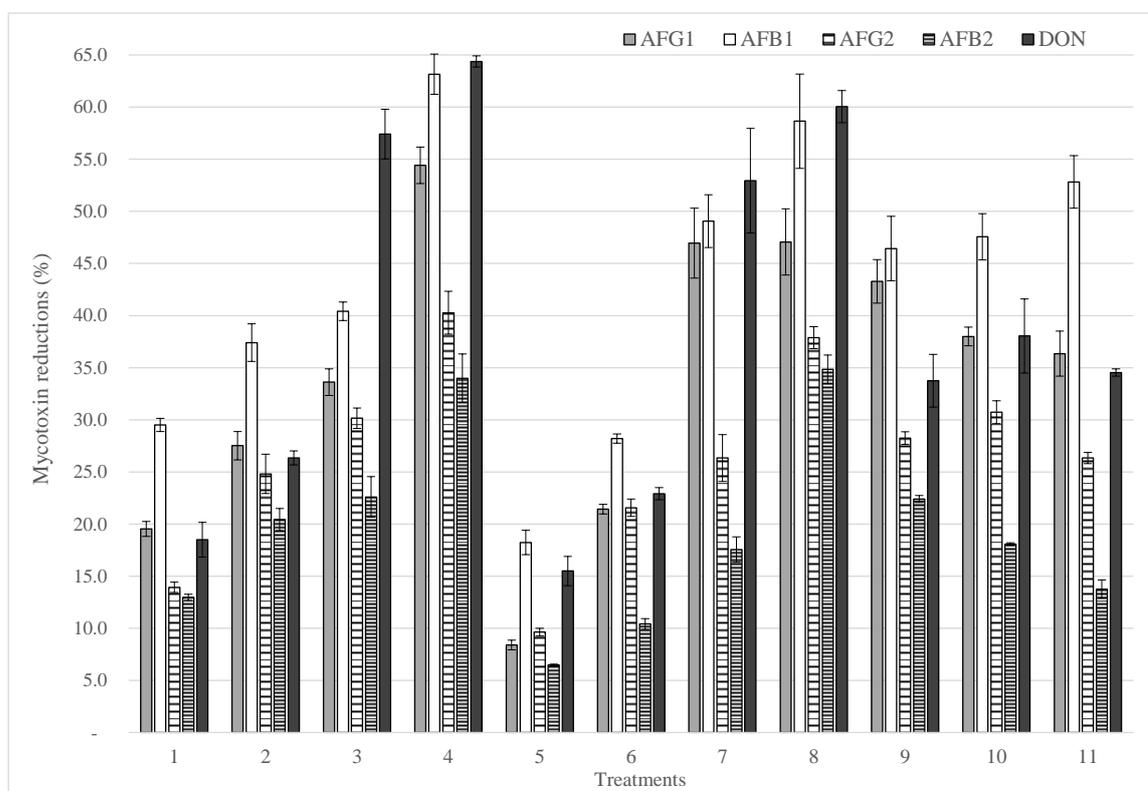


Figura 8 - Reduções dos níveis de aflatoxinas G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> e DON após ozonização das amostras de grãos de trigo.

Através do planejamento fatorial completo utilizado, foi possível estudar os efeitos de cada variável independente e suas interações nos níveis de reduções das micotoxinas após ozonização. Nas amostras contaminadas com DON e com aflatoxinas, a variável concentração de O<sub>3</sub> teve a maior influência nas reduções, seguida da variável tempo de exposição. Ambas variáveis tiveram influência positiva na redução das micotoxinas, ou seja, com o aumento da concentração e do tempo de exposição, aumentaram-se as reduções nos níveis das micotoxinas. Já a variável massa de grãos possui efeito negativo nas respostas, no entanto tal influência não foi considerada significativa nas condições experimentais utilizadas nesse estudo (p=0,150 para redução de DON e p=0,055 para redução de aflatoxinas totais). Na Figura 9 está representado o diagrama de Pareto demonstrando os termos considerados significativos para a redução das micotoxinas, de acordo com o teste de ANAVA.

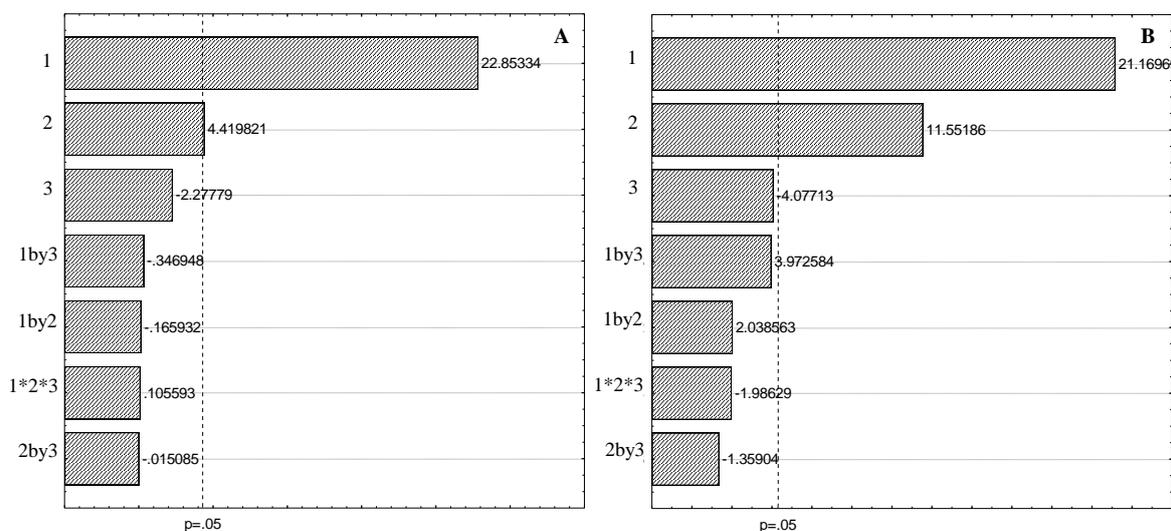


Figura 9 - Diagrama de Pareto para as variáveis A: DON (% de redução) B: Aflatoxinas totais (% de redução).

Conforme demonstrado no gráfico de médias apresentado na Figura 10-, tanto para o DON quanto para as aflatoxinas totais, as maiores reduções foram obtidas em regiões de maior concentração de O<sub>3</sub> (60 mg/L) e maior tempo de exposição (300min). A massa de grãos não influenciou na redução de DON e essa variável teve uma pequena influência (não significativa, p>0,05) na redução de aflatoxinas totais, apenas quando utilizada a menor concentração de O<sub>3</sub> (10 mg/L) e menor tempo de exposição (120min).

### 3.2. Efeitos da ozonização na redução fúngica

A CTF em amostras controle de grãos inoculados com conídios de *Fusarium spp.* e de *Aspergillus spp.* corresponderam a  $2,8 \times 10^5$  e  $4,5 \times 10^5$  UFC/g, respectivamente. Na Figura 5 estão apresentados os efeitos dos 11 tratamentos na redução fúngica. Os maiores valores de redução ocorreram no tratamento 4, com reduções correspondentes a 3,0 e 3,1 logs para amostras adicionadas de conídios de *Fusarium spp.* e de *Aspergillus spp.*, respectivamente. As contagens finais para tais amostras corresponderam a  $2,8 \times 10^2$  e  $3,7 \times 10^2$  UFC/g, respectivamente.

Em ambas as amostras, as variáveis concentração de O<sub>3</sub> e tempo de exposição influenciaram de forma significativa (p<0,05) e positiva a redução fúngica. Na ozonização das amostras adicionadas de conídios de *Fusarium spp.* a variável massa de grão também foi significativa (p<0,05) possuindo efeito negativo. Nas amostras adicionadas de conídios de

*Aspergillus spp.*, a contagem total após ozonização foi influenciada pela interação das variáveis concentração de ozônio e tempo de exposição (p-valor igual a 0,012). O gráfico de médias, apresentado na Figura 6 demonstra que as maiores reduções fúngicas foram obtidas quando utilizado alta concentração de O<sub>3</sub>, longo tempo de exposição e pouca massa de grãos, condições que são encontradas no ensaio 4.

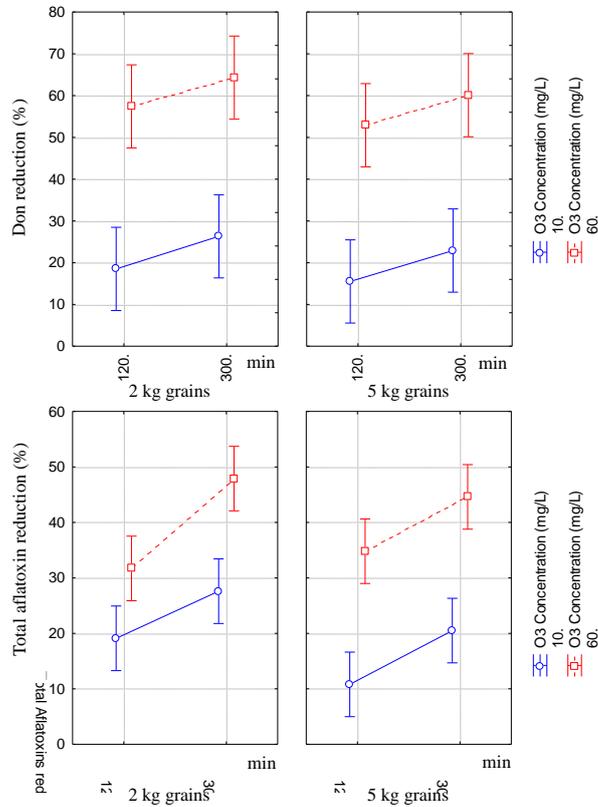


Figura 10 - Gráfico de médias para as reduções nos níveis de DON e aflatoxinas totais após exposição ao O<sub>3</sub>

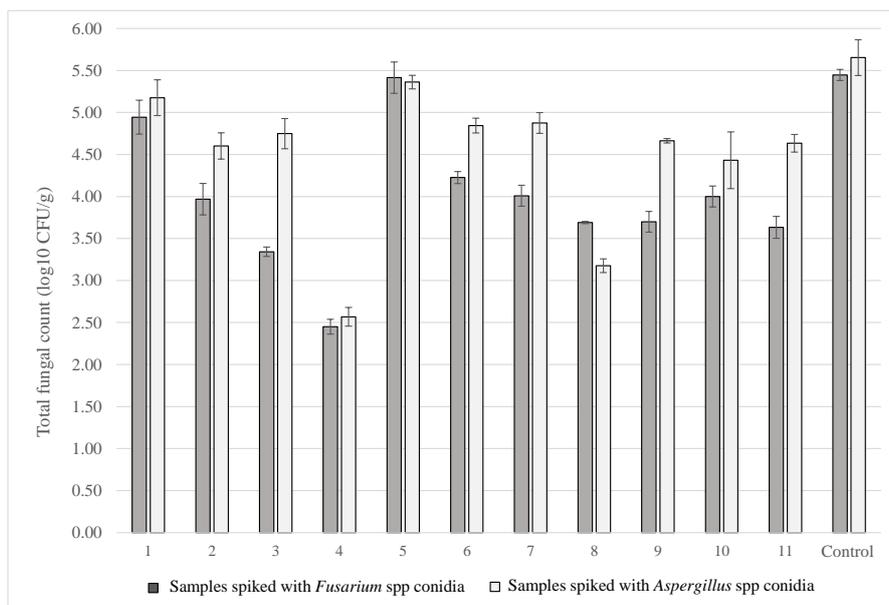


Figura 11 - Contagem de fungos totais em amostras de grãos de trigo após ozonização em diferentes condições.

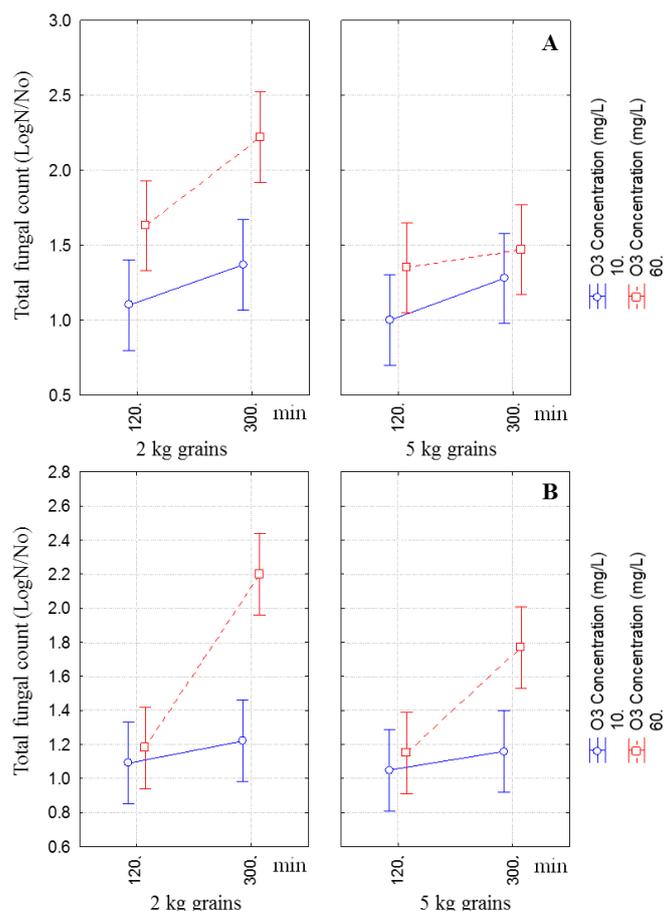


Figura 12 - Gráfico de médias para a redução de fungos totais em amostras contaminadas com conídios de *Fusarium spp.* (A) e *Aspergillus spp.* (B), após ozonização.

### 3.3. Efeitos da ozonização no teor de umidade e $A_w$

Os resultados de umidade nas amostras ozonizadas não diferiram entre si, possuindo média de 9,3% e, diferiram das amostras controle ( $p < 0,05$ ), as quais apresentaram valor médio de 11,3%. A  $A_w$  não apresentou alteração significativa após ozonização, com média geral correspondendo a 0,520.

## 4. Discussão

Nesse estudo, a variável que mais influenciou a degradação de micotoxinas e contagem de fungos foi a concentração de  $O_3$ , seguida do tempo de exposição. De acordo com Mendez *et al.* (2003), no início do processo de ozonização, o  $O_3$  reage com a massa de grãos e rapidamente se decompõe. Em uma segunda fase, o  $O_3$  se move livremente pela massa de grãos com baixa decomposição. Quando altas concentrações de  $O_3$  são utilizadas, juntamente com um alto tempo de contato, a reação com a massa de grãos é maior e conseqüentemente a degradação das micotoxinas e eliminação de fungos também serão maiores. Luo *et al.* (2014b), também concluiu que a degradação de aflatoxinas em milho aumentou quando níveis maiores de  $O_3$  e maior tempo de contato foram usados.

A massa de grãos é outra variável importante que afeta a ozonização. Conforme verificado por Steponavičius *et al.* (2012), a concentração de  $O_3$  diminui com o aumento

altura de uma massa de grãos, em uma relação proporcional. Tal fato explica o fato dessa variável ter possuído efeito negativo na redução de micotoxinas e fungos nesse estudo.

Através da combinação das três variáveis independentes estudadas, foi possível obter alta redução nos níveis de DON (64,3%). Em estudos similares, diferentes resultados foram descritos, e tais diferenças podem ser explicadas devido as diferentes condições experimentais utilizadas. Li *et al.* (2014), reportaram redução nos níveis de DON correspondente a 26,1% utilizando concentração de O<sub>3</sub> igual a 80 mg/L, durante 2 h de exposição e massa de 200 g de grãos. Níveis maiores foram descritos por Savi *et al.* (2014c), os quais descreveram valores de até 92,2% de redução ao utilizar O<sub>3</sub> a 60 µmol/mol durante 180 min em amostra de 350 g. El-Desouky *et al.* (2012), encontraram valores menores, correspondendo a 19,5%, utilizando 80 mg/L de O<sub>3</sub> por 2 h de exposição em amostra de 100 g. Entretanto, quando os mesmos autores aumentaram o teor de umidade de 9,5% para 17,0% os níveis de redução subiram para aproximadamente 60 %, demonstrando que a umidade dos grãos também é uma variável que influencia o processo de degradação da micotoxina, principalmente pelo fato de que, quanto maior o teor de umidade, maior é a formação de radicais hidroxil e, conseqüentemente, maior reação com a massa de grãos e com as micotoxinas.

Em relação aos efeitos do O<sub>3</sub> nos níveis de aflatoxinas, os resultados encontrados nesse estudo foram menores em relação aos valores de redução descritos por outros autores. Savi *et al.* (2014b), reportaram reduções de 94,6% e 84,5% para as aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente, quando utilizaram O<sub>3</sub> em concentração de 60 µmol/mol por 180 min e amostras contendo 350 g de grãos. El-Desouky *et al.* (2012), reportaram reduções em AFB<sub>1</sub> igual a 96,6%, utilizando 40 ppm de O<sub>3</sub> durante 20min em amostras com 500 g de grãos.

A maior redução nos níveis de B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> e maior estabilidade nos valores das aflatoxinas B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> encontrados no presente estudo podem ser explicados através do mecanismo de reação do O<sub>3</sub>, onde, a presença de uma dupla ligação nas moléculas de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> (ligação C8-C9) permite a quebra da estrutura molecular devido a oxidação com maior facilidade, ao contrário da AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> que não possuem insaturações na molécula, apresentando-se mais resistentes a ação do O<sub>3</sub> (CHEN *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2014b).

