

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

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

DISSERTAÇÃO

**Ozonização em Canjiquinha de Milho e seu Efeito nos
Níveis de Aflatoxinas, Contagem de Fungos e Qualidade do
Alimento**

Yuri Duarte Porto

2017



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

**OZONIZAÇÃO EM CANJIQUINHA DE MILHO E SEU EFEITO NOS
NÍVEIS DE AFLATOXINAS, CONTAGEM DE FUNGOS E
QUALIDADE DO ALIMENTO**

YURI DUARTE PORTO

Sob a Orientação do Professor

José Luis Ramirez Ascheri

e Co-orientação do Professor

Otniel Freitas Silva

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

Seropédica, RJ
Abril de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Porto, Yuri Duarte, 1986-
P839o Ozonização em Canjiquinha de Milho e seu Efeito nos
Níveis de Aflatoxinas, Contagem de Fungos e Qualidade
do Alimento / Yuri Duarte Porto. - 2017.
86 f.: il.

Orientador: José Luiz Ramirez Ascheri.
Coorientador: Otniel Freitas Silva.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2017.

1. Micotoxinas. 2. Segurança de Alimentos. 3.
Ozonização. 4. Milho. 5. Processos Avançados de
Oxidação. I. Ascheri, José Luiz Ramirez, 1955-,
orient. II. Silva, Otniel Freitas, 1966-, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos. IV. Título.

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

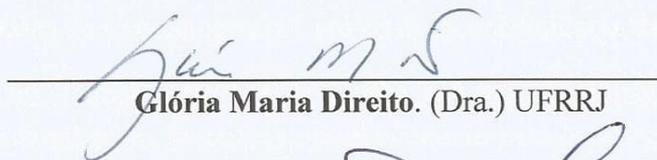
YURI DUARTE PORTO

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

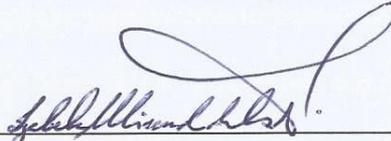
DISSETAÇÃO APROVADA EM 06/04/2017



**José Luis Ramirez Ascheri. (PhD.) EMBRAPA Agroindústria de Alimentos
(Orientador)**



Glória Maria Direito. (Dra.) UFRRJ



Izabela Miranda de Castro (Dra.) EMBRAPA Agroindústria de Alimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder saúde, disposição e permitir crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos – CTAA da Embrapa Agroindústria de Alimentos pela oportunidade de estudar e desenvolver este trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão de recursos fundamentais para realização da presente pesquisa, vinculada ao projeto "Degradação de Micotoxinas por Métodos Emergentes" (FAPERJ/ ADT1-190-168/2010).

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Pesquisador Dr. José Luis Ramirez Ascheri pela orientação e confiança na conclusão do trabalho.

Ao Pesquisador Dr. Otniel Freitas Silva por acreditar em meu potencial, pela oportunidade, pela valiosa total colaboração, pelos conhecimentos transmitidos e, especialmente, pela convivência.

À Professora Dra. Glória Maria Direito por todo conhecimento passado, pela atenção, apoio, suporte, parceria, ajuda e por tantas coisas mais que ficaria difícil enumerar aqui.

À Professora Dra. Tatiana Saldanha pelo suporte e material concedido utilizado para realização dos ensaios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência durante todo experimento.

À Pesquisadora Dra. Izabela Miranda de Castro por todo acompanhamento, apoio durante todas as etapas de ozonização, incentivo e conhecimento para enriquecer a pesquisa.

Às analistas Alessandra da Silva Teixeira e Marianna dos Anjos do Laboratório de Micotoxinas do CTAA pelo suporte que me foi dado.

Aos meus valiosos amigos.

À minha incrível mãe Elba e meu pai, Marcio, meus irmãos, Fabiana e Leonardo, e minha querida namorada, Graciela, agradeço por toda paciência, incentivo e suporte incansável e incondicional, principalmente nos momentos mais difíceis quando eu mais precisei.

Ao Professor Dr. Francisco de Assis Baroni principalmente pela amizade, ensinamento, exemplo, inspiração para que eu possa sempre ir mais longe nas minhas realizações.

Ao meu grande amigo Dr. Felipe Machado Trombete agradeço simplesmente por tudo. Paciência, incentivo e aprendizado durante os dias das rotinas do laboratório e fora também. Sua absoluta parceria durante toda pesquisa foi fundamental para a construção, execução e conclusão deste trabalho tão importante para minha vida pessoal e profissional.

RESUMO

PORTO, Yuri Duarte. **Ozonização em canjiquinha de milho e seu efeito nos níveis de aflatoxinas, contagem de fungos e qualidade do alimento.** 2017. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

O milho é um dos cereais mais cultivados no Brasil e está exposto à contaminação por micotoxinas que são metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos. A adoção de sistemas de gestão da qualidade durante a cadeia de produção de milho é essencial para garantir a segurança do alimento quanto à contaminação por micotoxinas. Contudo, há possibilidade desses metabólitos reconhecidamente carcinogênicos já encontrarem-se na matriz. Daí a busca por soluções alternativas capazes de reduzir a contaminação para níveis seguros pela aplicação de tecnologias emergentes tem sido intensa. Os métodos de descontaminação de alimento devem obedecer algumas premissas como: inativar, destruir, ou remover as toxinas; não produzir resíduos tóxicos; manter o valor nutricional e a aceitabilidade do produto. O ozônio atende quase todas estas características, é reconhecido pelo United States Food and Drug Administration (FDA) como uma substância GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) para uso como sanitizante no processamento de alimentos. Desde então sua utilização tem sido pesquisada em diversos tipos de alimentos, incluindo cereais contaminados por micotoxinas. A canjiquinha de milho é um alimento cultural de fácil aquisição pelo consumidor brasileiro pelo baixo preço, além de representar um potencial risco de exposição por contaminação com aflatoxinas. Neste estudo, alíquotas de amostras de canjiquinha foram inoculadas concentrações de 10^6 UFC/g de conídios de *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. previamente isolados do alimento. Outras alíquotas foram contaminadas com aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 na concentração de 50 µg/kg para cada. A aplicação de ozônio gasoso foi testada em diferentes combinações de tempo de exposição, concentração do ozônio e massa de canjiquinha, sendo essas as variáveis independentes pesquisadas. Após tratamento por ozonização, para avaliação dos efeitos sobre as concentrações de aflatoxinas, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (sistema CLAE-DF) com derivatização pré-coluna (C₁₈) por ácido trifluoroacético (TFA). O método analítico utilizado neste estudo foi otimizado e parâmetros como a exatidão, precisão, linearidade da faixa de trabalho, seletividade, limites de detecção e limites de quantificação do método analítico foram previamente avaliados. Adicionalmente efetuaram-se ensaios para quantificação das aflatoxinas em amostras comerciais de canjiquinha de milho. O método mostrou-se adequado e apresentando valores de recuperação dentro da faixa de 80-110% com coeficiente de variação menor que 15%, sendo os limites de detecção e quantificação iguais a 0,8 e 3,6 µg/Kg, respectivamente, para cada uma das aflatoxinas. O isolamento de fungos foi realizado de acordo com as normas do Ministério da Agricultura. Assim a avaliação da eficácia da ozonização gasoso sobre os níveis de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e sobre a contaminação microbiana dos grãos de canjiquinha apresentou reduções de até 57% nos níveis de aflatoxinas. A contagem de fungos totais teve uma redução de cerca de 3,0 ciclos log UFC/g e a contagem total de mesófilos foram reduzidas a níveis não detectáveis. Estes resultados demonstraram que a ozonização é uma alternativa eficaz para reduzir a contaminação microbiana e a concentração de aflatoxinas em canjiquinha de milho e, conseqüentemente, melhora a segurança desse produto.