O efeito fungicida promovido pela ozonização pode ser verificado pela alta redução na CFT obtida nesse estudo, correspondendo a aproximadamente 3,0 ciclos log UFC/g de grãos. Efeitos semelhantes têm sido encontrados por outros autores, utilizando diferentes condições de ozonização de grãos de trigo e demonstrando que o O<sub>3</sub> também é efetivo para o controle de *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum* (SAVI *et al.*, 2014d), *Aspergillus parasiticus* (MOHAMMADI KOUCHESFAHANI *et al.*, 2015) *A. flavus*, e *P. citrinum* (SAVI *et al.* 2014b) e também na redução da contagem de fungos totais (ZHAO e LIU, 2007).

## 5. Conclusão

Utilizando diferentes condições de ozonização foi possível obter diferentes valores nas reduções de DON, aflatoxinas e fungos nas amostras de grãos de trigo ozonizadas. Quando a maior concentração de O<sub>3</sub>, maior tempo de exposição e menor massa de grãos foram utilizadas, maior foi o efeito fungicida e maiores reduções nos níveis de micotoxinas foram obtidos. Nesse estudo, a região ótima para tais reduções correspondeu a 60 mg/L de O<sub>3</sub> durante 300 min de exposição, utilizando 2 Kg de grãos, sendo possível obter reduções de 3,0 log UFC/g na contagem de fungos, 64,3% nos níveis de DON e 48% nos níveis de aflatoxinas totais. Esses resultados demonstram que a ozonização é uma metodologia muito promissora para a melhoria da qualidade dos grãos de trigo, efetivamente reduzindo a contaminação por fungos e micotoxinas.

## **CAPÍTULO VI**

### **EFEITOS DA OZONIZAÇÃO NAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS, QUÍMICAS E SENSORIAIS DE GRÃOS DE TRIGO (*Triticum aestivum*)**

## Resumo

O ozônio ( $O_3$ ) tem sido largamente aplicado na prevenção da contaminação de alimentos durante o armazenamento e processamento. O  $O_3$  é um poderoso agente oxidante, reconhecido como agente antimicrobiano utilizado no processamento de alimentos e água. Entretanto, dependendo das condições utilizadas, o  $O_3$  pode causar alterações na qualidade do alimento. Este estudo objetivou estudar a influência da ozonização na qualidade de grãos de trigo, quando expostos a diferentes valores de concentração de  $O_3$ , tempo de exposição e massa de grãos. Duas frações do grão foram avaliadas: A- farinha e B- farelo com gérmen. A qualidade da farinha foi avaliada através de farinografia e alveografia. A extração de farinha (%), número de quedas e valores de glúten também foram analisadas. A composição química e perfil mineral foram determinadas em ambas as frações. Uma avaliação sensorial foi aplicada para investigar possíveis diferenças no aroma e aparência geral da farinha. A variável concentração de  $O_3$  influenciou positivamente ( $p < 0,05$ ) a tenacidade e o número de quedas da farinha obtida a partir dos grãos ozonizados. Todos os demais parâmetros estudados não foram afetados pela ozonização ( $p > 0,05$ ). Esse estudo demonstra que a ozonização gasosa, quando aplicada nas condições experimentais investigadas, não causa impacto negativo na qualidade dos grãos de trigo.

**Palavras-chave:** Ozônio. Farinha de Trigo. Alveografia. Farinografia. Composição Mineral. Análise sensorial.

## **Abstract**

The use of ozone (O<sub>3</sub>) has been widely used to prevent contamination of food during storage or processing. O<sub>3</sub> is a powerful oxidizing agent and it is recognized as an antimicrobial agent for the processing of food and water. However, depending on the conditions used, O<sub>3</sub> may lead to negative changes in the food quality. This study aimed to evaluate the influence of gaseous ozonation on wheat grain quality when exposed to different levels of ozone concentration, exposure time and grain mass. Two fractions were evaluated: A- flour and B-bran plus germ. The quality of the wheat flour was analyzed with both alveography and farinography. The flour extraction rate, falling number and gluten contents were also measured. The chemical and mineral profile were determined in both fractions. A sensory evaluation was applied to investigate the possible differences in aroma or in overall appearance of the flour. Ozone concentration positively affected ( $p < 0.05$ ) the toughness and the falling number of the flour. Other parameters were not affected ( $p > 0.05$ ) by ozonation. This study demonstrated that gaseous ozonation when applied under the conditions studied does not cause any negative impact on the wheat quality.

**Keyword:** Ozone. Wheat flour. Alveograph. Farinograph. Mineral composition. Sensory analysis.

## 1. Introdução

O ozônio (O<sub>3</sub>) na forma de gás ou como água ozonizada tem sido largamente estudado para prevenir a contaminação dos alimentos durante o armazenamento e processamento. O O<sub>3</sub> é um potente agente oxidante e não deixa resíduos nos alimentos após sua utilização, devido a sua decomposição em O<sub>2</sub>, sendo reconhecido pelo FDA (US Food and Drug Administration) como agente antimicrobiano para o tratamento, armazenamento e processamento de alimentos e água (FDA, 2001; NAITO e TAKAHARA, 2006)

Os atuais equipamentos ozonizadores, baseados em descarga de coroa, permitem obter altas concentrações de O<sub>3</sub> a baixo custo, o que tem popularizado seu uso na área da ciência e tecnologia de alimentos. As principais aplicações da ozonização estão no processamento de frutas e vegetais (WEI *et al.*, 2007; ALEXOPOULOS *et al.*, 2013), sucos (GARCIA LOREDO *et al.*, 2015), pescados (CAMPOS *et al.*, 2005; CROWE *et al.*, 2012), queijos (CAVALCANTE *et al.*, 2013; SEGAT *et al.*, 2014) armazenamento de castanhas, grãos e derivados (FREITAS-SILVA *et al.*, 2013; MYLONA *et al.*, 2014; SAVI *et al.*, 2014b).

A ozonização gasosa é comumente utilizada em pesquisas para armazenamento de cereais. O O<sub>3</sub> injetado dentro dos silos de armazenamento, reage rapidamente com a massa de grãos, tendo rápida decomposição. Após a saturação parcial da massa e com um maior tempo de exposição, o O<sub>3</sub> passa livremente pelos grãos, podendo ser detectado na saída no sistema (MENDEZ *et al.*, 2003). A reação do O<sub>3</sub> com a massa de grãos depende de alguns fatores, sendo os principais a quantidade de grãos, a concentração do O<sub>3</sub> e o tempo de exposição do alimento ao processo (TIWARI *et al.*, 2010). A ozonização de grãos também pode ser realizada através da água ozonizada, como por exemplo em alimentos que necessitam de uma etapa de umidificação dos grãos antes do processo de moagem (IBANOĞLU, 2001).

As principais aplicações do processamento de alimentos com o O<sub>3</sub> têm sido o controle de pragas durante o armazenamento (SOUSA *et al.*, 2008), eliminação de fungos (WU *et al.*, 2006), degradação de micotoxinas (LI *et al.*, 2014a; MOHAMMADI KOUCHESFAHANI *et al.*, 2015) e degradação de resíduos de pesticidas (FAN *et al.*, 2015). Como o O<sub>3</sub> não deixa nenhum resíduo no alimento tratado, não existe necessidade de aeração após o tratamento. Por essa razão e, também, pelos excelentes resultados promovidos pela ozonização na melhoria da segurança do alimento, a ozonização é considerada uma “alternativa verde” para melhoria da qualidade dos alimentos (GREENE *et al.*, 2012).

Dependendo das condições utilizadas, o O<sub>3</sub> pode promover alterações positivas na qualidade dos cereais, tais como o aumento do volume de pães e bolos, aumento da tenacidade da claridade da farinha. No entanto, o O<sub>3</sub> também pode causar alterações indesejadas, tais como a oxidação lipídica, formação de aromas indesejáveis, degradação de pigmentos e modificações indesejáveis nas características viscoelásticas da farinha de trigo (TIWARI *et al.*, 2010). Por essas razões, a ozonização de alimentos não é universalmente benéfica e seus efeitos indesejados devem ser estudados a fim de conhecer as limitações dessa tecnologia.

Esse trabalho teve como objetivo investigar a influência da ozonização gasosa aplicada em diferentes condições nas características tecnológicas, composição química, composição mineral e características sensoriais de duas frações obtidas a partir do processamento dos grãos: A- farinha e, B- farelo com gérmen.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Amostragem**

Amostras de grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) foram obtidas como doação pelo MAPA (Rio de Janeiro), sendo manualmente homogeneizadas e armazenadas a 5 °C até o início dos experimentos.

### **2.2. Sistema de ozonização**

O ozônio foi obtido a partir de ozonizador industrial baseado em descarga de corona, conforme procedimento descrito no CAPÍTULO V, ítem 2.4. (Produção do O<sub>3</sub> e aplicação nos silos experimentais).

### **2.3. Planejamento experimental**

Com o objetivo de estudar os efeitos da ozonização da qualidade dos grãos, diferentes condições experimentais foram avaliadas. Para tal, um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> foi utilizado, sendo as variáveis independentes estudadas: X<sub>1</sub>- concentração de ozônio, X<sub>2</sub>- tempo de exposição e, X<sub>3</sub>- massa de grãos. O planejamento utilizado está descrito no CAPÍTULO V, ítem 2.5. (Planejamento experimental).

### **2.4. Moagem dos grãos**

Os grãos ozonizados foram armazenados a 5 °C durante 15 dias e então submetidos a moagem. Inicialmente, os grãos foram limpos em separador de impurezas Sintel (Intecnial, Erechim), utilizando amostras de aproximadamente 2 Kg e peneiras de 1,75 x 22 mm/4 x 10 mm. O peso do hectolitro dos grãos limpos foi verificado em balança Dalle Molle (Caxias, RS,) com sistema Schoper, de acordo com recomendações do fabricante. A Atividade de Água (Aa) foi avaliada utilizando equipamento Aqualab CX-2T (Decagon Devices Inc., USA) e o teor de umidade dos grãos analisados pelo método n°44-21 da American Association of Cereal Chemists (AACC, 2000a).

Previamente a moagem, os grãos foram acondicionados por 20h a 15% de umidade, através da adição de água destilada, de acordo com o método 26-20 da AACC (1961) A extração da farinha foi realizada em um moinho Quadrumat Senior (Brabender Inc., Duisburg, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante. Ao final do processo, duas frações de cada amostra foram obtidas para análises; A- farinha e B- farelo com gérmen. O percentual de extração foi calculado a partir da relação farinha obtida (g)/massa de grãos destinados a moagem (g) x 100. Ambas as frações obtidas foram armazenadas em sacos plásticos a 5 °C até a realização das análises de qualidade.

### **2.5. Efeitos da ozonização na qualidade tecnológica da farinha de trigo**

Objetivando avaliar se o processo de ozonização promoveu alterações nas características tecnológicas da farinha de trigo, análises de alveografia e farinografia foram realizadas. Os valores de glúten e de número de quedas também foram estudados. A alveografia foi avaliada utilizando alveógrafo MA82 (Chopin, Villeneuve-la-Garenne Cedex, França), através do método 54-30 da AACC (AACC, 1984), em acordo com as instruções do fabricante. Os parâmetros avaliados foram a força do glúten (W), tenacidade (P), extensibilidade (L) e relação P/L.

Para avaliar os parâmetros de absorção de água, tempo de chegada, tempo de desenvolvimento da massa, estabilidade e índice de tolerância à mistura, foi utilizando um farinógrafo 810101 (Brabender, Duisburg, Alemanha), com cuba misturadora de 50 g, de acordo com o método 54-21 da AACC (1982a).

O número de quedas (*falling number*) foi avaliado por determinador automático (Perten Instruments, Huddinge, Suíça), de acordo com o método 56-81B da AACC. (1982b)

Os valores de glúten úmido, seco e índice de glúten foram obtidos a partir dos equipamentos Glutomatic e Glutork (Perten Instruments, Huddinge, Suécia), de acordo com o método 38-12 da AACC (2000b).

## **2.6. Efeitos da ozonização nas propriedades químicas**

As frações obtidas a partir da moagem dos grãos foram analisadas a fim de verificar se o processo de ozonização promoveu alguma alteração nas propriedades químicas. As cinzas totais (resíduo mineral fixo) foram determinadas por analisador termogravimétrico TGA-2000 (Navas Instruments, Conway, USA) a 600 °C, até obtenção de peso constante. Nitrogênio total foi determinado em destilador Kjeldahl TE-0364 (Tecnallab, Piracicaba), e nitrogênio não proteico por precipitação com  $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$  e destilação Kjeldahl, de acordo com Lees e Salguero (1982). O teor de lipídios totais foi obtido em extrator XT 15 (Ankom Macedon, USA), de acordo com o método Am 5-04 da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2000a). O teor de fibras foi determinado por digestão com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e NaOH, de acordo com o método 978.10 e 962.09 da AOAC (AOAC, 2000c, 2000d). O teor de fitatos foi verificado de acordo com o método 986.11 da AOCS (AOCS, 2000b) e a acidez graxa foi determinada de acordo com o método 02-02A da AACC (AACC, 1995). Para determinação do pH foi utilizado um potenciômetro digital mPA-210 (TechnoPon, Piracicaba).

## **2.7. Efeitos da ozonização na composição mineral**

Os efeitos da ozonização no perfil de minerais de ambas as frações obtidas da moagem dos grãos foram verificados de acordo com o método proposto pela AOAC (2005), com adaptações de Felberg *et al.* (2009), através de digestão das amostras em tubos PTFE (Teflon® polytetrafluoroethylene) utilizando forno micro-ondas (Milestone, Sorisole, Italy). A quantificação foi realizada por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Os seguintes minerais foram determinados: Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu, P, Co, Cr, Mo, Se, Pb e Al.

## **2.8. Análises sensoriais e colorimétricas**

Um teste sensorial discriminatório baseado em diferença-do-controle foi utilizado para verificar possíveis alterações no aroma e na aparência geral da farinha, promovidos pela ozonização. Para tal, a amostra referência (controle), não ozonizada, juntamente de outras três amostras ozonizadas codificadas e uma amostra controle codificada, foram avaliadas por um painel de 25 provadores treinados. As amostras ozonizadas selecionadas foram provenientes do tratamento 5 (considerada baixa exposição ao  $\text{O}_3$ ), tratamento 9 (média exposição) e, 4 (alta exposição). Os provadores utilizaram uma escala estruturada, numerada de 1 a 5 para verificar se existiam diferenças entre as amostras codificadas e o controle, sendo 1 – nenhuma diferença; 2 – pouca diferença; 3 – moderada diferença; 4- muita diferença e; 5- extremamente diferente. Cada provador fez duas avaliações, totalizando 50 respostas. A realização desse estudo teve aprovação no comitê de ética da UFRRJ (número do processo 23083.000030/2015-33).

A análise de colorimetria da farinha foi realizada em colorímetro digital CR 400 (Konica Minolta, Japão) com sistema CIELAB, escala  $L^*a^*b^*$  e fonte de luz D65 (ângulo de observação de  $10^\circ$ ). Para cada amostra, cinco determinações foram realizadas. A calibração do equipamento foi realizada com disco branco (100). Ambas as avaliações colorimétricas e sensoriais foram conduzidas 15 dias após a ozonização dos grãos.

## 2.9. Análise estatística

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial foram analisados através do software STATISTICA<sup>®</sup> 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA), de acordo com recomendações de Rodrigues e Lemma (2009) e Calado e Montgomery (2003). Testes de ANAVA e Dunnett (bilateral) com 95% de confiança foram utilizados para verificar diferenças significativas entre amostras ozonizadas e amostras controle.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Efeitos da ozonização dos grãos nas propriedades tecnológicas da farinha

O peso do hectolitro dos grãos ozonizados não demonstraram diferença com o controle ( $p > 0,05$ ), indicando que o processo não influenciou na densidade e uniformidade dos grãos. O peso médio correspondeu a  $83,2 \pm 0,9$  Kg/hL.

A extração da farinha variou de 70,5 a 72,5% e não apresentou diferença após ozonização ( $p > 0,05$ ), indicando que o processo não interferiu na aderência do farelo com o endosperma. Ibanoglu (2002) e Paes *et al.* (2010) ozonizaram diferentes tipos de trigo e também não observaram diferença significativa nesse parâmetro.

Os resultados obtidos da alveografia demonstraram não haver diferença ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros L, P/L e W, os quais apresentaram médias correspondentes a  $61,8 \pm 7,6$  m/m,  $1,46 \pm 0,2$  e  $232,0 \times 10^{-4} \pm 21,9 \times 10^{-4}$  J, respectivamente. Entretanto, o parâmetro P, correspondente a pressão máxima necessária para expandir a massa, foi positivamente influenciado ( $p < 0,05$ ) pela variável  $X_1$ , conforme apresentado na Figura 1.

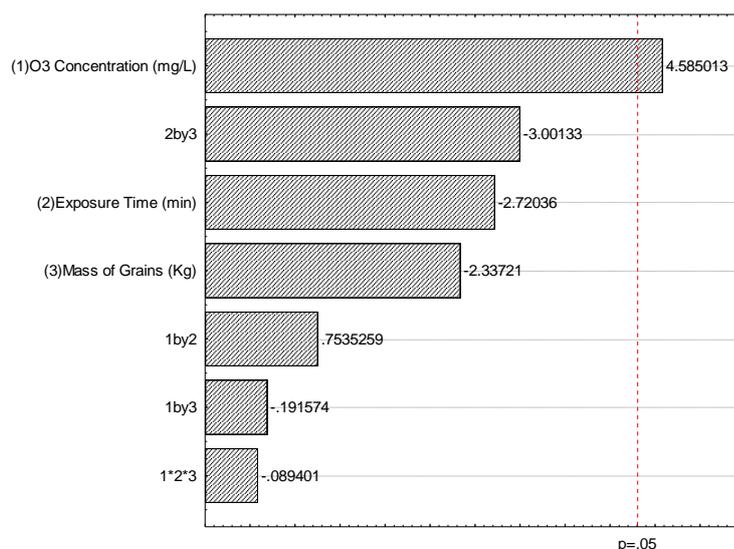


Figura 13 – Diagrama de Pareto para o valor de P (tenacidade) da farinha de trigo obtida a partir dos grãos ozonizados.

O menor valor de P foi obtido na amostra controle (71,5 m/m), enquanto o maior foi obtido no ensaio mais drástico de ozonização (tratamento 4), correspondendo a 99,0 m/m. O valor de P é uma medida da capacidade de absorção de água da farinha e é negativamente correlacionado com o aumento do volume do pão e com o valor de glúten úmido (Embrapa, 2009). Violleau *et al.* (2012) utilizaram um tratamento mais drástico com O<sub>3</sub> (5 g de O<sub>3</sub>/Kg grãos) e também observaram um aumento no valor P, bem como aumento de força (W) e diminuição da extensibilidade (L). Caballero *et al.* (2007) relacionam tais efeitos devido a oxidação da rede de glúten, o que ocorre também quando são utilizados outros agentes oxidantes, interferindo diretamente nas propriedades tecnológica da farinha, como por exemplo, aumentando a força e a tolerância a mistura, um fenômeno desejado pela indústria de panificação.

Apesar da influência no valor de P verificado pela alveografia, os resultados da farinografia demonstraram que a ozonização não promoveu alteração significativa ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros estudados. Os resultados médios obtidos corresponderam a  $44,2 \pm 0,73\%$  de absorção de água,  $1,46 \pm 0,13$  min de tempo de chegada,  $2,62 \pm 0,29$  min de tempo de desenvolvimento,  $4,40 \pm 0,61$  min de estabilidade e  $96,36 \pm 14,3$  BU de índice de tolerância a mistura. Li *et al.* (2012b) aplicaram 5 g de O<sub>3</sub> durante 60 min diretamente na farinha de trigo e verificaram que o tratamento promoveu aumento no tempo de desenvolvimento da massa e na estabilidade. De acordo com tais autores, o O<sub>3</sub> pode ser utilizado como agente oxidante da farinha ao invés do brometo de potássio ou do cloro, quando um aumento da força é desejado, sendo seu uso mais interessante por não deixar resíduos na farinha após o processo.

Sandhu *et al.* (2011) observaram alterações semelhantes quando expuseram farinha de trigo a 1500 mg de O<sub>3</sub> por 45 min; o tempo de chegada e tempo de desenvolvimento da massa aumentaram quando foi aumentada a exposição ao O<sub>3</sub>. Por outro lado, Paes *et al.* (2010) e Ibanoglu (2001) não relataram alterações nos parâmetros de alveografia, farinografia, composição química e número de quedas quando ozonizaram diretamente farinha de trigo.

O número de quedas da farinha é um valor que indica a intensidade da enzima alfa-amilase e, quanto maior o valor do número de quedas, menor é a atividade (Embrapa, 2009). No presente estudo, a variável concentração de O<sub>3</sub> afetou negativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade da alfa-amilase. O tratamento 4 foi o responsável por promover o maior valor no número de quedas, correspondente a  $536,5 \pm 4,9$ s, diferindo do controle e das demais amostras, as quais apresentaram valor médio correspondente a  $445,3 \pm 19,1$ s. A concentração de O<sub>3</sub> foi responsável por esse aumento, sendo observada quando alta concentração e alto tempo de exposição foram utilizados (condição similar ao tratamento 4), mas não influenciando significativamente ( $p > 0,05$ ) nos ensaios onde foram utilizadas a maior massa de grãos (5 Kg). A Figura 2 ilustra tais resultados.

Paes *et al.* (2010) aplicaram 0,02% de O<sub>3</sub> em ar, por 240h em farinha de trigo e não observaram alterações nos valores do número de quedas, assim como Ibanoglu (2001) quando utilizou água ozonizada a 11,5 mg de O<sub>3</sub>/L para acondicionar grãos de trigo.

Nesse estudo a ozonização não alterou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) os valores de glúten úmido, seco ou índice de glúten, com valores médios correspondentes a  $13,4 \pm 6,9$  g/100g;  $4,64 \pm 0,32$  g/100g e  $97,1 \pm 1,78\%$ , respectivamente. O glúten é formado pelas gliadinas e pelas gluteninas durante a mistura da farinha com água e é o principal responsável pelas características viscoelásticas da farinha, permitindo a produção de pães, macarrão e outros derivados (SONG; ZHENG, 2007). Li *et al.* (2014), utilizaram O<sub>3</sub> na concentração de 80 mg/L para ozonização de grãos de trigo durante 4 h e verificou que o valor de glúten úmido diminuiu, enquanto o índice de glúten aumentou após o tratamento. De acordo com os autores, a formação de pontes dissulfeto presentes na farinha de trigo são afetadas pelo O<sub>3</sub>, alterando a estabilidade da massa e suas características viscoelásticas.

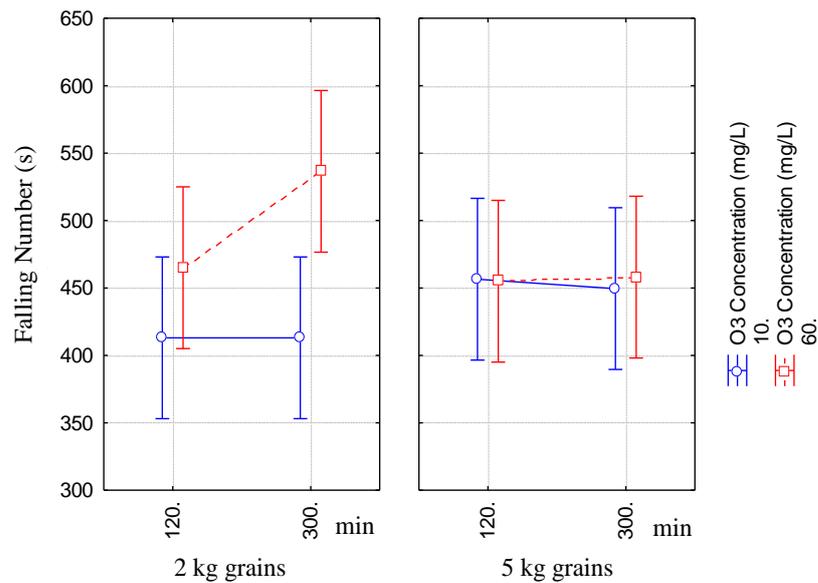


Figura 14 – Gráfico de médias para a variável número de quedas da farinha de trigo obtida a partir dos grãos ozonizados

### 3.2. Efeitos da ozonização na composição química e mineral

O farelo de trigo corresponde por aproximadamente 15% dos grãos (base seca), é rico em minerais, fibras insolúveis e seu consumo tem sido associado com a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, tais como o câncer de cólon, obesidade e constipação. A farinha consiste basicamente de amido e proteínas e o maior teor lipídico está presente no gérmen, apresentando predominância em ácidos graxos insaturados (ŠRAMKOVÁ *et al.*, 2009; STEVENSON *et al.*, 2012).

As frações do grão estudadas nessa pesquisa não foram influenciadas ( $p > 0,05$ ) pela ozonização em relação a composição química e mineral. Os resultados da composição química da fração A (farinha) corresponderam a:  $0,5 \pm 0,06$  g/100 g de cinzas totais;  $1,76 \pm 0,07$  g/100 g de nitrogênio total;  $0,03 \pm 0,008$  g/100 g de nitrogênio não proteico;  $0,5 \pm 0,01$  g/100 g de lipídios,  $0,20 \pm 0,04$  g/100g de fibras;  $1,55 \pm 0,12$  mg/g de fitatos;  $44,7 \pm 1,8$  mg KOH/100g of de acidez graxa (base seca) e pH igual a  $5,73 \pm 0,12$ . A fração B (farelo e gérmen) apresentou os seguintes resultados:  $4,19 \pm 0,21$  g/100 g de cinzas totais;  $2,52 \pm 0,04$  g/100 g de nitrogênio total;  $0,11 \pm 0,01$  g/100 g de nitrogênio não proteico;  $1,91 \pm 0,36$  g/100g de lipídios,  $6,54 \pm 0,42$  g/100g de fibras;  $24,9 \pm 1,2$  mg/g de fitatos e pH correspondendo a  $5,8 \pm 0,16$ .

A ozonização também não influenciou ( $p > 0,05$ ) os níveis de minerais em nenhuma das frações avaliadas. Os resultados médios para farinha corresponderam a: Na:  $5,65 \pm 0,4$  mg/Kg), K:  $1478,5 \pm 64,8$  mg/Kg, Mg:  $280,5 \pm 13,0$  mg/Kg, Ca:  $155,8 \pm 13,9$  mg/Kg, Mn:  $2,12 \pm 0,34$  mg/Kg, Fe:  $3,62 \pm 0,18$  mg/Kg, Zn:  $4,89 \pm 0,83$  mg/Kg, Cu:  $2,47 \pm 0,11$  mg/Kg, P:  $1187,4 \pm 54,2$  mg/Kg, Co: não detectado (Nd), Cr: não quantificado (Nq), Mo: (Nq), Se: Nq, Pb: Nd e Al: Nq. Na fração B os níveis dos minerais corresponderam a: Na:  $37,7 \pm 2,65$  mg/Kg, K:  $9501,5 \pm 35$  mg/Kg, Mg:  $3034,4 \pm 28,6$  mg/Kg, Ca:  $692,3 \pm 32,4$  mg/Kg, Mn:  $117,62 \pm 5,76$  mg/Kg, Fe:  $92,9 \pm 3,16$  mg/Kg, Zn:  $65,93 \pm 3,48$  mg/Kg, Cu:  $10,9 \pm 0,3$  mg/Kg, P:  $9472,8 \pm 68,3$  mg/Kg, Co: Nq, Co: Nq, Mo: (Nq), Se: Nq, Pb: Nq e Al:  $16,8 \pm 1,45$  mg/Kg.

Conforme observado nos resultados, a farinha (fração A) possui menores teores de minerais em relação a fração B, o que é atribuído a presença do gérmen e farelo na fração B, os quais são ricos em minerais. Após o processo de moagem dos grãos, tanto o farelo quanto o gérmen são removidos e a farinha permanece com pequenas quantidades de minerais (TANG *et al.*, 2008; CUBADDA *et al.*, 2009). Nesse estudo, os teores de minerais em ambas as frações avaliadas não foram influenciados por nenhuma das condições de ozonização avaliadas. Savi *et al.* (2014c) também demonstraram que a ozonização gasosa na concentração de 60 mg/L por até 120 min não afetou a qualidade de determinados atributos dos grãos de trigo, tais como alterações no amido, oxidação lipídica ou alterações no perfil proteico e na germinação dos grãos.

### 3.3. Resultados da avaliação sensorial e colorimétrica

Os resultados obtidos das avaliações sensoriais de aroma e aparência geral, realizadas nas amostras de farinha obtida a partir dos grãos ozonizados, não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) com a farinha obtida da amostra controle. Na Figura 3 estão apresentadas as médias obtidas.

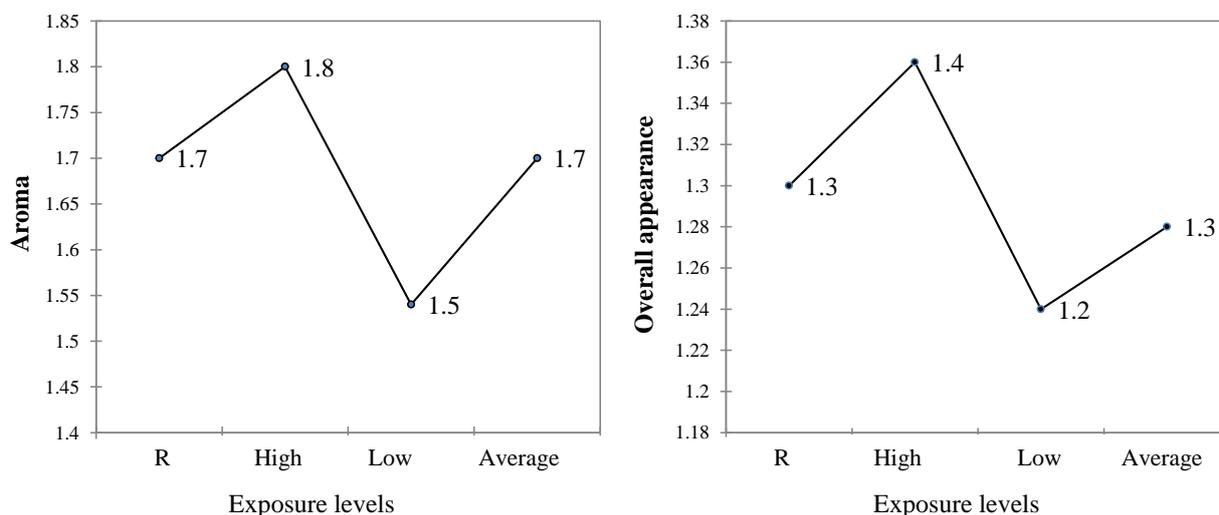


Figura 15 – Avaliação sensorial de aroma e aparência geral da farinha de trigo obtida a partir dos grãos ozonizados e da amostra controle (R).

Chittrakorn *et al.* (2014) e Li *et al.* (2012b) relataram a formação de um aroma indesejável na farinha de trigo, quando diretamente ozonizada. Entretanto, de acordo com os autores, tal problema pôde ser facilmente solucionado a partir da aeração da farinha ou utilizando armazenamento com ventilação. No presente estudo, tal alteração no aroma natural da farinha foi observado nos ensaios onde foi utilizada alta concentração de  $O_3$  (60 mg/L), diferindo do aroma das amostras não ozonizadas (não avaliado experimentalmente). No entanto, após o processo de moagem dos grãos, essa diferença não foi mais percebida, conforme comprovado no teste sensorial.

A ozonização também não influenciou ( $p > 0,05$ ) nos valores de colorimetria, o que corrobora com os resultados de aparência geral obtidos na avaliação sensorial. Os resultados médios obtidos corresponderam a:  $L^*$ :  $95,3 \pm 0,30$ ;  $a^*$ :  $-0,05 \pm 0,02$  and  $b^*$ :  $9,91 \pm 0,38$ . Alguns autores que ozonizaram diretamente a farinha de trigo descreveram que o processo promoveu a oxidação dos carotenoides presentes na farinha, os quais são responsáveis pela coloração levemente amarelada, resultado no decréscimo do valor de  $b^*$  e aumento da claridade ( $L^*$ ). Nesse sentido, a ozonização atua como um agente branqueador da farinha

(SANDHU *et al.*, 2011; CHITTRAKORN *et al.*, 2014). No presente estudo, a ozonização não promoveu tais alterações, o que pode ser atribuído ao efeito protetor ao endosperma, conferido pelas camadas externas dos grãos, uma vez que o O<sub>3</sub> não foi aplicado na farinha, mas sim nos grãos íntegros.

#### **4. Conclusão**

A ozonização é uma tecnologia emergente que tem sido aplicada para aumentar a qualidade de grãos de trigo, sendo aplicada especialmente no controle de pragas e microrganismos e na degradação de micotoxinas e resíduos de agrotóxicos. Esse trabalho demonstra que nas condições experimentais estudadas, utilizando O<sub>3</sub> na concentração de 10 a 60 mg/L, durante 2 a 5h de exposição e massa de grãos de 2 a 5 Kg, a ozonização não causa alterações negativas na qualidade dos grãos. Nessas condições, o peso do hectolitro, extração da farinha, valores de glúten, força, extensibilidade da massa, composição química, mineral e características sensoriais e colorimétricas permanecem similares ( $p > 0,05$ ) a amostra controle. Apenas a concentração de O<sub>3</sub> (variável X<sub>1</sub>) foi responsável por causar um aumento ( $p < 0,05$ ) na tenacidade e o número de quedas da farinha.

## **CAPÍTULO VII**

### **DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DESOXYNIVALENOL, DESOXINIVALENOL-3-GLICOSÍDEO E NIVALENOL EM GRÃOS DE TRIGO POR CLAREADAD COM PURIFICAÇÃO POR COLUNA DE IMUNOAFINIDADE**

## Resumo

Desoxinivalenol-3-glicosídeo (D3G) é uma micotoxina modificada, formada pelo metabolismo de algumas plantas através da conjugação do desoxinivalenol (DON) com a glicose. Os efeitos tóxicos do D3G na saúde humana e animal ainda estão sendo estudados e o desenvolvimento de metodologias práticas e confiáveis para sua determinação em alimentos, especialmente em cereais, é de grande importância. No presente estudo, uma metodologia para determinação simultânea de D3G, DON e também nivalenol (NIV) em grãos de trigo, utilizando purificação do extrato por coluna de imunoafinidade (IA), separação em coluna C18 e detecção por absorção ultravioleta (UV) foi otimizada e validada intralaboratorialmente. Os resultados demonstraram adequados valores de recuperação de D3G da coluna IA e de amostras adicionadas do padrão. Os valores de repetibilidade, linearidade, limites de detecção e quantificação (LQ) também foram adequados para a determinação das três micotoxinas. A faixa de aplicação do método variou de 47,1 até 1000 µg/Kg para D3G e de 31,3 até 1000 µg/Kg para o DON e NIV, com recuperações variando de 90,8% até 115,5%. Através da metodologia validada, alta incidência de D3G (41,2%, todas amostras < LQ) foi verificada em amostras comerciais de grãos de trigo e farinha de trigo integral ( $n = 17$ ). Em 100% das amostras positivas para D3G também foi detectado DON, indicando ocorrência simultânea dessas micotoxinas. Os níveis de DON variaram de 29,1 até 325,8 µg/Kg e NIV foi detectada apenas em 29,5% das amostras, com níveis variando de <LQ até 140,6 µg/Kg). Esse trabalho apresenta o primeiro método otimizado para determinação simultânea de NIV, D3G e DON através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) publicado até o momento.