Palavras-chave: Canjiquinha, Ozônio, Aflatoxinas

ABSTRACT

PORTO, Yuri Duarte. **Ozonation on corn grits and its effects on aflatoxins levels, fungi counts and food quality**. 2017. 74 p. Dissertation (Master in Food Science) - Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

Corn is one of the most cultivated cereals in Brazil and it is susceptible to contamination by mycotoxins that are toxic secondary metabolites produced by fungi. An adoption of quality management systems during a corn production chain is essential to ensure food safety concerning mycotoxin contamination. However, there is a possibility that these recognized carcinogenic metabolites may already be found in the matrix. Hence the search for alternative solutions capable of reducing contamination to safe levels by the application of emerging technologies has been intense. The methods of decontamination of foods must to obey some premises as: inactivate, destroy or remove the toxins; do not produce others toxic waste; maintain the nutritional value and acceptability of the product. Ozone, which meets almost all of these characteristics, is recognized by the Food and Drug Administration as a GRAS (Generally Recognized as Safe) product for use as a sanitizer in food processing. Since then its use has been investigated in several types of food, including cereals contaminated by mycotoxins. Corn *canjiquinha* is a cultural food easily accessible by Brazilian consumers at low prices, as well as posing a potential risk of exposure due to contamination with aflatoxins. In this study, aliquots of *canjiquinha* samples were inoculated with concentrations of 10^6 CFU/g conidia of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. previously isolated from this food. Other aliquots were contaminated with aflatoxins B1, B2, G1 and G2 at a concentration of 50 µg/kg for each. The application of gaseous ozone was tested in different combinations of exposure time, ozone concentration and *canjiquinha* mass, being these independent variables investigated. After treatment by ozonation, to evaluate the effects on aflatoxin concentrations, the samples were analyzed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD system) with pre-column derivatization (C_{18}) by trifluoroacetic acid (TFA). The analytical method used in this study was optimized and parameters such as accuracy, precision, linearity, selectivity, limits of detection and limits of quantification of the analytical method were previously evaluated. Additionally, aflatoxin quantification tests were carried out on commercial samples of corn kernels. The method was adequate and presented recovery values within the range of 80-110% with a coefficient of variation of less than 15%, with detection and quantification limits equal to 0.8 and 3.6 µg/kg, respectively, for each of the aflatoxins. Isolation of fungi was carried out according to the criteria of the Brazilian Ministry of Agriculture. Thus, the efficacy of gaseous ozonation on aflatoxin levels B1, B2, G1 and G2 and on microbial contamination of *canjiquinha* grains showed reductions of up to 57% in aflatoxin levels. The total fungal count had a reduction of about 3.0 log cycles UFC/g and the total counts of mesophiles were reduced to undetectable levels. These results demonstrated that ozonation is an effective alternative to reduce microbial contamination and the concentration of aflatoxins in corn kernels and, consequently, can improves the safety of this product.