**Palavras-chave:** Cereais. Micotoxina modificada. Tricotecenos. D3G. DON. Validação de metodologia.

## Abstract

Deoxynivalenol-3-glucoside (D3G) is a modified mycotoxin formed by the metabolism of plants through the conjugation of deoxynivalenol (DON) with glucose. Toxicology studies of D3G for human and animal health are still under investigation and the development of practical and reliable methods for its direct determination, especially in cereal matrices, are of great importance. In the present study, a methodology for simultaneous determination of D3G, DON and nivalenol (NIV) in wheat grains, using immunoaffinity column (IAC) cleanup, separation by C18 column and detection by ultraviolet (UV) absorption, was optimized and in-house validated. The results demonstrated adequate values of D3G recovery from IAC and spiked samples. Intraday precision, linearity, Limit of Detection and Limit of Quantification (LOQ) were also adequate for the determination of these mycotoxins. Range of applicability varied from 47.1 to 1000 µg/kg for D3G and from 31.3 to 1000 µg/kg for DON and NIV, with recovery ranging from 90.8 % to 115.5 %. A high incidence of D3G (41.2 %, all samples <LOQ) was verified in commercial samples of wheat grains and whole wheat flour (n =17). Also, the presence of D3G occurred simultaneously with DON in 100 % of the D3G positive samples. DON levels varied from <LOQ to 325.8 µg/kg and NIV was detected in only 29.5 % (from < LOQ to 140.6 µg/kg). To the best of our knowledge, this is the first method of simultaneous determination of NIV, D3G and DON by High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array detector (HPLC-PDA) reported until now.

**Keywords:** Cereal grains. Modified mycotoxin. Trichothecene. D3G. DON. Method validation.

## 1. Introdução

O trigo é o cereal mais cultivado no mundo e representa uma fonte essencial de nutrientes para o homem, contribuindo com aproximadamente 20 % do total de calorias consumidas mundialmente (SHIFERAW *et al.*, 2013). Os grãos de trigo integral e seus derivados integrais são fonte de fibra, vitaminas, minerais e de diversos compostos bioativos que são associados com a prevenção de algumas doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, obesidade e câncer (GIL *et al.*, 2011; BORNEO e LEÓN, 2012; WALTER *et al.*, 2013). Por outro lado, os grãos de trigo também podem ser fonte de micotoxinas, as quais são metabólitos tóxicos produzidos por fungos, representando um perigo devido aos diversos efeitos tóxicos que podem desencadear na saúde humana e animal (PITT, 1989; EFSA, 2012).

O principal fungo produtor de micotoxinas no trigo é o *Fusarium spp.*, que pode infectar a cultura do trigo e causar a fusariose da espiga, ou *Fusarium head blight*, uma doença de importância global e responsável por significantes perdas desse cereal (KAZAN *et al.*, 2012; McMULLEN *et al.*, 2012). A ocorrência da fusariose do trigo está relacionada com a contaminação dos grãos por algumas micotoxinas do grupo tricoteceno, principalmente o desoxinivalenol (DON) (STĘPIEŃ e CHEŁKOWSKI, 2010; DEL PONTE *et al.*, 2012; JI *et al.*, 2015). DON causa imunossupressão e induz patologias intestinais, aumentando a susceptibilidade a doenças entéricas infecciosas, estando ainda relacionado com efeitos no sistema nervoso central (BONNET *et al.*, 2012; PINTON e OSWALD, 2014). DON pode ser encontrado nos alimentos na forma livre, mas também conjugado com compostos orgânicos, tais como a glicose. Esse composto conjugado é denominado desoxinivalenol-3-glicosídeo e é sintetizado pelo metabolismo de algumas plantas como um mecanismo de resistência ao DON, sendo posteriormente armazenado pelo organismo da planta (BERTHILLER *et al.* 2005; 2009a).

Devido a presença da glicose na molécula de D3G, suas características químicas são diferentes do DON, tais como polaridade e solubilidade, tendo como consequência sua não detecção pelos tradicionais métodos de análise de micotoxinas, sendo por isso denominada de “micotoxina mascarada”, de acordo com a terminologia proposta por Gareis (1994), ou “micotoxina modificada”, conforme recentemente proposto por Rychlik *et al.* (2014). A atual preocupação em relação a presença de D3G nos alimentos é devido a possibilidade de ocorrer sua hidrólise durante o processamento dos alimentos, como por exemplo em processos fermentativos, ou, pelo metabolismo humano e animal, liberando seu precursor, o DON (DE ANGELIS *et al.*, 2014; DALL’ERTA *et al.*, 2013; GRATZ *et al.*, 2013).

Novas metodologias para determinar D3G em diferentes matrizes alimentares tem sido desenvolvidas e/ou otimizadas nos últimos anos. As principais são baseadas na quantificação por CLAE acoplado em espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM), possuindo a vantagem de ter um processamento mínimo das amostras, baixos LD e LQ e a possibilidade de obter informações estruturais dos compostos, tornando os resultados altamente confiáveis (BERTHILLER *et al.*, 2007; KÖPPEN *et al.*, 2010). No entanto, os equipamentos de EM são de alto custo e requerem analistas e manutenção altamente especializadas. Uma alternativa ao uso do EM é a determinação indireta de DON-conjugados, incluindo o D3G, através de hidrólise, com posterior quantificação por ensaio imunoenzimático (ELISA). Nos últimos 5 anos, três métodos de determinação indireta foram publicados na literatura, baseados no princípio de que o DON-conjugado pode ser quantificado separadamente do DON-livre após realização de hidrólise (LIU *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2007; TRAN e SMITH, 2011). Tal processo de hidrólise é considerado por esses autores como uma alternativa simples e barata para a determinação de DON-conjugados totais em cereais, especialmente pois em tais métodos é utilizada a quantificação por ELISA. Entretanto, Malachová *et al.* (2015),

publicaram recentemente uma avaliação crítica de tais métodos por determinação indireta, levantando dúvidas quanto a eficácia desses, já que, de acordo com os autores, nenhum deles foi capaz de liberar o DON das formas conjugadas e por esse motivo não podem ser utilizados para tais avaliações.

Uma outra metodologia de análise de D3G em cereais, utilizando CLAE com detecção por ultravioleta (UV) foi publicado por Geng *et al.* (2013), que utilizaram uma coluna cromatográfica de interação hidrofílica (HILIC) para separar o D3G após sua purificação por coluna de imunoafinidade (IA). Os autores compararam tal método com outro por EM e encontraram valores semelhantes, demonstrando que o método otimizado por CLAE-UV pode ser utilizado para determinação direta de D3G, com a desvantagem de quantificar apenas essa micotoxina e nenhum outro tricoteceno, tal como o DON.

No presente estudo, um método para determinação simultânea de DON, D3G e também nivalenol (NIV), utilizando purificação por coluna IA e detecção por CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD) foi otimizado e validado intralaboratorialmente. Em uma segunda etapa, o método foi aplicado em uma pesquisa limitada na determinação de micotoxinas em amostras comerciais de grãos e farinha de trigo.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Reagentes e padrões**

Os padrões NIV (1 mg), D3G (50 µg/mL em acetonitrila) e DON (1 mg) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). As soluções de trabalho (3 µg/mL de cada micotoxina) foram preparadas através de diluição em acetonitrila grau CLAE (Chem-Lab Nv Zedelgem, Bélgica). O metanol foi adquirido da Fisher Scientific (Loughborough, UK). A água ultrapura foi obtida em sistema de purificação Milli-Q® (Billerica, USA). Filtros de papel (qualitativo) foram adquiridos de Filtros Anovia (Barcelona, Espanha) e membranas de filtração de 0,45 µm (polipropileno) foram adquiridas da Whatman (Puradisc 25PP, 25 mm, Buckinghamshire, UK). Colunas de imunoafinidade DON-NIV™ WB foram adquiridas da Vicam (Watertown, USA).

### **2.2. Extração e purificação das amostras**

A extração das micotoxinas foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante das colunas IA, com pequenas adaptações, como segue. Os grãos de trigo foram triturados em processador doméstico (KRUPS 9000, Solingen, Alemanha) e 5 g foram transferidos para um tubo Falcon™ de 50 mL. Após, 20 mL de água foram adicionados e homogeneizado por 60 min com barras magnéticas. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 1000 g (centrífuga Sigma 4K 15, St. Louis, USA) e todo o sobrenadante foi filtrado em filtro de papel com auxílio de vácuo. Dez mL do filtrado foi misturado com 40 mL de tampão fosfato (PBS), sendo filtrado através de membrana 0,45 µm. Desse filtrado, exatos 12 mL foram passados na coluna IA. A coluna foi lavada com 10 mL de PBS, seguido de 10 mL de água. As micotoxinas foram eluídas utilizando 0,5 mL de metanol e mais 1,5 mL de acetonitrila, sendo coletados em tubos de 4 mL e evaporado em bloco térmico a 45 °C com fluxo de N<sub>2</sub>. Para injeção no sistema CLAE, 200 µL da fase móvel (10% acetonitrila em água) foi adicionado ao tubo, agitado por 1 min e então transferido para um *vial insert* com 0,25 mL de capacidade.

### 2.3. Análises por CLAE-DAD

As análises por CLAE ocorreram em um sistema Shimadzu (Kyoto, Japão) consistindo de um detector DAD SPD-M20A (escaneando de 190 a 400 nm), um injetor automático SIL-30AC (volume de injeção igual a 50 µL), um degaseificador DGU-20A5R, uma bomba LC-30AD, com fase móvel composta de 10 % acetonitrila em água, em modo isocrático, fluxo de 1 mL/min (pressão igual a 9,6 Mpa) e, um forno para coluna CTO-20AC (40 °C). A separação cromatográfica ocorreu em coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) Teknokroma LC2 (Barcelona, Espanha), partícula de 5 µm. O tempo de corrida correspondeu a 13 min para ambos os padrões e amostras.

### 2.4. Validação do método

#### 2.4.1. Retenção das micotoxinas pela coluna IA

A primeira etapa da validação do método foi a avaliação da capacidade da coluna IA em reter o D3G, uma vez que o fabricante apenas apresenta os valores para DON e NIV (descrito como maior que 99% para ambas micotoxinas quando passados 0,125 µg de cada, diluídas em PBS). Dessa forma, uma alíquota de cada micotoxina (NIV, D3G and DON) foi adicionada em um frasco âmbar e seca em bloco térmico a 45 °C utilizando fluxo de N<sub>2</sub>. Após, 12 mL de PBS foram adicionados ao frasco, agitado e então passado na coluna de IA. A coluna foi lavada com PBS e água e as micotoxinas foram eluídas com metanol e acetonitrila e, por último, secas e ressuspendidas com 200 µL da fase móvel, conforme previamente descrito. Dois níveis diferentes foram investigados, 0,06 µg e 0,6 µg, correspondendo a contaminações nas amostras de grãos de trigo equivalentes a 100 e 1000 µg/Kg, respectivamente. Nessas condições, se uma amostra de grãos de trigo possuir 1000 µg/Kg de cada uma das micotoxinas avaliadas, a massa total de micotoxinas passada na coluna IA corresponderá a 1,8 µg e, dessa forma, 90% da capacidade da coluna (2 µg) será utilizada. Optou-se por não utilizar 100% da capacidade da coluna IA devido a possibilidade de essa reter outras micotoxinas de menor ocorrência no trigo, tais como o 3-acetildesoxinivalenol (3ADON) e o 15-acetildesoxinivalenol (15ADON) (ambos não investigados nesse trabalho).

#### 2.4.2. Recuperação das micotoxinas nas amostras de grãos

Os estudos de recuperação foram realizados através da adição de NIV, D3G e DON nas amostras de grãos de trigo. Cinco g de amostra foram adicionadas das micotoxinas em triplicatas para nas concentrações equivalentes a 100, 500 e 1000 µg/Kg. As amostras contaminadas foram mantidas a temperatura ambiente por 12h até a realização das extrações. Os valores obtidos após as determinações foram considerados adequados quando na faixa de 60 a 120 % (EC 401/2006).

#### 2.4.3. Curvas analíticas, Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ)

As curvas analíticas para NIV, D3G e DON foram construídas com sete pontos de concentrações diferentes dos padrões diluídos na fase móvel (10% acetonitrila), variando de 0,0625 até 3,0 µg/mL. Os LD e LQ foram determinados pela relação sinal/ruído de 3 x e 10 x, respectivamente, a partir dos cromatogramas das amostras adicionadas de micotoxinas.

#### 2.4.4. Otimização cromatográfica

Com o objetivo de detectar de forma seletiva as três micotoxinas em um único cromatograma e, principalmente, obter adequada separação de D3G do DON, diferentes condições de fase móvel, fluxo, coluna e temperatura do forno foram avaliadas. Para tal, um extrato de amostra adicionada das três micotoxinas foi injetado em três colunas cromatográficas: uma coluna Kinetex UHPLC HILIC 100 mm x 4,6 mm (partícula de 2,6 µm) (Phenomenex, Torrance, USA), com fase móvel composta de ACN: H<sub>2</sub>O ou MeOH: H<sub>2</sub>O de 85:15 (v/v) até 95:5 (v/v), com fluxo variando de 0,2 mL/min até 0,6 mL/min; uma coluna Kinetex UHPLC C18 100 mm x 3,0 mm (partícula de 2,6 µm) (Phenomenex, Torrance, USA), com fase móvel composta de ACN: H<sub>2</sub>O ou MeOH: H<sub>2</sub>O em proporção de 5:95 (v/v) até 15:85 (v/v), com fluxo de 0,2 mL/min até 0,6 mL/min, e; uma coluna Teknokroma LC2 HPLC C18 250 mm x 4,6 mm (partícula de 5 µm) (Barcelona, Espanha), com fase móvel composta de ACN: H<sub>2</sub>O ou MeOH: H<sub>2</sub>O, na proporção de 5:95 (v/v) até 15:85 (v/v), em fluxo de 0,6 mL/min até 1,5 mL/min. A influência da temperatura do forno da coluna foi avaliada para as três colunas, variando de 20 até 45 °C. O comprimento de onda para leitura das micotoxinas foi investigado de 218 nm até 222 nm objetivando obter o maior valor de área de pico para cada uma das micotoxinas avaliadas.

### 2.5. Determinação de micotoxinas em amostras comerciais de trigo

O método otimizado e validado intralaboratorialmente foi aplicado em uma pesquisa limitada para investigar a presença de NIV, D3G e DON em 17 amostras de grãos de trigo integral ( $n = 13$ ) e farinha de trigo integral ( $n = 4$ ) (elaboradas com 100 % de grãos triturados) ( $n = 4$ ) naturalmente contaminadas. As amostras foram adquiridas durante 2015 em diferentes lojas de alimentos na cidade de Braga, Portugal. Embalagens dos produtos contendo de 500 a 1000 g foram coletados e transportados para o laboratório, sendo mantidos a temperatura ambiente até o momento das análises. Para a extração das micotoxinas, as amostras de grãos foram trituradas e 50 g foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. A esses, 200 mL de água foram adicionados e homogeneizado por 60 min com barras magnéticas. A partir desse extrato foram coletados 25 mL e transferido para um tubo Falcon<sup>TM</sup> de 50 mL, procedendo-se conforme previamente descrito nos ensaios de validação. As determinações de micotoxinas nas amostras comerciais foram realizadas com a limitação de apenas uma replicata.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Otimização e validação do método

Para que fosse obtida a melhor separação de NIV, D3G e DON, três colunas foram avaliadas, uma coluna HILIC (UHPLC), uma coluna C18 (UHPLC) e uma coluna C18 CLAE. Na coluna HILIC a melhor condição para determinar D3G foi obtida utilizando fase móvel ACN: H<sub>2</sub>O (93: 7, v/v), em fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 25 °C e tempo de corrida igual a 7 min. No entanto, nessas condições DON e NIV tiveram baixa interação com a coluna e não puderam ser quantificadas com confiança. Na coluna UHPLC C18, as três micotoxinas foram separadas utilizando a fase móvel ACN: H<sub>2</sub>O (10: 90, v/v) a 0,6 mL/min, volume de injeção igual a 20 µL e forno em 25 °C. Entretanto, os interferentes presentes na matriz não permitiram a identificação de todas as micotoxinas de forma seletiva. A melhor condição para separação das três micotoxinas foi obtida utilizando a coluna C18 tradicional, com fase móvel composta por ACN: H<sub>2</sub>O (10: 90,

v/v/), a 1 mL/min, volume de injeção igual a 50 µL e forno a 40 °C. Nessas condições, os tempos de retenção (Tr) corresponderam a 5,7 min, 8,7 min e 10,1 min para NIV, D3G e DON, respectivamente (Figura 16).

O uso de colunas IA para a purificação de extratos contendo micotoxinas tem como vantagem a melhoria da seletividade do método, através da remoção de interferentes, além de promover a concentração das micotoxinas, tendo como consequência a diminuição dos LD e LQ. A reação cruzada dos anticorpos presentes na coluna IA com a micotoxina modificada depende do tipo de anticorpo imobilizado, sendo os de alta reação cruzada desejados para análise das formas conjugadas devido a maior retenção desses pela coluna (GORYACHEVA e DE SAEGER, 2012). Até a realização dessa pesquisa, a coluna IA DON-NIV<sup>TM</sup> não tinha sido avaliada quanto a percentagem de recuperação de D3G. Os resultados desse teste demonstraram que é possível obter bons valores de recuperação das três micotoxinas estudadas pela coluna IA, variando de 90,8% até 115,5%, conforme apresentado na Tabela 13. Dessa forma, a coluna IA DON-NIV<sup>TM</sup> pode ser considerada adequada para purificação e concentração de NIV, D3G e DON em grãos de trigo, com posterior quantificação por CLAE-DAD ou mesmo por sistemas EM.