Keywords: Corn grits, Ozone, Aflatoxins

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estruturas químicas das aflatoxinas | 08 |
| Figura 2 – Formas canônicas do híbrido de ressonância representativo da molécula de ozônio | 10 |
| Figura 3 – Esquema do sistema tipo descarga corona de geração de ozônio | 11 |
| Figura 4 – Gerador de Ozônio Modelo O&L3.0 RM | 22 |
| Figura 5 – Esquema ilustrado do sistema de ozonização dos grãos de canjiquinha de milho | 23 |
| Figura 6 – Sistema de ozonização utilizado na pesquisa | 23 |
| Figura 7 – Curvas analíticas obtidas por padronização externa através de 5 pontos de diferentes concentrações dos padrões das aflatoxinas | 31 |
| Figura 8 – Produção de ozônio (g/h) a partir da variação da posição do dosador de voltagem do ozonizador. | 32 |
| Figura 9 – Redução de aflatoxinas, expressos em %, após ozonização | 46 |
| Figura 10 – Gráfico de Pareto para a variável degradação de aflatoxinas totais | 47 |
| Figura 11 – Superfícies de resposta para a degradação de aflatoxinas, através da ozonização. Influência das variáveis independentes tempo e concentração | 48 |
| Figura 12 – Contagem de fungos filamentosos totais (log ₁₀ UFC/g), em amostras de canjiquinha de milho ozonizadas e amostras controle | 50 |
| Figura 13 – Gráfico de Pareto para a variável “redução de fungos em amostras adicionadas com conídios de <i>Aspergillus</i> spp” | 51 |
| Figura 14 – Gráfico de Pareto para a variável “redução de fungos em amostras adicionadas com conídios de <i>Fusarium</i> spp” | 51 |
| Figura 15 – Gráfico de médias para a variável redução de fungos totais em amostras adicionadas de conídios de <i>Fusarium</i> spp | 52 |
| Figura 16 – Gráfico de médias para a variável redução de fungos totais em amostras adicionadas de conídios de <i>Aspergillus</i> spp | 53 |
| Figura 17 – Notas médias de diferença obtidas em escala variando de 1-nenhuma diferença a 5- extremamente diferente, pelo método de comparação múltipla para o parâmetro “aroma” | 55 |
| Figura 18 – Notas médias de diferença obtidas em escala variando de 1-nenhuma diferença a 5- extremamente diferente, pelo método de comparação múltipla para o parâmetro “aparência geral” | 56 |
| Figura 19 – Resultados da análise de colorimetria. Parâmetro L* | 57 |
| Figura 20 – Resultados da análise de colorimetria. Parâmetro a* | 57 |
| Figura 21 – Resultados da análise de colorimetria. Parâmetro b* | 58 |
| Figura 22 – Resultados da análise de acidez total titulável | 58 |
| Figura 23 – Resultados da análise de pH | 59 |
| Figura 24 – Resultados da análise de umidade | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Principais espécies responsáveis pela produção de micotoxinas..... | 06 |
| Tabela 2 – Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação..... | 10 |
| Tabela 3 – Propriedades físico-químicas do ozônio..... | 10 |
| Tabela 4 – Matriz do delineamento experimental com valores codificados e reais..... | 24 |
| Tabela 5 – Média dos ensaios de recuperação em canjiquinha de milho adicionada com 5, 20 e 50 µg/Kg de cada uma das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2..... | 30 |
| Tabela 6 – Faixa de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação (R ²) e limites de detecção e quantificação de metodologia para quantificação de aflatoxinas em canjiquinha..... | 32 |
| Tabela 7 – Calibração do ozonizador para produção de diferentes concentrações de ozônio (mg/L)..... | 33 |
| Tabela 8 – Incidência das aflatoxinas nas amostras comerciais analisadas..... | 33 |
| Tabela 9 – Níveis de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e aflatoxinas totais nas amostras positivas..... | 35 |
| Tabela 10 – Concentração de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e aflatoxinas totais detectadas em cada amostra positiva..... | 36 |
| Tabela 11 – Consumo alimentar médio <i>per capita</i> dos diferentes alimentos mais consumidos no Brasil (IBGE)..... | 39 |
| Tabela 12 – Consumo alimentar médio <i>per capita</i> nacional, concentração média de aflatoxina B1 detectada na canjiquinha do presente estudo, estimativa da exposição e caracterização do risco..... | 40 |
| Tabela 13 – Consumo alimentar médio <i>per capita</i> por zona..... | 40 |
| Tabela 14 – Consumo alimentar médio <i>per capita</i> por grandes regiões..... | 41 |
| Tabela 15 – Consumo alimentar médio <i>per capita</i> por classes de rendimento total e variação patrimonial familiar <i>per capita</i> | 41 |
| Tabela 16 – Resultados da estimativa da exposição e caracterização do risco de aflatoxina B1 nos diferentes grupos expostos, segundo consumo diário per capita de milho e preparações nos níveis médios de contaminação de aflatoxina B1 detectados nesse estudo..... | 42 |
| Tabela 17 – Resultados da estimativa da exposição e caracterização do risco de aflatoxina B1 nos diferentes grupos expostos pela aflatoxina B1, segundo consumo diário per capita dos alimentos a base de leite..... | 43 |
| Tabela 18 – Níveis de aflatoxinas presentes na amostra de milho controle e nas amostras ozonizadas..... | 45 |
| Tabela 19 – Contagem de fungos filamentosos totais em amostras ozonizadas e amostras controle..... | 49 |
| Tabela 20 – Resultado da análise de microrganismos mesofílicos totais em amostras de canjiquinha de milho ozonizadas e amostra padrão..... | 54 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| AF | Aflatoxina |
| ALARA | As Low As Reasonably Achievable |
| ANAVA | Análise de variância |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists |
| APHA | American Public Health Association |
| Aw | Atividade de água |
| BPA | Boas práticas agrícolas |
| CCD | Cromatografia de camada delgada |
| CE | Comissão Europeia |
| CFT | Contagem de fungos totais |
| CFU | Colony-forming unit |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DF | Detector de fluorescência |
| DRBC | Dichloran rose bengal chloramphenicol |
| EFSA | European food safety authority |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FDA | US Food and Drug Administration |
| FSA | Food Safety Authority |
| GRAS | Generally recognized as safe |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IAL | Instituto Adolfo Lutz |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IDA | Ingestão diária aceitável |
| LD | Limite de detecção |
| LMP | Limite máximo permitido |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MEA | Malt extract agar |
| meOH | Metanol |
| OES | Optical emission spectrometry |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OTA | Ocratoxina A |
| PDA | Potato dextrose agar |
| RASFF | Rapid alert system for food and feed |
| Rpm | Rotações por minuto |
| TFC | Total fungal count |
| UFC | Unidade formadora de colônias |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1. Objetivos | 02 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 04 |
| 2.1. Milho | 04 |
| 2.2. Fungos toxigênicos | 05 |
| 2.3. Micotoxinas | 07 |
| 2.4. Aflatoxinas | 07 |
| 2.5. Descontaminação em alimentos | 08 |
| 2.6. Características do ozônio | 09 |
| 2.7. Geração do ozônio | 10 |
| 2.8. Aplicação do ozônio | 11 |
| 2.9. Descontaminação pela ação do ozônio | 12 |
| 2.10. Considerações sobre aplicação do ozônio | 13 |
| 2.11. Aplicação do ozônio em alimentos contaminados com micotoxinas | 14 |
| 2.12. Segurança da aplicação e legislação | 16 |
| 2.13. Avaliação de risco da exposição humana a aflatoxinas na dieta | 17 |
| 2.14. Ocorrência de aflatoxinas em produtos derivados do milho | 17 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 3.1. Padrões, solventes e reagentes | 19 |
| 3.2. Amostras | 19 |
| 3.3. Parâmetros de validação estudados | 19 |
| 3.4. Metodologia de extração adotada | 20 |
| 3.5. Derivatização das aflatoxinas | 21 |
| 3.6. Quantificação das aflatoxinas e condições cromatográficas | 21 |
| 3.7. Detecção das aflatoxinas nas amostras comerciais | 21 |
| 3.7.1. Caracterização do risco de exposição pela aflatoxina B1 em diferentes grupos de consumidores | 21 |
| 3.8. Condições do processo de ozonização | 22 |
| 3.9. Ensaio para ozonização | 24 |
| 3.9.1. Delineamento experimental | 24 |
| 3.9.2. Contaminação das amostras com fungos | 25 |
| 3.9.3. Contaminação das amostras com aflatoxinas | 25 |
| 3.10. Avaliação microbiológica dos efeitos da ozonização | 26 |
| 3.10.1. Fungos filamentosos totais | 26 |
| 3.10.2. Microrganismos mesófilos totais | 26 |
| 3.10.3. Concentrações de aflatoxinas | 26 |
| 3.11. Efeitos da ozonização nas características físico-químicas da canjiquinha de milho | 27 |
| 3.11.1. Determinação do pH | 27 |
| 3.11.2. Determinação da acidez total titulável | 27 |
| 3.11.3. Determinação do teor de umidade e atividade de água | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.11.4. Avaliação da influência na cor | 28 |
| 3.11.5. Avaliação das características sensoriais | 28 |
| 3.12. Análise estatística | 28 |
| | |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| | |
| 4.1. Amostras | 29 |
| 4.2. Método | 29 |
| 4.2.1. Métodos testados para a extração e quantificação das aflatoxinas | 29 |
| 4.2.2. Validação dos parâmetros analíticos | 29 |
| 4.3. Calibração do ozonizador e quantificação do ozônio produzido | 32 |
| 4.4. Determinação de aflatoxinas em amostras comerciais | 33 |
| 4.4.1. Consumo do Milho | 39 |
| 4.5. Influência da ozonização nos níveis de aflatoxinas | 44 |
| 4.6. Efeitos da ozonização na redução de fungos filamentosos totais | 49 |
| 4.7. Efeitos da ozonização na contagem de microrganismos mesófilos totais | 53 |
| 4.8. Resultados da análise de qualidade | 55 |
| 4.8.1. Avaliação sensorial | 55 |
| 4.8.2. Resultado da análise de cor | 56 |
| 4.8.3. Acidez total titulável | 58 |
| 4.8.4. pH | 59 |
| 4.8.5. Umidade e atividade de água | 59 |
| | |
| 5 CONCLUSÕES | 61 |
| | |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo, ficando apenas atrás dos Estados Unidos e China. A estimativa de produção de milho para o ano de 2017 é cerca de 87 milhões de toneladas, bem como para os estoques finais da safra 2016/2017 estão previstos cerca de 15 milhões de toneladas, o maior a ser registrado. No centro sul do país encontram-se os estados que mais contribuem com a produção nacional, sendo eles o Mato Grosso, Paraná e Minas Gerais (CONAB, 2017).

Os grãos do milho são extensivamente utilizados como alimento humano e animal devido às suas qualidades nutricionais, como seu alto teor de amido, proteínas, ácidos graxos, vitaminas e minerais (NUSS & TANUMIHARDJO, 2011; FAO, 1992). Apesar de reconhecido valor nutricional, mundialmente o segmento de alimentação animal é o principal destino dado ao milho. Esse consumo é representado pela avicultura, bovinocultura, aquicultura e suinocultura, onde o milho é um dos principais ingredientes nas rações (EMBRAPA, 2017).

Por ser um país predominantemente de clima tropical, o armazenamento de grãos no Brasil pode favorecer o crescimento de fungos toxigênicos nos grãos de milho e seus derivados, quando não realizado de forma correta. A presença desses fungos pode resultar em perdas econômicas, por tornar o grão impróprio para consumo, afetando sua qualidade, além dos danos que as micotoxinas produzidas por algumas espécies de fungo podem causar à saúde humana e animal, configurando um problema de interesse em saúde pública. Para contornar esse tipo de problema e evitar a contaminação dos grãos por fungos potencialmente toxigênicos é necessário realizar os procedimentos de Boas Práticas Agrícolas como a de manuseio adequado durante as fases de colheita, pós-colheita, armazenamento, transporte, distribuição comercialização e consumo, pois em qualquer dessas etapas pode-se haver contaminação microbiológica (FREITAS-SILVA et al, 2013).

As micotoxinas são metabólitos secundários e àquelas encontradas com maior incidência no milho são sintetizadas principalmente por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* spp (KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006). As espécies de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* são as principais produtoras das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, consideradas como as micotoxinas que mais causam danos à saúde por possuir propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas e imunossupressoras (ARIANA et al., 2011).

A contaminação com micotoxinas nos grãos de milho podem ocorrer em qualquer fase da cadeia produtiva, desde o cultivo do grão no campo até o armazenamento do produto. A forma de contaminação pode ser direta quando o fungo cresce, sintetiza a micotoxina e ambos permanecem no produto, ou indireta, quando o fungo é eliminado no processamento, porém a micotoxina previamente sintetizada permanece no alimento (FREIRE et al., 2007).

Diversas pesquisas têm sido realizadas para busca de métodos alternativos de descontaminação de alimentos que possam ser capazes de remover, destruir ou reduzir as toxinas a níveis considerados aceitáveis para consumo, sem que os efeitos do tratamento alterem as características químicas e qualidade daquele alimento. A ozonização tem sido um método alternativo pesquisado e utilizado para destoxificação de micotoxinas e para eliminação de microrganismos em alimentos, onde tem apresentado resultados promissores. O ozônio (O₃) possui alto poder de oxidação, pode ser aplicado na forma gasosa ou dissolvido em água (solução aquosa), é de fácil obtenção pelo baixo custo de produção, seu produto de deterioração é o oxigênio (O₂) não deixando resíduos tóxicos após sua utilização, quando utilizado em alimentos altera pouco as características químicas e sensoriais, constituindo uma alternativa vantajosa na sua utilização pela indústria de alimentos. Este gás está sendo utilizado na agropecuária, tanto na manipulação e processamento de frutas, carnes, lavagem e

esterilização de vegetais, assim como é utilizado em depósitos e silos para proteger e preservar frutas, hortaliças, carnes e cereais (CHIATONE et al, 2008; ROZADO et al, 2008; GUZEL-SEYDIM et al, 2004; KIM et al, 1999).