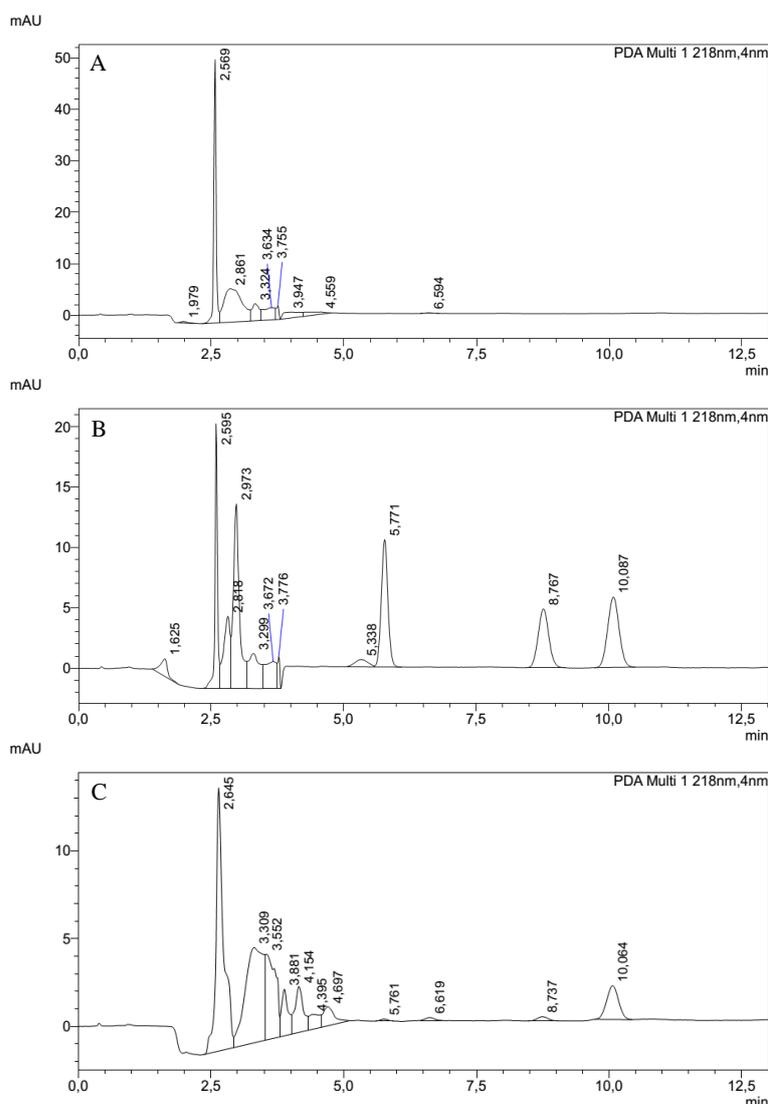


Figura 16 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em amostras de grãos de trigo A – amostra branco; B – amostra adicionada de 500 µg/Kg de cada micotoxina e; C – ocorrência natural das três micotoxinas em amostras comerciais (NIV e D3G abaixo do LOQ; DON

correspondeu a 195,8 µg/Kg). Tempos de retenção corresponderam a 5,7; 8,7 e 10,1 min para NIV, D3G e DON, respectivamente.

Tabela 13 – Percentagem de recuperação de NIV, D3G e DON pela coluna IA

Massa de micotoxina passada na coluna IA	Equivalência no método	Recuperação (CV %)
0,06 µg de cada	100 µg/Kg de cada micotoxina	NIV: 115,5% (8,2) D3G: 99,3% (5,5) DON: 97,5% (11,0)
Σ = 0,18 µg	300 µg/Kg de cada micotoxina	Total recuperado: 104,1% (7,2)
0,6 µg de cada	1000 µg/Kg de cada micotoxina	NIV: 90,8% (14,3) D3G: 93,0% (7,7) DON: 94,5% (4,5)
Σ = 1,8 µg	3000 µg/Kg de cada micotoxina	Total recuperado: 92,8% (8,5)

Com o objetivo de avaliar a exatidão e precisão do método otimizado, NIV, D3G e DON foram adicionados em grãos de trigo e então submetidos aos processos de extração e purificação. Os resultados apresentados na Tabela 14 demonstraram adequados valores para tais parâmetros, variando de  $84,7 \pm 7,2\%$  até  $112,3 \pm 8,1\%$ . O LD correspondeu a 9,4 µg/Kg para NIV e DON e, 14,1 µg/Kg para D3G, enquanto o LQ correspondeu a 31,3 µg/Kg para NIV e DON e, 47,1 µg/Kg para D3G.

Tabela 14 - Recuperações e CV % de amostras de grãos de trigo adicionadas de NIV, D3G e DON, em diferentes níveis

Micotoxina	Nível de adição (µg/Kg)	Recuperação média (%) ± CV %	CV %
NIV	100	109,4 ± 3,6	3,6 %
	500	88,0 ± 11,7	13,3%
	1000	100,3 ± 10,7	10,7 %
D3G	100	95,2 ± 17,1	18,0 %
	500	94,7 ± 14,0	14,8 %
	1000	84,7 ± 7,2	8,5 %
DON	100	112,3 ± 8,1	7,2 %
	500	99,7 ± 9,5	9,6 %
	1000	94,1 ± 5,5	5,8 %

DON é a única micotoxina, dentre as estudadas nessa pesquisa, que é regulamentada para presença em alimentos. O FDA (U.S. Food and Drug Administration) definiu o limite para presença em cereais destinados a alimentação humana de 1000 µg/Kg (FDA, 2011), enquanto na União Europeia esse limite varia de 200 µg/Kg para produtos destinados a alimentação infantil e de 1750 µg/Kg para produtos não processados (EC, 2006b). No Brasil os limites são de 1000 µg/Kg para trigo integral e 750 µg/Kg para farinhas refinadas. Baseado em tais valores, os LQ encontrados nesse trabalho podem ser considerado adequados para a pesquisa dessas micotoxinas em amostras de grãos de trigo. Diferentes valores de LQ para determinação de D3G em amostras cereais, através de CLAE-EM têm sido reportados na

literatura nos últimos anos, como por exemplo, 5 µg/Kg no método utilizado por Škrbić *et al.* (2011) e 100 µg/Kg, conforme descrito por Vendl *et al.* (2010). Geng *et al.* (2013), também utilizaram um método para quantificação de DON por absorção UV e reportou um LQ menor do que o encontrado nesse método, correspondendo a 25 µg/Kg, no entanto, o método foi utilizado para quantificar apenas DON.

As curvas analíticas para todas as micotoxinas apresentaram valores de R<sup>2</sup> maiores do que 0,999 (Tabela 15) e, as maiores áreas dos picos foram obtidas utilizando absorção a 218 nm, conforme apresentado na Figura 17.

Tabela 15 - Curva analítica, equação e valor do R<sup>2</sup> para NIV, D3G e DON

Micotoxina	Curva analítica (µg/mL)	Equação	R <sup>2</sup>
NIV	0,0625 – 3,0	y= 52306x – 679,31	0,9999
D3G		y= 40604x – 105913	0,9999
DON		y= 52954x – 1068,7	0,9991

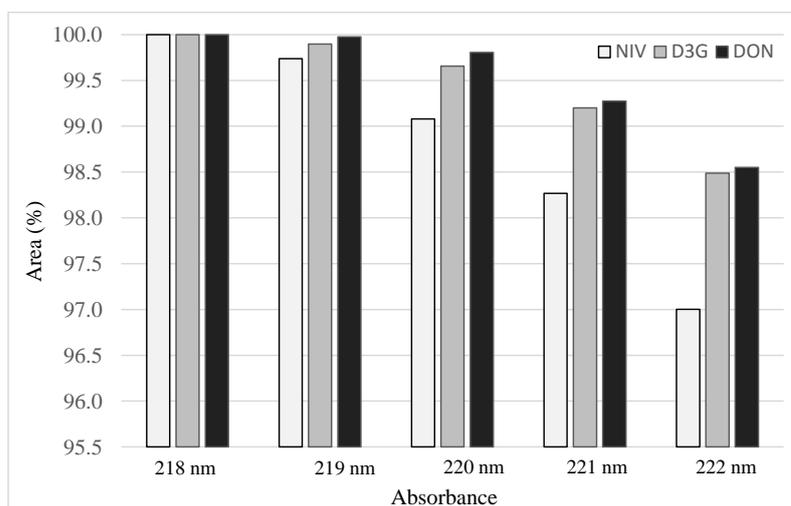


Figura 17 - Efeitos do comprimento de onda do detector (nm) no valor de área (%) dos picos de DON, D3G e NIV.

### 3.2. Ocorrência das micotoxinas em amostras comerciais

Das 17 amostras avaliadas para a presença de NIV, D3G e DON, 58,8% foram positivas para ao menos uma micotoxina. DON teve a maior prevalência (58,8%), seguido do D3G (41,2%) e NIV (29,5%). O maior nível de D3G encontrado correspondeu a 38,1 µg/Kg (menor que o <LQ), em uma amostra de grãos de trigo. Ocorrência simultânea de D3G com DON foi observada, sendo que em 100% das amostras positivas para D3G também foi detectado DON. No entanto, nenhuma das amostras excederam os limites vigentes na EU (EC, 2006), correspondendo a 1250 µg/Kg para grãos de trigo e 750 µg/Kg para farinhas. Para o NIV, não existem limites legais para sua presença nos alimentos, no entanto, devido a sua imunotoxicidade e hematotoxicidade, a EFSA (European Food Safety Authority) estabeleceu a ingestão diária aceitável (IDA) de 1,2 µg/Kg peso corpóreo/dia (EFSA, 2013d). Da mesma forma, não existem limites legais para a presença de D3G nos alimentos, no entanto, mesmo se fosse considerada a conversão total dos níveis de D3G encontrado em

DON, somado aos níveis de DON determinado, nenhuma das amostras apresentaria níveis superiores ao máximo permitido. Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 16 - Ocorrência natural de NIV, D3G e DON em amostras comerciais de grãos de trigo integral, comercializados em Braga, Portugal

Micotoxina	% de amostras positivas (e faixa de ocorrência, em µg/Kg)		
	Grãos de trigo (n = 13)	Farinha de trigo integral (n = 4)	Total (n = 17)
NIV	7,6% (< LQ)	100% (< LQ –140,6)	29,5% (< LQ – 140,6)
D3G	30,8% (< LQ)	75% (< LQ)	41,2% (< LQ)
DON	46,1% (<LQ –297,3)	100% (78,9 – 325,8)	58,8% (< LQ – 325,8)

LQs para NIV e DON corresponderam a 31,3 µg/Kg. LQ para D3G correspondeu a 47,1 µg/Kg.

Outros estudos demonstram que o D3G pode ser encontrado em diferentes cereais. Vendl *et al.* (2010), investigaram tal micotoxina por cromatografia acoplada em EM em 25 amostras de produtos a base de cereais, encontrando 8% de positividade (LQ = 100 µg/Kg). Škrbić *et al.* (2011), reportaram maior porcentagem de contaminação (13%), possivelmente devido ao menor LQ do método por EM utilizado (5 µg/Kg). Os autores avaliaram 54 amostras de grãos de trigo e reportaram concentrações variando de 17 a 83 µg/Kg. De Boevre *et al.* (2012), também utilizaram método por EM e encontrou níveis maiores de D3G em amostras de alimentos adicionados de farelo de trigo, variando de 10 a 425 µg/Kg, com 48% das amostras positivas.

O maior valor de D3G ocorrendo em amostra de cereais descrito até o momento correspondeu a 1070 µg/Kg, em grãos de trigo (BERTHILLER *et al.*, 2009b) e a 1100 µg/Kg em amostra de milho (DE BOEVRE *et al.*, 2014). Os níveis de D3G podem inclusive serem maiores do que os de DON em uma mesma amostra, conforme apresentado em cereais por MALACHOVA *et al.* (2011) e em cervejas (VARGA *et al.*, 2013). A presença de D3G em cereais pode contribuir para uma maior exposição dos consumidores ao DON, sendo dessa forma, de grande importância a investigação do D3G nos alimentos para que se conheça posteriormente a importância dessa contaminação em termos toxicológicos.

#### 4. Conclusões

O método otimizado e validado intralaboratorialmente nessa pesquisa para quantificação de D3G, DON e NIV, através de purificação por coluna IA e determinação por CLAE-DAD, é adequado para a determinação dessas micotoxinas em grãos de trigo. Adequados valores de recuperação, precisão, linearidade, LD e LQ foram obtidos. Esse método é o primeiro, descrito até o momento, no qual é possível realizar a determinação direta e simultânea de D3G, DON e NIV por CLAE-DAD. Através de tal método, alta incidência de D3G (41,2%, <LQ) foi verificada em amostras comerciais de grãos de trigo e farinha de trigo integral (n =17), sendo constatada ocorrência simultânea de DON e D3G. Sugestões para futuras pesquisas incluem: a avaliação da aplicabilidade desse método em outras matrizes derivadas do trigo, como por exemplo farinha refinada e farelo e; a avaliação de tais micotoxinas em outros cereais que tenham alta incidência de *Fusarium spp.* A possível retenção de 3ADON e 15ADON pela coluna IA utilizada também deve ser estudada a fim de incluir a determinação desses metabólitos na mesma metodologia.

## CONCLUSÕES GERAIS

A ozonização gasosa é uma interessante tecnologia não térmica, de fácil aplicação e capaz de reduzir com grande eficácia os níveis de contaminação fúngica e de micotoxinas em grãos de trigo. Nessa pesquisa, utilizando diferentes condições de ozonização foi possível obter altas reduções nos níveis de desoxinivalenol, aflatoxinas e fungos em amostras artificialmente contaminadas. Quando a maior concentração de O<sub>3</sub>, maior tempo de exposição e menor massa de grãos foram utilizadas, maior foi o efeito fungicida e maiores reduções nos níveis de micotoxinas foram obtidos. Em tais condições, o peso do hectolitro, extração da farinha, valores de glúten, parâmetros farinográficos e alveográficos, composição química, mineral e características sensoriais e colorimétricas não foram influenciados ( $p > 0,05$ ) de forma negativa pelo efeito oxidante do O<sub>3</sub>, demonstrando que a ozonização é uma metodologia muito promissora para a melhoria da qualidade dos grãos de trigo. Mais pesquisas utilizando a ozonização devem ser realizadas a fim de que se conheçam os efeitos na redução de outras micotoxinas e em diferentes tipos de alimentos, bem como os efeitos adversos do processamento na qualidade desses. Nessa pesquisa também foi otimizado e validado um novo método para análise da forma modificada do desoxinivalenol (DON), o desoxinivalenol-3-glucosídeo (D3G), a partir do qual foi constatado que tal forma ocorre em grande frequência nos grãos de trigo e de forma simultânea com o DON. Pesquisas devem ser realizadas no país, avaliando a ocorrência dessa forma mascarada nos principais cereais consumidos pela população, a fim de que se conheça o nível de exposição dos brasileiros a essa micotoxina, bem como a relevância dessa contaminação em termos toxicológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. American Association of Cereal Chemists. Method 26-20. 1961.
- AACC. American Association of Cereal Chemists. Method 44-15A.1981.
- AACC. American Association of Cereal Chemists. Method 54-21. 1982a.
- AACC. American Association of Cereal Chemists. Method 56-81B. 1982b.
- AACC. American Association of Cereal Chemists. Method 54.30. 1984.
- AACC. American Association of Cereal Chemists. Method 02-02A. 1995.
- AACC. Association of Cereal Chemists. Method n. 44-21. 2000a.
- AACC. American Association of Cereal Chemists. Method 38-12. 2000b.
- ABDULKADAR, A. H. W.; AL-ALI, A. A.; AL-KILDI, A. M.; AL-JEDAH, J. H. Mycotoxins in food products available in Qatar. **Food Control**, v.1, n.15, p.543-548, 2004.
- AGUAYO, E.; ESCALONA, V.; SILVEIRA, A.C.; ARTÉS, F. Quality of tomato slices disinfected with ozonated water. *Food Science and Technology International*, v.20, n.3, p.227-235, 2013.
- AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.2099–2014, 2006.
- AKOTO, O.; OPPONG-OTOO, J.; OSEI-FOSU, P. Carcinogenic and non-carcinogenic risk of organochlorine pesticide residues in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in Ghana. **Chemosphere**, v.132, p.193–199, 2015.
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; SOARES, N. F. F.; SILVA, W. A.; CARVALHO, M. C. S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.899–905, 2012.
- ALEXANDRE, E. M. C., BRANDÃO, T. R. S., SILVA, C. L. M. Assessment of the impact of hydrogen peroxide solutions on microbial loads and quality factors of red bell peppers, strawberries and watercress. **Food Control**, v.27, p.362–368, 2012.
- ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; CECIU, S.; LAZAR, V.; MANTZOURANI, I.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). **Food Control**, v.30, p.491–496, 2013.
- ALI, A.; ONG, M.K.; FORNEY, C.F. Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage. **Food Chemistry**, v.142, p.19–26, 2014.
- ALMEIDA-FERREIRA, G. C.; BARBOSA-TESSMANN, I. P.; SEGA, R.; MACHINSKI, M. Occurrence of zearalenone in wheat- and corn-based products commercialized in the State of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p.371–375, 2013.
- ALWI, N. A.; ALI, A. Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. **Food Control**, v.46, p.304–311, 2014.
- ANTONISSEN, G.; MARTEL, A.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; VERBRUGGHE, E.; VANDENBROUCKE, V.; LI, S.; HAESEBROUCK, F.; IMMERSEEL, F.; CROUBELS, S. The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. **Toxins**, v.6, p.430–452, 2014.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002a.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis 971.22 – Standards for Aflatoxins, Chapter 49, 2000b.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 978.10. 2000c.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 962.09. 2000d.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis 994.08 – Derivatization of standards for aflatoxins, chapter 49. 2005.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis 994.08 – Derivatization of standards for aflatoxins, chapter 49, 2005.

AOCS. American Oil Chemists' Society. Method 5-04. 2000a.