A indústria de alimentos produz diversos produtos derivados do milho, alguns dos mais consumidos no Brasil são a farinha de milho, canjica, canjiquinha e o fubá (GONÇALVES et al., 2003). Riscos de contaminação por aflatoxinas em produtos derivados do milho como a canjiquinha e canjica são de bastante importância, pois são alimentos de fácil obtenção pelo preço acessível, são apreciados na culinária brasileira, além de ser componente básico na dieta das camadas mais carentes da população (IBGE, 2011). No ano de 2011 foi estabelecido o limite máximo tolerado de 20 µg/Kg para aflatoxinas totais (B₁ + B₂ + G₁ + G₂) em qualquer produto derivado do milho no país (BRASIL, 2011). Ainda assim, pesquisas continuam a mostrar contaminações por aflatoxinas principalmente no milho e por vezes em seus produtos derivados, mesmo dentro dos limites aceitáveis, constitui ampla exposição de riscos não somente à saúde do consumidor humano como também a dos animais causando efeitos negativos a produção e a economia (FERREIRA et al., 2013; BENTO et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2010; MATTOS et al., 2009; RAMOS et al., 2008; AMARAL et al., 2006; KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006).

Para pesquisa de controle e monitoramento de alimentos expostos constantemente à contaminação é necessária que técnicas analíticas tenham características como sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão. As metodologias analíticas adotadas na determinação de micotoxinas em alimentos geralmente possuem etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação. Àquelas comumente utilizadas nas pesquisas são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e quite de detecção baseados em reações imunoenzimáticas (ELISA). A escolha do método utilizado na pesquisa pode depender de diversos fatores como a viabilidade econômica, objetivo e objeto da análise e equipe executora (TROMBETE et al., 2014).

Há a necessidade de novos estudos visando o aprimoramento de técnicas já existentes ou o desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliem na melhoria da qualidade química dos alimentos, prevenindo a contaminação microbiológica e formação de seus produtos tóxicos. O presente trabalho pretendeu estudar os efeitos da aplicação de ozônio gasoso sobre a canjiquinha de milho fortificada com as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e conídios de *Aspergillus* e *Fusarium* spp de modo a se estabelecer a relação entre três variáveis: (1) concentração do ozônio, (2) tempo de exposição pelo ozônio e (3) massa de canjiquinha de milho ozonizada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 GERAL:

Avaliar a ação do ozônio gasoso sobre a degradação das aflatoxinas em canjiquinha de milho, sobre a microbiota presente e sobre a influência nas características químicas e sensoriais do alimento.

1.1.2 ESPECÍFICOS:

1. Validação de metodologia para quantificação das aflatoxinas por CLAE-DF com derivatização pré-coluna;
2. Montagem de um protótipo em nível de bancada para ozonização de amostras de canjiquinha de milho e otimização das condições específicas para ozonização da mesma;

3. Avaliar os efeitos da ozonização da canjiquinha de milho correlacionando os diferentes níveis de concentração e tempo de exposição pelo ozônio, e massa de canjiquinha ozonizada sobre a redução dos níveis de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2);
4. Avaliar os efeitos da ozonização da canjiquinha de milho correlacionando os diferentes níveis de concentração e tempo de exposição pelo ozônio, e massa de canjiquinha ozonizada sobre a redução de células de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* spp e microrganismos mesófilos totais;
5. Avaliar a ocorrência de aflatoxinas em amostras comerciais de canjiquinha e canjica de milho adquiridos no mercado varejista do Rio de Janeiro – RJ, e caracterizar o risco de exposição do consumidor brasileiro a aflatoxina B1 pela dieta destes produtos;
6. Avaliar os efeitos da ozonização na qualidade físico-química da canjiquinha;
7. Avaliar a qualidade sensorial sobre os efeitos da ozonização no aroma e aparência da canjiquinha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Milho

O milho (*Zea mays*) é uma monocotiledônea e teve origem nas Américas, possivelmente no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos, se espalhando por mais países latino-americanos. Cultivado de maneira ainda primitiva cerca de 3000 a 3500 a.C. nos planaltos mexicanos, o milho chegou ao Peru dois mil anos depois e desempenhou papel fundamental como alimento que garantiu desenvolvimento e sobrevivência de densidades populacionais da civilização pré-colombiana (LERAYER; MARQUES, 2006). Após os eventos do descobrimento do continente americano, o milho foi levado para a Europa e mais tarde passou a ser plantado em escala comercial difundindo-se pelo mundo abrangendo terras cultiváveis para essa cultura desde a latitude de 58° norte (Rússia) até 40° sul (Argentina) (FORNASIERI-FILHO, 2007).

No Brasil, o cultivo do milho é considerado uma das principais culturas produzidas no país. Estima-se que em 2017 aproximadamente 87 milhões de toneladas de grãos serão produzidas, quantidade suficiente para representar o terceiro lugar no ranking mundial de produtores. Além disso, a produção desta cultura na agricultura brasileira ganha importante destaque na economia, onde ocupa uma das maiores áreas plantadas dentre as culturas agrícolas. As principais regiões produtoras de milho no Brasil são o norte do Paraná, o Triângulo Mineiro, oeste de São Paulo e Vale do Taquari, no Rio Grande do Sul. Apesar da elevada produção nacional é importante ressaltar que as importações desse cereal ainda são realizadas para atender completamente as necessidades internas (ABIMILHO, 2017).

A produção de milho no Brasil tem-se caracterizado pela divisão da produção em duas épocas de plantio. Os plantios de verão, ou primeira safra, são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste. Na região Nordeste, esse período ocorre no início do ano. A safrinha refere-se ao milho de sequeiro, plantado extemporaneamente, em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo (EMBRAPA – MILHO E SORGO, 2007).

Estudos das projeções de produção do cereal de milho realizado pela Assessoria de Gestão Estratégica do Mapa indicam aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020. O Brasil está entre os países que terão aumento significativo das exportações de milho, ao lado da Argentina. O crescimento será obtido por meio de ganhos de produtividade. Enquanto a produção de milho está projetada para crescer 2,67% ao ano nos próximos anos, a área plantada deverá aumentar 0,73%, (MAPA, 2013).

O milho traz em sua composição vitaminas A e do complexo B, proteínas, carboidratos, cálcio, ferro, fósforo, potássio, óleo e grandes quantidades de açúcares, gorduras, celulose e calorias. As porcentagens podem ser encontradas na média de 73% de carboidratos, 8-13,7% de proteína, 4-5,4% de ácidos graxos, o restante de minerais e vitaminas (NUSS & TANUMIHARDJO, 2011; FAO, 1992). Essa constituição propicia que esse cereal seja utilizado para alimentação animal na forma “*in natura*” como forragem conservada para o período de seca, na fabricação de farelos e também na alimentação humana, como amido, farinhas e óleo, além de participar como matéria prima de muitos outros tipos de produtos (GWIRTZ & GARCIA CASAL, 2014; NAMA, 2014).