AOCS. American Oil Chemists' Society. Method 986.11. 2000b.

APHA. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 th edition. 1998.

ATALLA M. M.; HASSANEIN N. M.; EL-BEIH A. A.; YOUSSEF Y. A. G. Mycotoxin production in wheat grains by different Aspergilli in relation to different relative humidities and storage periods. **Food/Nahrung**, v.1, n.47, p.6-10, 2003.

AYDIN A.; UGUR, G.; DEMIREL, S. Total aflatoxin, aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A levels in Turkish wheat flour. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.16, n.1, p.48-53, 2008.

BAKIRDERE S., BORA, S.; BAKIRDERE, G.; AYDIN, F., ARSLAN, Y.; KOMESLI, O. T.; AYDIN, I.; YILDIRIM, E. Aflatoxin species: their health effects and determination methods in different foodstuffs. **Central European Journal of Chemistry**, v.10, n.3, p.675–685, 2012.

BARGAŃSKA, Ż.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. **Food Control**, v.31, p.196–2013.

BELTRÁN, D.; SELMA, M. V.; MARÍN, A.; GIL, M. I. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.5654–5663, 2005.

BERTHILLER, F.; DALL'ASTA, C.; SCHUHMACHER, R.; LEMMENS, M.; ADAM, G.; KRŠKA, R. Masked Mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3421–3425, 2005.

BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.33–37, 2007.

BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; ADAM, G.; KRŠKA, R. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, p.1243–1252, 2009a.

BERTHILLER, F.; DALL'ASTA, C.; CORRADINI, R.; MARCHELLI, R.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; ADAM, G.; SCHUHMACHER, R. Occurrence of deoxynivalenol and its 3-β-D-glucoside in wheat and maize. **Food Additives and Contaminants**, v.26, p.507–511, 2009b.

BLAZNIK, U.; YNGVE, A.; ERŽEN, I.; HLASTAN-RIBIČ, C. Consumption of fruits and vegetables and probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate pesticides of schoolchildren in Slovenia. **Public Health Nutrition**, v.20, p.1–7, 2015.

BONNET, M.; ROUX, J.; MOUNIEN, L.; DALLAPORTA, M.; TROADEC, J. D. Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: The brain as a target. **Toxins**, v.4, p.1120–1138, 2012.

BORNEO, R.; LEÓN, A. E. Whole grain cereals: functional components and health benefits. **Food & Function**, v.3, p.110–119, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n.7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2011.

BRERA, C.; PEDUTO, A.; DEBEGNACH, F.; PANNUNZI, E.; PRANTERA, E.; GREGORI, E.; GIACOMO; SANTIS, B. Study of the influence of the milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. **Food Control**, v.32, p.309–312, 2013.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.140–146, 2007.

CABALLERO, P. A.; GÓMEZ, M.; ROSELL, C. M. Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. **European Food Research and Technology**, v.224, p.525–534, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. Planejamento de experimentos usando Statistica, 1st ed. E-Papers Serviços Editoriais, Rio de Janeiro, 2003.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in cereal products. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.42, p.7648–7654, 2011.

CAMPOS, C. A.; RODRÍGUEZ, Ó.; LOSADA, V.; AUBOURG, S.P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Effects of storage in ozonized slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.121–130, 2005.

CANADA. Health Canada. Canadian Standards (Maximum Levels) for various chemical Contaminants in Foods, 2012.

CASTELLS, M.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review. **Food Additives and Contaminants**, v.22, p.150–157, 2005.

CATALDO, F. Ozone decomposition of patulin—A micotoxin and food contaminant. **Ozone Science & Engineering**, v.30, p.197–201, 2008.

CAVALCANTE, D. A.; LEITE JÚNIOR, B. R. C.; TRIBST, A. A.; CRISTIANINI, M. Microbiological quality of Minas Frescal cheese treated with ozonated water. **International Food Research Journal**, v.20, p.2911–2915, 2013.

CERVINO, C.; ASAM, S.; KNOPP, D.; RYCHLIK, M.; NIESSNER, R. Use of isotope-labeled aflatoxins for LC-MS/MS stable isotope dilution analysis of foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.6, p.1873–79, 2008.

CHAUHAN, O. P.; RAJU, P. S.; RAVI, N.; SINGH, A.; BAWA, A. S. Effectiveness of ozone in combination with controlled atmosphere on quality characteristics including lignification of carrot sticks. **Journal of Food Engineering**, v.102, p.43–48, 2011.

CHELI, F.; BATTAGLIA, D.; GALLO, R.; DELL'ORTO, V. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.37, p.315–325, 2014.

CHELI, F.; PINOTTI, L.; ROSSI, L.; DELL'ORTO, V. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, p.307–314, 2013.

CHEN, J. Y.; LIN, Y. J.; KUO, W. C. Pesticide residue removal from vegetables by ozonation. **Journal of Food Engineering**, v.114, p.404–411, 2013.

CHEN, R.; MA, F.; LI, P. W.; ZHANG, W.; DING, X. X.; ZHANG, Q.; LI, M.; WANG, Y. R.; XU, B. C. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. **Food Chemistry**, v.146, p.284–288, 2014.

CHILE. Ministerio de Salud. Departamento de Alimentos y Nutrición. Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces, p.1–36, 2007.

CHILE. Ministerio de Salud. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Art. 169, decreto 977/96, del Ministerio de Salud, 1996.

CHINA. Ministry of Health. National Food Safety Standards. GB 2761-2011. Maximum levels of mycotoxins in foods, 2011.

CHITTRAKORN, S.; EARLS, D.; MACRITCHIE, F. Ozonation as an alternative to chlorination for soft wheat flours. **Journal of Cereal Science**, v.60, p.217–221, 2014.

CHIU, Y. H.; AFEICHE, M. C.; GASKINS, A. J.; WILLIAMS, P. L.; PETROZZA, J. C.; TANRIKUT, C.; HAUSER, R.; CHAVARRO, J. E. Fruit and vegetable intake and their pesticide residues in relation to semen quality among men from a fertility clinic. **Human Reproduction**, v.30, p.1342–1351, 2015.

CHOURASIYA, S.; KHILLARE, P. S.; JYETHI, D. S. Health risk assessment of organochlorine pesticide exposure through dietary intake of vegetables grown in the periurban sites of Delhi, India. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.5793–5806, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. Proposed draft revision of the code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 26, 2014.

COELHO, C. C. S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.4, p.369-375.

CROWE, K. M.; SKONBERG, D.; BUSHWAY, A.; BAXTER, S. Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. **Food Control**, v.25, p.464–468, 2012.

CUBADDA, F.; AURELI, F.; RAGGI, A.; CARCEA, M. Effect of milling, pasta making and cooking on minerals in durum wheat. **Journal of Cereal Science**, v.49, p.92–97, 2009.

DALL'ERTA, A.; CIRLINI, M.; DALL'ASTA, M.; DEL RIO, D.; GALAVERNA, G.; DALL'ASTA, C. Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones. **Chemical Research Toxicology**, v.26, p.305–312, 2013.

DALTON, S. M. C.; TAPSELL, L. C.; PROBST, Y. Potential health benefits of whole grain wheat components. **Nutrition Today**, v.47, n.4, p.163-174, 2012.

DE ANGELIS, E.; MONACI, L.; VISCONTI, A. Investigation on the stability of deoxynivalenol and DON-3 glucoside during gastro-duodenal in vitro digestion of a naturally contaminated bread model food. **Food Control**, v.43, p.270–275, 2014.

DE BOEVRE, M.; DI MAVUNGU, J. D.; LANDSCHOOT, S.; AUDENAERT, K.; EECKHOUT, M.; MAENE, P.; HAESAERT, G.; DE SAEGER, S. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. **World Mycotoxin Journal**, v.5, p.207–219, 2012.

DE BOEVRE, M.; LANDSCHOOT, S.; AUDENAERT, K.; MAENE, P.; DI MAVUNGU, D.; EECKHOUT, M.; HAESAERT, G.; DE SAEGER, S. Occurrence and within field variability of Fusarium mycotoxins and their masked forms in maize crops in Belgium. **World Mycotoxin Journal**, v.7, p.91–102, 2014.

DE, A.; BOSE, R.; KUMAR, A.; MOZUMDAR, S. Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles, fundamentals and applications of controlled release drug delivery, springerbriefs in molecular science. Springer India, New Delhi. 2014.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v.132, n.2, p.1087-1091, 2012.

DEWAN, P.; JAIN, V.; GUPTA, P.; BANERJEE, B. D. Organochlorine pesticide residues in maternal blood, cord blood, placenta, and breastmilk and their relation to birth size. **Chemosphere**, v.90, p.1704–1710, 2013.

DIAO, E.; SHAN, C.; HOU, H.; WANG, S.; LI, M.; DONG, H. Structures of the ozonolysis products and ozonolysis pathway of aflatoxin B<sub>1</sub> in acetonitrile solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.9364–9370, 2012.

DIAO, E.; HOU, H.; CHEN, B.; SHAN, C.; DONG, H. Ozonolysis efficiency and safety evaluation of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanuts. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.519–525, 2013.

DUDZIAK, M. Removal of zearalenone from water by means of ozonation and integrated system of ozonation/nanofiltration. **Ecological Chemistry and Engineering**, v.19, p.779–785, 2012.

EC. European Commission. Joint Research Centre. Institute for reference material and measurements. LERDA, D. Mycotoxins Factsheet. 4 ed. **JRC Technical Notes**, 2011.

EC. European Commission. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002a. implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002b.

EC. European Commission. Health e Consumer protection directorate general. Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final. 2002c.

EC. European Commission. Commission Regulation N° 401/2006 of 23 February 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2006.

EFSA. European Food Safety Authority. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific Report CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01, 2009.

EFSA - European Food Safety Authority. Mycotoxins. 2012. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa.htm>> Acessado em: Mai., 2013.

EFSA. European Food Safety Authority. Contaminants in food and feed Mycotoxins. 2012.

EFSA. Aflatoxins (sum of B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) in cereals and cereal-derived food products. European Food Safety Authority. Technical Report. 2013a.

EFSA. Aflatoxins in food. European Food Safety Authority. Committed. Aflatoxins food. URL <http://www.efsa.europa.eu> Acessado em: mai. 2013b.

EFSA. Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA J.* v.11, p. 3379–3434, 2013c.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA Journal*, v.11, p.119, 2013d.

EFSA. European Food Safety Authority. The 2013 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal*, v.13, p.169, 2015.

EL-DESOUKY, T.; SHAROBA, A.; DESOUKY, A. I. E.; EL-MANSY, H. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> and *Aspergillus flavus* gungal. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v.2, p.1–6, 2012.

EL-MORSI, D.; RAHMAN, R. H. A. Pesticides residues in Egyptian diabetic children: A preliminary study. **Journal of Clinical Toxicology**, v.2, , p.138-140, 2012.

EMAN - European Mycotoxins Awareness Network. Mycotoxins Legislation Worldwide. 2012. Disponível em: <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79>. Acessado em: Out., 2012.

EMBRAPA. Métodos usados para avaliar a qualidade de trigo. Brazilian Corporation of Agricultural Research. Embrapa Wheat. 2009. URL [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do112\\_5.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do112_5.htm) (accessed 1.1.15).

EMBRAPA TRIGO. Brazilian Agricultural Research Corporation. Online publications. 2013. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/>> Acessado em: Mai., 2013.

ESPINOSA-CALDERÓN, A.; CONTRERAS-MEDINA, L. M.; MUÑOZ-HUERTA, R. F.; MILLÁN-ALMARAZ, J. R.; GONZÁLEZ, R. G. G.; TORRES-PACHECO, I. Methods for Detection and Quantification of Aflatoxins, in: Torres-Pacheco, I. (Ed.), Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. Online. Agricultural and Biological Sciences, pp. 109–128. 2011.

EU. European Union. COMMISSION REGULATION (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Union**, 8–12. 2010.

FAN, X. D.; ZHANG, W. L.; XIAO, H. Y.; QIU, T. Q.; JIANG, J. G. Effects of ultrasound combined with ozone on the degradation of organophosphorus pesticide residues on lettuce. **RSC Advances**, v.5, p.45622–45630, 2015.

FAO. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Definitions for the Purposes of the Codex Alimentarius. 5–8, 2001.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Hans, P.; Egmond, V.; Jonker M. A. Rome, 2004.

FDA. Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption. Federal Register, v.66, n.123, p.33829–33830, 2001.

FDA - Food and Drug Administration. Advisory for deoxynivalenol (DON) in finished wheat products intended for human consumption and in grain and grain by-products for animal Feed, 2010.

FDA. Food and drug administration. Mycotoxin Regulatory Guidance. A guide for grain elevators, feed manufacturers, grain processors and exporters. 2011.

FDA. Bad Bug Book : [WWW Document]. U.S. Food Drug Adm. Foodborne Pathog. Microorg. Nat. Toxins Handbook. Aflatoxins. 2012. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm071020.html>.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Sec. Title 21. 801.415. Maximum acceptable level of ozone. Code of Federal Regulations, 8, 2014.

FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S; C.; DE, MODESTA; R. C.; DELLA. Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p.609–617, 2009.

FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G.; SMILANICK, J. L. Application of low concentrations of ozone during the cold storage of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.93, p.38–48, 2014.

FREITAS-SILVA, O. Mycotoxins and mycobiota in Brazil nuts and strategies for their control. Universidade do Minho. Tese. (Doutorado em Engenharia Biológica), 2011.

FREITAS-SILVA, O.; MORALES-VALLE, H.; VENÂNCIO, A. Potential of aqueous ozone to control aflatoxigenic fungi in brazil nuts. **ISRN Biotechnol**, v.2013, p.1–6, 2013.

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. **Drug Metabolism Review**, v.42, p.612–620, 2010.

FSA. Mycotoxins commonly found in food and feed [WWW Document]. Food Standard Agency. Mycotoxins commonly found food Feed. 2013. <http://www.food.gov.uk/business-industry/farmingfood/mycotoxins/about/#.U95bOWNHTIU>

FSA. Food Standards Agency. The UK code of good agricultural practice to reduce *Fusarium* mycotoxins in cereals, 2007.

FUJII, S.; GARCIA, L. B.; HIROOKA, E.Y. Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.3: p.273-84, 2004.

GABLER, F. M.; SMILANICK, J. L.; MANSOUR, M. F.; KARACA, H. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.55, p.85–90, 2010.

GALLO, G.; BIANCO, M. L.; BOGNANNI, R.; SAIMBENE, G. Mycotoxins in durum wheat grain: Hygienic-health quality of sicilian production toxicology and chemical. **Journal of Food Science**, n.73, n.4, p.42-47, 2008.

GAOU, I.; DUBOIS, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; COSTE, C.; DE JOUFFREY, S.; PARENT-MASSIN, D. Safety of Oxygreen®, an ozone treatment on wheat grains. Part 1. A four-week toxicity study in rats by dietary administration of treated wheat. **Food Additives and Contaminants**, v.22, p.1113–1119, 2005.

GARCIA LOREDO, A. B.; GUERRERO, S. N.; ALZAMORA, S. M. Inactivation kinetics and growth dynamics during cold storage of *Escherichia coli* ATCC 11229, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Saccharomyces cerevisiae* KE162 in peach juice using aqueous ozone. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v.29, p.271–279, 2015.

GARCIA, M. J. M.; BIAGGIONI, M. A. M.; FERREIRA, W. A.; KOHARA, E. Y.; ALMEIDA, A. M. Sucessão de espécies de fungos em milho armazenado em sistema aerado. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.27, n.2, p.14-22, 2003.

GAREIS, M. Maskierte Mykotoxine. **Übers Tierernährung**, v.22, p.104–113, 1994.

GENG, Z.; YANG, D.; ZHOU, M.; ZHANG, P.; WANG, D.; LIU, F.; ZHU, Y.; ZHANG, M. Determination of deoxynivalenol-3-glucoside in cereals by Hydrophilic Interaction Chromatography with Ultraviolet Detection. **Food Analytical Methods**, v.7, p.1139–1146, 2013.

GERDING, J.; ALI, N.; SCHWARTZBORD, J.; CRAMER, B.; BROWN, D. L.; DEGEN, G. H.; HUMPF, H. U. A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. **Mycotoxin Research**, v.31, n.3, p.127-136, 2015.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. **Food Control**, v.19, n.1, p.921-924, 2008.

GIL, A.; ORTEGA, R. M.; MALDONADO, J. Wholegrain cereals and bread: a duet of the Mediterranean diet for the prevention of chronic diseases. **Public Health Nutrition**, v.14, p.2316–2322, 2011.

GIMÉNEZ, I.; HERRERA, M.; ESCOBAR, J.; FERRUZ, E.; LORÁN, S.; HERRERA, A.; ARIÑO, A. Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled germ during wheat milling and analysis of toxin levels in wheat germ and wheat germ oil. **Food Control**, v.34, p.268–273, 2013.

GIORDANO, B. N.; SIMAO, V.; MANFIO, D.; GALVAO, S.; SCUSSEL, J. N.; SCUSSEL, V. 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 Reduction. Estoril, pp. 566–572, 2010.

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.

GIRAY, B.; GIRGIN, G.; ENGINN, A. B.; AYDIN, S.; SAHIN, G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. **Food Control**, v.18, n.1, p.23-29, 2007.

GLASER, N.; STOPPER, H. Patulin: Mechanism of genotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.1796–1801, 2012.

GORAYEB, T. C. C.; CASCIATORI, F. P.; BIANCHI, V. L. DEL; THOMÉO, J. C. HACCP plan proposal for a typical Brazilian peanut processing company. **Food Control**, v.20, p.671–676, 2009.

GORYACHEVA, I. Y.; DE SAEGER, S. Immunochemical detection of masked mycotoxins: A short review. **World Mycotoxin Journal**, v.5, p.281–287, 2012.

GRATZ, S.W.; DUNCAN, G.; RICHARDSON, A. J. The human fecal microbiota metabolizes deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside and may be responsible for urinary deepoxy-deoxynivalenol. **Applied Environmental Microbiology**, v.79, p.1821–1825, 2013.

GREENE, A. K.; GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C. Chemical and physical properties of ozone, in: O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; RICE, R.G. (Eds.), *Ozone in Food Processing*. John Wiley & Sons, p.19–32, 2012.

GREGORI, R.; MERIGGIC, P.; PIETRIB, A.; FORMENTIA, S.; BACCARINID, G.; BATTILANIA, P. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. **Food Control**, v.30, n.1, p.280-287, 2013.

HAIKOWSKI, M.; PASCALE, M.; PERRONE, G.; PANCALDI, D.; CAMPAGNA, C.; VISCONTI, A. Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, n.2, p.191-198, 2005.

HANDFORD, C. E.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. A review of the global pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.11, n.4, p.525-536, 2015.

HANSEN, L. S.; HANSEN, P.; VAGN JENSEN, K. M. Effect of gaseous ozone for control of stored product pests at low and high temperature. **Journal of Stored Products Research**, v.54, p.59–63, 2013.

HERRERA, M.; JUAN, T.; ESTOPAÑA, G.; ARIÑO, A. Comparison of deoxynivalenol, ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub> levels in conventional and organic durum semolina and the effect of milling. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.48, p.92–99. 2009.

HOPE, R.; MAGAN, A. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, n.4, p.295–300, 2005.

IACUMIN, L.; MANZANO, M.; COMI, G. Prevention of *Aspergillus ochraceus* growth on and Ochratoxin a contamination of sausages using ozonated air. **Food Microbiology**, v.29, p.229–232, 2012.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4a ed. ZENEON, O.; PASCUER, N. S. Capítulo CCIV - Micotoxinas. 1a ed digital. 2008. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)>.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, World Health Organization, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Summary of data reported and evaluation. Lyon, n.82, p.171-175, 2002.

IBÁÑEZ-VEA, M.; MARTÍNEZ, R.; GONZÁLES-PEÑAS, E. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market. **Food Control**, v.22, n.1, p.1949-1955, 2011.

IBANOĞLU, Ş. Influence of tempering with ozonated water on the selected properties of wheat flour. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.345–350, 2001.

IBANOĞLU, S. Wheat washing with ozonated water: Effects on selected flour properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.579–584, 2002.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; HECK, A. R.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M<sub>1</sub> and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Control**, v.40, p.310–313, 2014.

IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, J. N.; GAMAL EL-DIN, M. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. **Ozone Science & Engineering**, v.28, p.353–414, 2006.

IKEURA, H.; KOBAYASHI, F.; TAMAKI, M. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, p.956-959, 2011a.

IKEURA, H.; KOBAYASHI, F.; TAMAKI, M. Removal of residual pesticide, fenitrothion, in vegetables by using ozone microbubbles generated by different methods. **Journal of Food Engineering**, v.103, p.345–349, 2011b.

IKEURA, H.; HAMASAKI, S.; TAMAKI, M. Effects of ozone microbubble treatment on removal of residual pesticides and quality of persimmon leaves. **Food Chemistry**, v.138, p.366–371, 2013.

INAN, F.; PALA, M.; DOYMAZ, I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> in red pepper. **Journal of Stored Products Research**, v.43, p.425–429, 2007.

INDIA. Ministry of health and family welfare. Food Safety and Standards Authority of India. Notification. Food Safety and Standard (Contaminants, Toxins and Residues) Regulation, New Delhi, 2011.

INFANTINO, A.; SANTORI, A.; SHAH, D. A. Community structure of the *Fusarium* complex on wheat seed in Italy. **European Journal of Plant Pathology**, v.132, n.4, p.499–510, 2012.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. 2007. Online: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf) Acessado em: 30/03/2013

IQBAL, S. Z.; ASI, M. R.; JINAP, S.; RASHID, U. Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. **Food Control**, v.35, p.223–226, 2014.

JARDIM, A. N. O.; MELLO, D. C.; GOES, F. C. S.; FROTA, E. F.; CALDAS, E. D. Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC- $\mu$ ECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. **Food Chemistry**, v.164, p.195–204, 2014.

JI, F.; XU, J.; LIU, X.; YIN, X.; SHI, J. Natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in wheat from Jiangsu province, China. **Food Chemistry**, v.157, p.393–397, 2014.

JI, F.; WU, J.; ZHAO, H.; XU, J.; SHI, J. Relationship of deoxynivalenol content in grain, chaff, and straw with *Fusarium* head blight severity in wheat varieties with various levels of resistance. **Toxins**, v.7, p.728–742, 2015.

JOUBRANE, K.; KHOURY, A. E. L.; LTEIF, R.; RIZK, T.; KALLASSY, M.; HILAN, C.; MAROUN, R. Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in Lebanese cultivated wheat. **Mycotoxin Research**, v.27, n.4, p.249-57, 2011.

JUAN, C.; RITIENI, A.; MANES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.134, n.4, p.2389-2397, 2012.

KABAK, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, n.4, p.549-554, 2009.

KACHUEI, R.; YADEGARII, M. H.; REZAIE, S.; ALLAMEH, A.; SAFAIE, N.; ZAINI, F.; KHANEZAD, Y. F. Investigation of stored wheat mycoflora, reporting the *Fusarium* cf. *langsethiae* in three provinces of Iran during 2007. **Annals of Microbiology**, v.59, n.2, p.383-390, 2009.

KAMOTANI, S.; HOOKER, N.; SMITH, S.; LEE, K. Consumer acceptance of ozone-treated whole shell eggs. **Journal of Food Science**, v.75, p.103–107, 2010.

KARACA, H.; VELIOGLU, Y. S. Postharvest biology and technology effects of ozone treatments on microbial quality and some chemical properties of lettuce, spinach, and parsley. **Postharvest Biology and Technology**, v.88, p.46–53, 2014.

KARL, J. P.; SALTZMAN, E. The role of whole grains in body weight regulation. **Advances in Nutrition**, v.3, n.5, p.697-707, 2012.

KAUSHIK, G.; SATYA, S.; NAIK, S. N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review. **Food Research International**, v.42, p.26–40, 2009.

KAZAN, K; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. **Molecular Plant Pathology**, v.13, p.399–413, 2012.

KHER, S. V.; DE JONGE, J.; WENTHOLT, M. T. A.; DELIZA, R.; DE ANDRADE, J. C.; CNOSSSEN, H. J.; LUIJCKX, N. B. L.; FREWER, L. J. Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains: a cross-national study. **International Journal of Consumer Study**, v.37, p.73–83, 2013.

KOCH, H. J.; PRINGAS, C.; MAERLAENDER, B. Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. **European Journal of Agronomy**, v.24, n.4, p.357-366, 2006.

KOLMANIC, A.; SIMONCIC, A.; V. A. J. S. S.; CENCIC, A.; LESNIK, M. Fate of deoxynivalenol and nivalenol during storage of organic whole-grain wheat flour. **Journal of Stored Products Research**, v.46, n.1, p.66-71, 2010.

KÖPPEN, R.; KOCH, M.; SIEGEL, D.; MERKEL, S.; MAUL, R.; NEHLS, I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1595–1612, 2010.

KUSVURAN, E.; YILDIRIM, D.; MAVRUK, F.; CEYHAN, M. Removal of chlorpyrifos ethyl, tetradifon and chlorothalonil pesticide residues from citrus by using ozone. **Journal of Hazardous Materials**, v.241, p.287–300, 2012.

KYING, M.; ALI, A. Postharvest biology and technology antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v.100, p.113–119, 2015.

LAFI, W. K.; AL-QODAH, Z. Combined advanced oxidation and biological treatment processes for the removal of pesticides from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v.137, p.489–97, 2006.

LEES, R.; SALGUERO, J. F. Analisis de Los Alimentos, Métodos Analíticos y de Control de Calidad, 2nd ed. Acribia, 1982.

LI, M.; ZHU, K.; WANG, B.; GUO, X.; PENG, W.; ZHOU, H. Evaluation the quality characteristics of wheat flour and shelf-life of fresh noodles as affected by ozone treatment. **Food Chemistry**, v.135, p.2163–2169, 2012a.

LI, Y.; ZHOU, Y. C.; YANG, M. H.; OU-YANG, Z. Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products. **Food Chemistry**, v.132, p.1040–1045, 2012b.

LI, M. M.; GUAN, E. Q.; BIAN, K. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and quality evaluation of ozonised wheat. **Food Additives and Contaminants**, v.32, p.544–553, 2014.

LIU, Y.; PAN, X.; LI, J. Current agricultural practices threaten future global food production. **Journal of Agricultural Environmental Ethics**, v.28, p.203–216, 2015.

LIU, Y.; WALKER, F.; HOEGLINGER, B.; BUCHENAUER, H. Solvolysis procedures for the determination of bound residues of the mycotoxin deoxynivalenol in *Fusarium* species infected grain of two winter wheat cultivars preinfected with barley yellow dwarf virus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.6864–6869, 2005.

LOMBARD, M. J. Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: What do we know? **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.64, p.42–52, 2014.

LOZOWICKA, B. Health risk for children and adults consuming apples with pesticide residue. **Science of the Total Environment**, v.502, p.184–198, 2015.

LOZOWICKA, B.; KACZYNSKI, P.; PARITOVA, A. E.; KUZEMBEKOVA, G. B.; ABZHALIEVA, A. B.; SARSEMBAYEVA, N. B.; ALIHAN, K. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. **Food and Chemical Toxicology**, v.64, p.238–248, 2014..

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; WANG, Y.; CHEN, Z. Structure elucidation and toxicity analyses of the degradation products of aflatoxin B<sub>1</sub> by aqueous ozone. **Food Control**, v.31, p.331–336, 2013.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; BIAN, Y.; CHEN, Z. Effect of ozone treatment on aflatoxin B<sub>1</sub> and safety evaluation of ozonized corn. **Food Control**, v.37, p.171–176, 2014a.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; WANG, Y.; CHEN, Z. Detoxification of aflatoxin in corn flour by ozone. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p.2253–2258, 2014b.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; ZHENG, R.; SUN, X.; WANG, Y.; CHEN, Z.; TAO, G. Analyses by UPLC Q-TOF MS of products of aflatoxin B<sub>1</sub> after ozone treatment. **Food Additives and Contaminants**, v.31, p.105–110, 2014c.

LUPO, A.; ROEBUCK, C.; SETTIMO, K.; QUAIN, A.; KENNEDY, J.; ABOUZIED, M. Validation study of a rapid ELISA for detection of deoxynivalenol in wheat, barley, malted barley, corn, oats, and rice. **Journal of AOAC International**, v.93, n.2, p.600-610, 2010.

LUTFULLAH, G.; HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. **Food Control**, v.23, p.32–36, 2012.

MAGNUSSEN, A. Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, p.1508-1511, 2013.

MAHMOUD, B. S. M.; VAIDYA, N. A.; CORVALAN, C. M.; LINTON, R. H. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Poona on whole cantaloupe by chlorine dioxide gas. **Food Microbiology**, v.25, p.857–865, 2008.

MALACHOVA, A.; DZUMAN, Z.; VEPRIKOVA, Z.; VACLAVIKOVA, M.; ZACHARIASOVA, M.; HAJLSLOVA, J. Deoxynivalenol, Deoxynivalenol-3-glucoside, and Enniatins: The major mycotoxins found in cereal-based products on the Czech market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.12990–12997, 2011.

MALACHOVÁ, A.; ŠTOČKOVÁ, L.; WAKKER, A.; VARGA, E.; KRŠKA, R.; MICHLMAYR, H.; ADAM, G.; BERTHILLER, F. Critical evaluation of indirect methods for the determination of deoxynivalenol and its conjugated forms in cereals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.407, p.6009–6020, 2015.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.4018–4040, 2010.

MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P.; STURZA, D. A. F.; VASCONCELOS, T. G.; RAUBER, R. Determinação de desoxinivalenol em grãos e cereais por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massa (LC/MS). **Revista Ciências da Vida**, v.28, n.1, p.79-81, 2008.

MAPA, 2003. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil. Normative Instruction no62 of August 2003.

MARROQUÍN-CARDONA, A. G.; JOHNSON, N. M.; PHILLIPS, T. D.; HAYES, A. W. Mycotoxins in a changing global environment - A review. **Food Chemical Toxicology**, v.69, p.220-230, 2014.

MCCLURKIN, J. D.; MAIER, D. E.; ILELEJI, K. E. Half-life time of ozone as a function of air movement and conditions in a sealed container. **Journal of Stored Product Research**, v.55, p.41–47, 2013.

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.

MCKEOWN, N. M.; JACQUES, P. F.; SEAL, C. J.; VRIES, J.; JONNALAGADDA, S. S.; CLEMENS, R. Whole grains and health: from theory to practice - Highlights of the grains for health foundation's whole grains summit 2012. **Journal of Nutrition**, v.143, n.5, p.744–758, 2013.

MCMULLEN, M.; BERGSTROM, G.; DE WOLF, E.; DILL-MACKY, R.; HERSHMAN, D.; SHANER, G.; VAN SANFORD, D. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* Head Blight. **Plant Disease**, v.96, p.1712–1728, 2012.

MENDEZ, F.; MAIER, D.; MASON, L.; WOLOSHUK, C. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.33–44, 2003.

MIN, Z. W.; HONG, S. M.; YANG, I. C.; KWON, H. Y.; KIM, T. K.; KIM, D. H. Analysis of Pesticide residues in brown rice using modified QuEChERS multiresidue method combined with electrospray ionization-liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Journal of Korean Society of Applied Biological Chemistry**, v.55, p.769–775, 2012.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B<sub>1</sub> in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology In Vitro**; v.18, n.1, p.21–28, 2004.

MOHAMMADI KOUCHESFAHANI, M.; ALIMOHAMMADI, M.; KHANIKI, G.; NODEHI, R.; AGHAMOHSENI, Z.; MOAZENI, M.; REZAIE, S. Antifungal effects of ozonated water on *Aspergillus parasiticus*: A new approach to prevent wheat contamination. **Journal of Food Safety**, v.35, n.3, p.295–302, 2015.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.268, p.157–177, 2013.

MUTHOMI, J. W.; NDUNG'U, K. K.; GATHUMBI, J. K.; MUTITU, E. W.; WAGACHA, J. M. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat. **Crop Protection**, v. 27, n.8, p.1215–1219, 2008.

MYLONA K.; SULYOK, M.; MAGAN, N. Relationship between environmental factors, dry matter loss and mycotoxin levels in stored wheat and maize infected with *Fusarium* species. **Food Additives & Contaminants**, v.29, n.7, p.1118–1128, 2012.

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.

NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. **Ozone: Science & Engineering**, v.28, n.6, 2006.

O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. Status and trends of ozone in processing, in: O'DONNELL, C., TIWARI, B.K., CULLEN, P.J., RICE, R.G. (Eds.), *Ozone in Food Processing*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p. 312. 2012.

ODOEMELAM, S. A.; OSU, C. I. Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination of some edible grains marketed in Nigeria. **E-Journal of Chemistry**, v.6, n.2, p.308–314, 2009.

OLIVEIRA, L. A. B.; PACHECO, H. P.; SCHERER, R. Flutriafol and pyraclostrobin residues in Brazilian green coffees. **Food Chemistry**, v.190, n.60–63, 2016.

ORMAD, M. P.; MIGUEL, N.; CLAVER, A; MATESANZ, J. M.; OVELLEIRO, J. L. Pesticides removal in the process of drinking water production. **Chemosphere**, v.71, p.97–106, 2008.

PAES, J. L.; FARONI, L. R. D.; SANTOS, J. E.; URRUCHI, W. I. Technological quality of wheat flour obtained from ozonized grain. **Rev. CENIC**, v.41, p.1–11, 2010.

PARRÓN, T.; REQUENA, M.; HERNÁNDEZ, A. F.; ALARCÓN, R. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. **Toxicology Letters**, v.230, p.157–165, 2014.

PASCALE, M.; PANZARINI, G.; VISCONTI, A. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Talanta**, v.89, n.1, p.231–236, 2012.

PATIL, S.; TORRES, B.; TIWARI, B. K.; WIJNGAARD, H. H.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P.; VALDRAMIDIS, V. P. Safety and quality assessment during the ozonation of cloudy apple juice. **Journal of Food Science**, v.75, p.437–443, 2010.

PÉAN, M.; BOIRY, S.; FERRANDI, J. C.; GIBIAT, F.; PUEL, O.; DELAFORGE, M. Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples: production of uniformly enriched biomass. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v.50, n.5, p.569–570, 2007.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. Comparison of sanitizing technologies on the quality appearance and antioxidant levels in onion slices. **Food Control**, v.22, p.2052–2058, 2011.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v.84, p.663–679, 2010.

PINTON, P.; OSWALD, I. Effect of deoxynivalenol and other type b trichothecenes on the intestine: A Review. **Toxins**, v.6, p.1615–1643, 2014.

PITT, J. L. Mycotoxin prevention and control in foodgrains. An introduction to mycotoxins. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations., Bangkok, 1989.

PLEADIN, J.; SOKOLOVIC, M.; PERSI, N.; ZADRAVEC, M.; JAK, V.; VULIC, A. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. **Food Control**, v.28, n.1, p.94–8, 2012.

PUBCHEM, 2015. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=24823 URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24823>.

PUZYR', A.P.; BUROV, A. E.; BONDAR', V. S.; TRUSOV, Y. N. Neutralization of aflatoxin B<sub>1</sub> by ozone treatment and adsorption by nanodiamonds. **Nanotechnologies in Russia**, v.5, p.137–141, 2010.

RAMOS, C. R. B. Validação de métodos de extração, limpeza e purificação de aflatoxinas para análise em cromatografia líquida de alta eficiência. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, n. 2, p. 103-108, 2008.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report. EU, Luxembourg, 2012. Disponível em: <http://ec.europa.eu/RASFF>. Acessado em: Out., 2012.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report. EU, Luxembourg, 2012. Disponível em: <http://ec.europa.eu/RASFF> Acessado em: Mai., 2013.