A falta de Boas Práticas Agrícolas (BPA) associadas às condições tropicais de temperatura e umidade elevadas propicia o desenvolvimento fúngico, principalmente no milho, que constitui um ótimo substrato, rico em carboidratos. Durante o armazenamento, essa atividade fúngica, pode levar a rápida deterioração na qualidade nutricional dos grãos e à contaminação por micotoxinas (FREITAS-SILVA et al., 2013; MAGAN; ALDRED, 2007).

2.2 Fungos Toxigênicos

Os fungos têm sido evidenciados como responsáveis por perdas econômicas de relevância quando se trata da produção de alimentos, representado uma série de prejuízos econômicos em todo o mundo (SCUSSEL et al., 2010). O impacto causado principalmente pela toxina produzida por diversos gêneros de fungos abrange desde a queda na produtividade animal até sérios problemas para saúde humana pela ingestão dos alimentos contaminados (FEDERN et al., 2013; RITTER et al., 2011, FREIRE et al., 2007). Fungos produtores de micotoxinas podem ser classificados como fungos de campo que compõe a microbiota do alimento antes da colheita; fungos de armazenamento que se desenvolvem durante o armazenamento do alimento e são os principais responsáveis pela deterioração dos cereais, matérias primas e das rações, e fungos de decomposição que são os que tornam os alimentos impróprios para o consumo (SCUSSEL et al., 2010; MÍDIO, MARTINS, 2000).

Os principais fungos toxigênicos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* que são considerados os de maior importância para alimentos e rações, por serem os mais frequentes e os maiores produtores de micotoxinas (MURATORI et al, 2013; ZAIN, 2011). Os fungos com potencial toxigênico em grãos de milho apontam uma perceptiva predominância do gênero *Fusarium*, seguido de *Penicillium* e *Aspergillus* como contaminantes desse cereal e em seus derivados (CARDOSO et al., 2011; MAZIERO & BERSOT, 2010; GOULART & FIALHO, 1999).

No Brasil, as micotoxinas comumente encontradas são produzidas principalmente por espécies de *Fusarium* (fumonisinas e zearalenona), seguido de *Penicillium* (ocratoxina A) e *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina A) (KAWASHIMA; SOARES, 2006). Na Tabela 1 são apresentadas as principais espécies responsáveis pela produção de micotoxinas em alimentos.

Tabela 1 - Principais espécies responsáveis pela produção de micotoxinas.

| Micotoxinas | Espécies produtoras (exemplo) |
|-----------------------------|---|
| Aflatoxinas | <i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i> |
| Ocratoxina A | <i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>A. alliaceus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>P. nordicum</i> |
| Tricotecenos | <i>Fusarium spp.</i> <i>Myrotherium sp.</i> <i>Trichothecium sp.</i> <i>Calonectria sp.</i> <i>Stachybotrys sp.</i> <i>Cephalosporium sp.</i> <i>Verticimonosporium sp.</i> |
| Deoxinivalenol (DON) | <i>Fusarium roseum</i> ; <i>F. graminearum</i> |
| Zearalenona | <i>F. graminearum</i> ; e outros <i>Fusarium spp.</i> |
| Fumonisinás | <i>Fusarium moliniforme</i> ; <i>Fusarium proliferatum</i> |
| Citrinina | <i>Penicillium citrininum</i> ; <i>P. expansum</i> ; <i>P. verrucosum</i> |
| Ácido penicílico | <i>A. ochraceus</i> ; <i>P. aurantiogriseum</i> ; <i>P. viridicatum</i> |
| Patulina | <i>P. expansum</i> ; <i>P. griseofulvum</i> ; <i>A. clavatus</i> |
| Esterigmatocistina | <i>Aspergillus versicolor</i> ; <i>Esmericella nidullans</i> |
| Ácido tenuazônico | <i>Alternaria alternata</i> |
| Penitrem A | <i>Penicillium crustosum</i> |
| Alcalóides do Ergot | <i>Claviceps spp.</i> |
| Ácido ciclopiazônico | <i>A. flavus</i> ; <i>A. tamarii</i> ; <i>P. commune</i> |

Fonte: SERRA, 2005

O gênero *Aspergillus* habita uma ampla variedade de ambientes como o solo e os alimentos. Algumas espécies têm importância econômica na produção alimentícia, porém também podem causar impacto negativo na economia tanto pela produção de toxinas potentes, quanto pela deterioração de alimentos (RIIBEIRO et al., 2003). Essas micotoxinas são principalmente produzidas pelas espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* que são amplamente distribuídos no ambiente e potencialmente capazes de produzir contaminação direta em uma grande variedade de alimentos como cereais, tortas de oleaginosas, mandioca,

arroz, frutas, frutos desidratados, produtos de salsicharia, vinhos, leguminosas, leite e derivados (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010; REDDY et al., 2009; ROIGÉ et al., 2009).

2.3 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que podem contaminar os grãos de cereais no campo, durante a colheita e no armazenamento, em condições bioclimáticas favoráveis como chuvas excessivas, danos por insetos, estresse da planta e armazenamento inadequado (FREITAS-SILVA et al., 2013). A molécula das micotoxinas apresenta de modo geral grande estabilidade química que permite sua permanência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos normais de industrialização como congelamento, pasteurização, cozimento, secagem e salga (TRISTAN, 2002).

A ocorrência de micotoxinas é de grande importância na área de alimentos, pois afeta o agronegócio de muitos países interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, além de causar redução na produção animal e agrícola além de afetar de forma prejudicial à saúde humana (LEUNG et al., 2006; PEREIRA et al., 2005).

A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente pelo consumo de produtos oriundos de vegetais contaminados, porém alimentos como o leite, queijo, carnes e outros produtos derivados de origem animal também podem oferecer esse risco que agrava preocupação em saúde pública devido a possíveis danos à saúde como doenças autoimunes apresentando propriedades alergênicas, teratogênicas, carcinogênicas e mutagênicas (FERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2010; REDDY et al., 2009; ROSSETTO et al., 2005).