RIBA, A.; BOURAS, N.; MOKRANE, S.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.10, p.2772–2777, 2010.

ROCHA, E. B., FREIRE, F.; DA C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v.36, p.159–165, 2014.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos., 2nd ed. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, Campinas. 2009.

RODRÍGUEZ LÓPEZ, D.; AHUMADA, D. A.; DÍAZ, A. C.; GUERRERO, J. A. Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. **Food Control**, v.37, p.33–40, 2014.

ROMERO-GONZÁLEZ, R. Food safety: how analytical chemists ensure it. **Analytical Methods**, v.7, p.7193–7201, 2015.

ROOHI, S.; AZIZI, I. G.; HASHEMI, M. Fumonisin contamination based on flour quality used in bakeries and confectioneries in Qaemshahr (city of the Northern Iran). **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.1, p.1815-1818, 2012.

ROSCOE, V.; LOMBAERT, G. A.; HUZEL, V.; NEUMANN, G.; MELIETIO, J.; KITCHEN, D.; KOTELLO, S.; KRAKALOVICH, T.; TRELKA, R.; SCOTT, P. M. Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: a 3-year survey. **Food Additives and Contaminants Part A**, v.25, n.3, 347-355, 2008.

RUBERT, J.; LEÓN, N.; SÁEZ, C.; MARTINS, C. P. B.; GODULA, M.; YUSÀ, V.; MAÑES, J.; SORIANO, J. M.; SOLER, C. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.820, p.39–46, 2014.

RUYCK, K.; DE BOEVRE, M.; HUYBRECHTS, I.; DE SAEGER, S. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. **Mutation Research**, v.766, p.32-41, 2015.

RYCHLIK M; HUMPF, H.U.; MARKO, D.; DÄNICKE, S.; MALLY, A.; BERTHILLER, F.; KLAFFKE, H.; LORENZ, N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. **Micotoxin Research**, v.30, p.197-205, 2014

SAHAR, N.; AHMED, M.; PARVEEN, Z.; ILYAS, A.; BHUTTO, A. Screening of mycotoxins in wheat, fruits and vegetables grown in Sindh, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, n.1, p.337-341, 2009.

SALEEMULLAH, A. I.; IQTIDAR, A. K.; HAMIDULLAH; S. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, v.98, n.4, p.699-703, 2006.

SAMAR, M.; RESNIK, S. L.; GONZÁLEZ, H. H. L.; PACIN, A. M.; CASTILLO, M. D. Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. **Food Control**, v.18, p.1295–1299, 2007.

SANDHU, H. P. S.; MANTHEY, F. A.; SIMSEK, S. Quality of bread made from ozonated wheat (*Triticum aestivum* L.) flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.1576–1584, 2011.

SANDHU, H. P. S. S.; MANTHEY, F. A.; SIMSEK, S. Ozone gas affects physical and chemical properties of wheat (*Triticum aestivum* L.) starch. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.1261–1268, 2012.

SANTOS, J. S.; OLIVEIRA, T. M.; MARTINS, L. M.; HASHIMOTO, E. H.; BASSÓI, M. C.; PIRES, L. F.; MIRANDA, M. Z.; GARCIA, S.; ITANO, E. N.; ONO, Y. S.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. **Semina Ciências Agrárias**, v.32, n.4, p.1439-50, 2011.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; TIBOLA, C. S.; SCUSSEL, V. M. Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from Southern Brazil. **Food Additives and Contaminants Part B**, v.7, p.232-237, 2014a.

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**, v.39, p.940-948, 2014b.

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 Research**, v.59, p.245–253, 2014c.

SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* genera. **Ozone: Science & Engineering**, v.36, p.144–152, 2014d.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; SCUSSEL, V. M. Reduction in residues of deltamethrin and fenitrothion on stored wheat grains by ozone gas. **Journal of Stored Products Research**, v.61, p.65–69, 2015.

SEGAT, A.; BIASUTTI, M.; IACUMIN, L.; COMI, G.; BARUZZI, F.; CARBONI, C. INNOCENTE, N. Use of ozone in production chain of high moisture Mozzarella cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v.55, p.513–520, 2014.

SHIFERAW, B.; SMALE, M.; BRAUN, H. J.; DUVEILLER, E.; REYNOLDS, M.; MURICHO, G. Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. **Food Security**, v.5, p.291–317, 2013.

SANTOS, J.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y. S.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; DE MIRANDA, M. Z.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, v.138, p.90–95, 2013.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC–FLD). **Food Control**, v.22, n.12, p.1807–1813, 2011.

ŠKRBIĆ, B.; MALACHOVA, A.; ŽIVANČEV, J.; VEPRIKOVA, Z.; HAJŠLOVÁ, J. *Fusarium* mycotoxins in wheat samples harvested in Serbia: A preliminary survey. **Food Control** v.22, p.1261–1267, 2011.

SKRBIC, B.; ZIVANCEV, J.; DURISIC-MLADENOVIC, N.; GODULA, M. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. **Food Control**, v.25, n.1, p.389-96, 2012.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v.77, n.1, p.22–26, 1989.

SON, H.; LEE, Y. W. *Fusarium graminearum* mycotoxins and their biosynthetic genes. **Mycotoxins**, v.62, n.1, p.29-40, 2012.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, n.3, p.132-138, 2007.

SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; ACQUAVIVA, R.; BARBAGALLO, I.; BOGNANNO, M.; GALVANO, F. Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review. **Toxins**, v.5, p.1742–1766, 2013.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. D.; GUEDES, R. N. C.; TÓTOLA, M. R.; URRUCHI, W. I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, p.379–385, 2008.

ŠRAMKOVÁ, Z.; GREGOVÁ, E.; ŠTURDÍK, E. Chemical composition and nutritional quality of wheat grains. **Acta Chimica Slovaca**, v.2, p.115–138, 2009.

SREY, C.; KIMANYA, M. E.; ROUTLEDGE, M. N.; SHIRIMA, C. P.; GONG, Y. Y. Deoxynivalenol exposure assessment in young children in Tanzania. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.58, p.1574–1580, 2014.

STANKOVIC, S.; LEVIC, J.; IVANOVIC, D.; KRNJAJA, V.; STANKOVIC, G.; TANCIC S. Fumonisin B<sub>1</sub> and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. **Food Control**, v.23, n.1, p.384-388, 2012.

STĘPIEŃ, Ł.; CHEŁKOWSKI, J. *Fusarium* head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins. **World Mycotoxin Journal**, v.3, p.107–119, 2010.

STEPONAVIČIUS, D.; STEPONAVIČIENĖ, A.; RAILA, A.; ZVICEVIČIUS, E.; KEMZŪRAITĖ, A. Investigation on ozone penetration along grain mound height. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.10, p.742–747, 2012.

STEVENSON, L.; PHILLIPS, F.; O’SULLIVAN, K.; WALTON, J. Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 63, p.1001–1013, 2012.

STOEV, S. D. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.39, p.794–809, 2015a.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.20, n.18, p.2649–59, 2006.

TAKAHASHI, M.; CHIBA, K.; LI, P. Formation of hydroxyl radicals by collapsing ozone microbubbles under strongly acidic conditions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.111, p.11443–6, 2007.

TANG, J.; ZOU, C.; HE, Z.; SHI, R.; ORTIZ-MONASTERIO, I.; QU, Y.; ZHANG, Y. Mineral element distributions in milling fractions of Chinese wheats. **Journal of Cereal Sciences**, v.48, p.821–828, 2008

TAPP, C.; RICE, R. G. Generation and control of ozone, in: O’DONNELL, C.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; RICE, R.G. (Eds.). *Ozone in Food Processing*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p. 312, 2012.

TERKEN, B.; AYSE, B. E.; GOZDE, G.; SEVTAP, A.; GONUL, S. Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.12, n.2, p.193–197, 2005.

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C.; GUARIENTI, E. M.; NICOLAU, M. Distribution of *Fusarium* mycotoxins in wheat milling process. **Food Control**, v.53, p.91–95, 2015.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O’DONNELL, C. P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Sciences**, v.51, n.3, 2010.

TRAN, S. T.; SMITH, T. K. Determination of optimal conditions for hydrolysis of conjugated deoxynivalenol in corn and wheat with trifluoromethanesulfonic acid. **Animal Feed Science and Technology**, v.163, p.84–92, 2011.

TROMBETE, F. M.; SALDANHA, T.; DIREITO, G. M.; FRAGA, M. E. Aflatoxinas y tricotecenos en trigo y derivados: incidencia de la contaminación y métodos de determinación. **Revista Chilena de Nutrición**, v.40, p.181–188, 2013.

TROMBETE, F. M.; SANTOS, T. B.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. In-house validation of a method for determining aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in wheat and wheat by-products. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.44, p.255–262, 2014.

TURKISH FOOD CODEX. Gıda maddelerinde belirli buloanların maksimum seviyelerinin belirlenmesi hakkında tebliğ. Resmi Gazete 2002; Ankara: Basbakanlık Basımevi.

TUTELYAN, V. A. Deoxynivalenol in cereals in Russia. **Toxicology Letters**, v.153, n.1, p.173–179, 2004.

TZORTZAKIS, N.; BORLAND, A.; SINGLETON, I.; BARNES, J. Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.45, p.317–325, 2007.

U.S. EPA. Environmental Protection Agency. Pesticides: Health and Safety. 2014. <http://www.epa.gov/pesticides/health/human.htm>

USDA. U.S. Department of Agriculture. National Organic Program (NOP). Agricultural Marketing Service. Nonagricultural (nonorganic) substances allowed as ingredients in or on

processed products labeled as “organic” or “made with organic”. 2011. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2011-title7-vol3/pdf/CFR-2011-title7-vol3-sec205-605.pdf>

UZUN, H.; IBANOGLU, E.; CATAL, H.; IBANOGLU, S. Effects of ozone on functional properties of proteins. **Food Chemistry**, v.134, p.647–54, 2012.

VARGA, E.; MALACHOVA, A.; SCHWARTZ, H.; KRŠKA, R.; BERTHILLER, F. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. **Food Additives and Contaminants Part A**, v.30, p.137–146, 2013.

VENDL, O.; CREWS, C.; MACDONALD, S.; KRŠKA, R.; BERTHILLER, F. Occurrence of free and conjugated Fusarium mycotoxins in cereal-based food. **Food Additives and Contaminants Part A**, v.27, p.1148–1152, 2010.

VIDAL, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food and Chemical Toxicology**, v.53, p.133–138, 2013.

VILLA, P.; MARKAKI, P. Aflatoxin B<sub>1</sub> and Ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment. **Food Control**, v.20, n.1, p.455–461, 2009.

VIOLLEAU, F.; PERNOT, A. G.; SUREL, O. Effect of Oxygreen wheat ozonation process on bread dough quality and protein solubility. **Journal of Cereal Sciences**, v.55, p.392–396, 2012.

WALTER, J.; MARTÍNEZ, I.; ROSE, D. J. **Holobiont nutrition Gut Microbes**, v.4, p.340–346, 2013.

WARTHA, B.; SULYOKA, M.; FRUHMANN, P.; BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; HAMETNER, C.; ADAMC, G.; FRÖHLICH, J.; KRŠKA, R. Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC–MS/MS based biomarker method. **Toxicology Letters**, v.211, n.1, p.85–90, 2012.

WCBBC. Workers’ Compensation Board of British Columbia. Library and Archives Canada Cataloguing in Publication Data. Ozone safe work practices. WCBBC, 2006.

WEB of Knowledge. Aflatoxin M<sub>1</sub>: Citations in Each Year. Disponível em: [apps.isiknowledge.com](http://apps.isiknowledge.com). Acessado em: Out., 2012.

WEI, K.; ZHOU, H.; ZHOU, T.; GONG, J. Comparison of aqueous ozone and chlorine as sanitizers in the food processing industry: Impact on Fresh Agricultural Produce Quality. **Ozone: Science & Engineering**, v.29, n.2, 2007.

WHO. World Health Organization. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide: global update 2005. Geneva World Heal. Organ. 1–22, 2006.

WHO. World Health Organization. Global Strategy for Food Safety: safer food for better health. Food Safety Programme. Geneva, 2002.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.5, p.351–372, 2014.

WU, J. G.; LUAN, T. G.; LAN, C. Y.; LO, W. H.; CHAN, G. Y. S. Efficacy evaluation of low-concentration of ozonated water in removal of residual diazinon, parathion, methyl-parathion and cypermethrin on vegetable. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.803–809, 2007.

YAZAR, S.; OMURTAG, G. Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, p.2062–2090, 2008.

YEOH, W. K.; ALI, A.; FORNEY, C. F.; KEAT, W. Effects of ozone on major antioxidants and microbial populations of fresh-cut papaya. **Postharvest Biology and Technology**, v.89, p.56–58, 2014.

YOUNG, J. C.; Zhu, H.; Zhou, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.417–24, 2006.

YUSA, V.; MILLET, M.; COSCOLLA, C.; ROCA, M. Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. **Analytica Chimica Acta**, v.891, p.15-31, 2015.

ZAIED, C.; ZOUAOUI, N.; BACHA, H.; ABID, S. Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. **Food Control**, v.28, n.1, p.106-109, 2012.

ZHANG, H.; WANG, B. Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during wheat milling and Chinese steamed bread processing. **Food Control**, v.44, p.86–91, 2014.

ZHAO L.; LIU, D., X. W. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.1115–1121, 2007.

ZHOU, B.; LI, Y.; GILLESPIE, J.; HE, G. Q.; HORSLEY, R.; SCHWARZ, P. Doehlert matrix design for optimization of the determination of bound deoxynivalenol in barley grain with trifluoroacetic acid (TFA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.10141–10149, 2007.

ZORLUGENÇ, B.; KIROĞLU ZORLUGENÇ, F.; ÖZTEKİN, S.; EVLIYA, I. B. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3593–3597, 2008.

## DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

### Artigos completos em periódicos

TROMBETE, F. M.; PORTO, Y.D.; FREITAS-SILVA, O.; PEREIRA, R.V.; DIREITO, G. M.; SALDANHA, T.; FRAGA, M.E. Efficacy of ozone treatment on mycotoxins and fungal reduction in artificially contaminated soft wheat grains. **Journal of Food Processing and Preservation**. Publicado Online. 2016.

TROMBETE, F.; MINGUITA, A.; PORTO, Y.; FREITAS-SILVA, O.; FREITAS-SÁ, D.; FREITAS, S.; CARVALHO, C.; SALDANHA, T.; FRAGA, M. Chemical, technological and sensory properties of wheat grains (*Triticum aestivum* L) as affected by gaseous ozonation. **International Journal of Food Processing**. Publicado Online. 2016.

TROMBETE, F. M.; FREITAS-SILVA, O.; SALDANHA, T.; VENÂNCIO, A. A.; FRAGA, M. E. Ozone against mycotoxins and pesticide residues in food: Current applications and perspectives. **International Food Research Journal**. Aceito para publicação em 2016.

TROMBETE, F.; BARROS, A.; VIEIRA, M.; SALDANHA, T.; VENÂNCIO, A.; FRAGA, M. Simultaneous determination of deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside and nivalenol in wheat grains by HPLC-PDA with immunoaffinity column cleanup. **Food Analytical Methods**. Publicado Online. 2016.

TROMBETE, F. M.; SALDANHA, T.; VENÂNCIO, A. A.; FRAGA, M. E. Current status of deoxynivalenol-3-glucoside in food: Public health relevance, methods of determination and occurrence in cereal grains. Em desenvolvimento para submissão na **Food Reviews International**.

TROMBETE, F.M.; MORAES, D.A.; PORTO, Y.D.; SANTOS, T.B.; DIREITO, G.M.; FRAGA, M.E.; SALDANHA, T. Determination of aflatoxins in wheat and wheat by-products intended for human consumption, marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, p. 671-674, 2014.

TROMBETE, F.M.; SANTOS, T.B.; DIREITO, G.M.; FRAGA, M.E.; SALDANHA, T. In-house validation of a method for determining aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in wheat and wheat by-products. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 255-262, 2014.

TROMBETE, F. M.; SALDANHA, T.; DIREITO, G.M.; FRAGA, M.E. Aflatoxinas y tricotecenos en trigo y derivados: incidencia de la contaminación y métodos de determinación. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 40, p. 181-188, 2013.

### Resumos apresentados em congressos, seminários e encontros

TROMBETE, F.M.; PORTO, Y.D.; FREITAS-SILVA, O.; PEREIRA, R.V.; DIREITO, G. M.; SALDANHA, T.; FRAGA, M.E. Reduction of aflatoxins and deoxynivalenol on wheat grains (*Triticum aestivum*) by gaseous ozone. In: **SPASS 2015 - Qualidade Nutricional & Processamento Alimentar**, 2015, Lisboa.

VAQUEIRO, R.P.; TROMBETE, F.M.; PORTO, Y.D.; DIREITO, G.M.; FRAGA, M.E.; SALDANHA, T. Aflatoxins in whole-wheat flours and refined wheat flours marketed in Rio de Janeiro, Brazil. In: **Simpósio de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos do CEFET/RJ**, 2015, Valença-RJ.

TROMBETE, F.M.; SANTOS, T.B.; SALDANHA, T.; FRAGA, M.E. Determinação de aflatoxinas totais em farelo de trigo para consumo humano comercializado no Rio de Janeiro, RJ. In: **XIX Semana Acadêmica e IV Jornada Científica de Engenharia de Alimentos**, 2013, Seropédica-RJ.

TROMBETE, F.M.; FRAGA, M.E.; SALDANHA, T. Otimização da técnica de ozonização em grãos de trigo: Potencial de degradação de micotoxinas e influência na qualidade química e tecnológica. In: **VII Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ**, 2012, Seropédica-RJ.