As micotoxinas passíveis de serem encontradas em grãos de milho são a fumonisina e zearalenona, produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, e também as aflatoxinas e ocratoxina, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* (LUO et al., 2014; FERREIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010; MORENO et al., 2009; KAWASHIMA & VALENTE-SOARES, 2006; SEKIYAMA et al., 2005).

2.4 Aflatoxinas

Durante a década de 60 uma doença denominada “Turkey X” atacava e matava milhares de aves na Inglaterra causando prejuízos econômicos. Inicialmente foi julgada como uma doença de caráter nutricional, porque tortas de amendoim eram utilizadas como ração para perus e estava associada com o aparecimento da doença. Depois o fator da causa foi associada ao fungo *Aspergillus flavus*, que posteriormente foi nomeada como aflatoxina, um dos mais potentes carcinógenos conhecidos no mundo (JEWERS et al., 1990).

As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2), com base na cor azul e verde, respectivamente, através da fluorescência delas sob a luz ultravioleta; e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada (PITT & HOCKING, 2009). As aflatoxinas são moléculas heterocíclicas caracterizadas pela fusão de resíduos de dihidrofurano ou tetrahydrofurano a uma molécula de cumarina. Existe diferença estrutural entre as moléculas de AFG e AFB, pois enquanto a AFG possui um anel δ -lactona, a AFB possui um anel ciclopentanona (D’MELLO, 2003), como é mostrado na Figura 1.

A aflatoxina B1 é a mais prevalente e biologicamente ativa dentre as aflatoxinas, e considerada de potente ação hepatotóxica e carcinogênica, além de ser um imunossupressor natural conhecido por afetar humanos e animais (FERREIRA et al., 2006; WILLIAMS et al., 2004; CREPPY, 2002). Duas outras micotoxinas M1 (AFM1) e M2 (AFM2) foram detectadas

no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das toxinas B1 e B2, respectivamente (FONSECA, 1999).

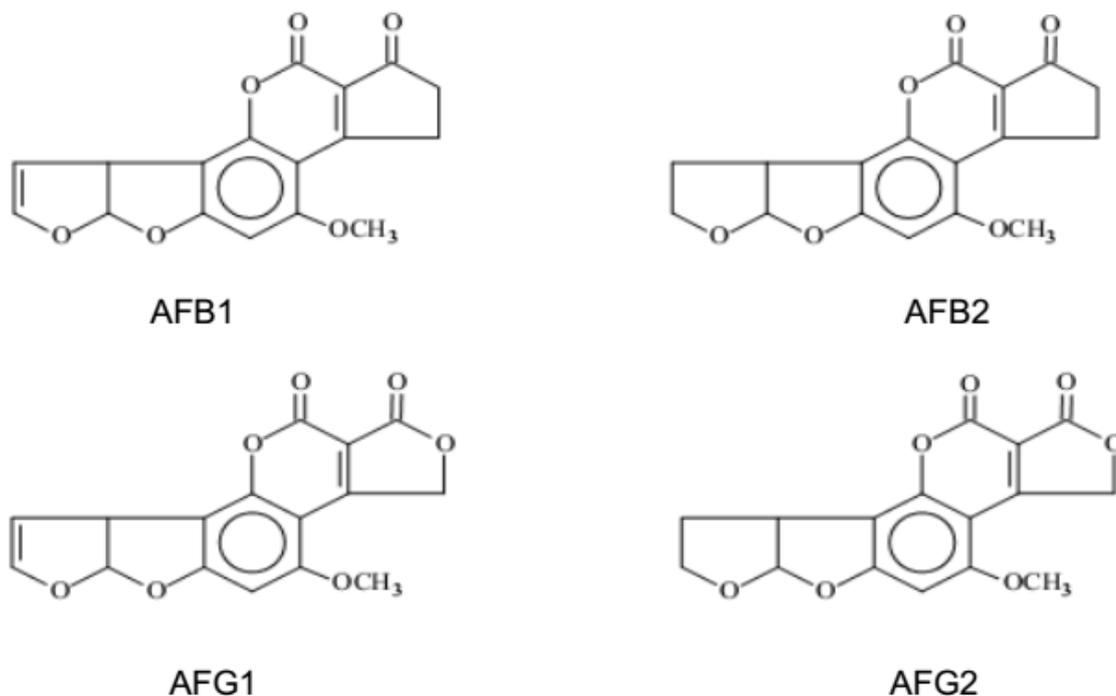


Figura 1 – Estruturas químicas das aflatoxinas (IARC, 2002)

Devido ao potencial risco à saúde humana, os níveis de aflatoxinas e outras micotoxinas passaram a ser monitoradas por um número crescente de países que passaram a regulamentar seus limites máximos permitidos em diversos produtos de alimentos e rações (FAO, 2004).

Considerando a toxicidade das aflatoxinas, o Brasil através do Ministério da Saúde, estabeleceu através da resolução RDC nº 7, em concordância com o Ministério da Agricultura, o limite máximo de 20 µg/kg, dado pela somatória de B1+B2+G1+G2, sendo válido para amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim (ou manteiga de amendoim) e milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolas) e 50 µg/kg para ração animal (BRASIL, 2011).

2.5 Descontaminação em Alimentos

Os processos de descontaminação em alimentos dependem principalmente de fatores como a característica do alimento, viabilidade do processo tecnológico e o tipo de contaminação. Estes procedimentos podem compreender remoção física, química ou biológica buscando manter o valor nutricional e a aceitabilidade do produto, não alterar significativamente as propriedades tecnológicas do produto e, se possível, destruir os esporos dos fungos (POZZI et al., 2002). Contudo, as aflatoxinas possuem a característica de poderosa termoestabilidade, portanto procedimentos de remoção física amplamente utilizada como a inativação térmica reduzem modestamente os níveis destas toxinas (PARK, 1993). Segundo Araujo et al (1999), para inativação completa das aflatoxinas deve ser alcançado o ponto de fusão de 237–289 °C, porém essa temperatura de aquecimento é inaceitável no processamento de alimentos.

O procedimento tecnológico de ozonização tem ganhando destaque na higienização de alimentos. Sua ação é baseada na destruição dos microrganismos através da oxidação de seus componentes celulares vitais, sendo a superfície da célula apontada como principal alvo ação do ozônio. Dentre outras vantagens de sua utilização no processamento de alimentos de origem vegetal e animal estão à garantia na higiene, cor, odor e aspecto visual, sem deixar resíduos que possam provocar reações indesejáveis, pois o excesso do ozônio é auto decomposto rapidamente produzindo oxigênio e assim não resta resíduo no alimento. Além de melhorar a qualidade e realçar o sabor da maioria dos alimentos perecíveis, oxidando resíduos de pesticidas e neutralizando gases de amônia e etileno produzidos durante os processos de amadurecimento e decomposição (CHIATONE et al, 2008; JAKSCH et al., 2004).

2.6 Características do Ozônio

O ozônio é um potente oxidante, solúvel em água e de solubilidade crescente com a redução da temperatura (CHOI; NIELSEN, 2005). Ele se autodecompõe rapidamente; na forma gasosa, sua meia-vida é de 12 horas. Sua auto decomposição produz O_2 e inúmeros radicais livres de hidroxila que caracterizam o elevado poder de oxidação, não deixando resíduos no alimento (TIWARI et al., 2010; DI BERNARDO & DANTAS, 2005).

O ozônio é formado naturalmente na estratosfera em pequenas quantidades (0,05 mg/L) pela ação da radiação ultravioleta do sol sobre o oxigênio. Uma pequena quantidade de ozônio também é formada na troposfera como subproduto das reações fotoquímicas entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio que são lançados por automóveis, indústrias, florestas e ação vulcânica (PRESTES, 2007).

Os primeiros relatos sobre o ozônio datam final do século XVIII, onde se observou que a descarga elétrica em ar resulta em um odor irritante bastante característico e que também foi observado durante a eletrólise da água. Contudo somente em meados do século XIX que o ozônio foi isolado durante experimentos de eletrólise da água a partir de soluções ácidas (SILVA et al, 2011; LAPOLLI et al., 2003).

O ozônio é um gás extremamente instável e parcialmente solúvel em água, porém da mesma forma que outros gases, sua solubilidade aumenta à medida que a temperatura diminui. Possui odor penetrante e é facilmente detectável em concentrações muito baixas (0,01 a 0,05 mg/L) (SILVA et al, 2011; DI BERNARDO & DANTAS, 2005; LAPOLLI et al., 2003). Em temperatura ambiente, com baixas concentrações o ozônio se apresenta como um gás incolor, mas se estiver em concentrações altas o gás ozônio apresenta-se numa coloração de tom azulado (FREITAS-SILVA et al, 2013a).

Quando comparado a outros agentes oxidantes, o ozônio se destaca pelo elevado potencial de oxidação e ocupa a posição de segundo mais poderoso agente oxidante, perdendo apenas para o flúor. Essa característica de alto poder de oxidação reflete diretamente na alta capacidade de desinfecção e esterilização, permitindo que seu uso como agente sanitizante possa ocorrer com menor tempo de contato e até em baixas concentrações (SILVA et al, 2011; LAPOLLI et al., 2003). Na Tabela 2 e Tabela 3 pode-se observar os valores dos potenciais de oxidação de diferentes agentes oxidantes, e propriedades físico-químicas do ozônio, respectivamente.

Tabela 2: Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.

| Agente oxidante | Potencial de oxidação (mV) |
|------------------------|----------------------------|
| Flúor | 3,06 |
| Ozônio | 2,07 |
| Peróxido de hidrogênio | 1,78 |
| Permanganato | 1,67 |
| Dióxido de cloro | 1,50 |
| Hipoclorito | 1,49 |
| Cloro | 1,36 |

Fonte: Greene e Seydim (2004).

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do ozônio

| Propriedades físico-químicas | |
|------------------------------------|-------------------------|
| Massa molar | 48 Da |
| Massa específica (0°C e 101,3 kPa) | 2,154 kg/m ³ |
| Ponto de ebulição | -111,9 ± 0,3 °C |
| Ponto de fusão | -192,5 ± 0,3 °C |
| Solubilidade em água a 0°C | 20 g/m ³ |
| Solubilidade em água a 30°C | 1,5 g/m ³ |
| Temperatura crítica | -12,1 °C |
| Pressão crítica | 5,53 MPa |

Fonte: Greene e Seydim (2004).

2.7 Geração do Ozônio

Devido a maior estabilidade do oxigênio, a molécula de ozônio sofre um processo de dissociação espontânea com o tempo resultando novamente na formação do oxigênio (LANGLAIS et al., 1991). A decomposição do ozônio não resulta em espécies nocivas já que o mesmo é espontaneamente convertido em molécula de oxigênio; a sua instabilidade ($t_{1/2} = 20$ a 90 minutos, dependendo do ambiente) requer que ele seja produzido no seu local de aplicação reduzindo assim gastos e perigos relacionados como seu transporte e estocagem (ARMOR, 1999).

A Figura 2 mostra as quatro formas canônicas do híbrido de ressonância representativo da molécula de ozônio propostas por Bailey (1978):

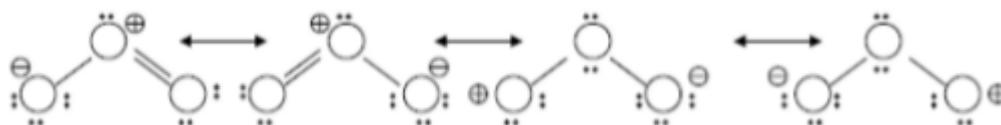


Figura 2: Formas canônicas do híbrido de ressonância representativo da molécula de ozônio.

A molécula de ozônio é gerada pela combinação de um átomo de oxigênio com uma molécula de oxigênio, por meio de uma forte reação endotérmica e não espontânea (VIDAL,

2003). A reação química global para geração do ozônio a partir do oxigênio pode ser descrita pela Equação 1:



Para utilização prática do ozônio foram desenvolvidos diferentes métodos para sua obtenção e alguns processos para sua geração ficaram conhecidos, tal como descarga elétrica em oxigênio, eletrólises na água, ou termal, fotoquímica ou radioquímica. Para a indústria o ozônio é usado principalmente do oxigênio puro ou o oxigênio da atmosfera no processo de descarga elétrica ou corona (IGLESIAS, 2002). Contudo os processos que utilizam oxigênio puro como insumo têm capacidade de geração de ozônio de 1,7 a 2,5 vezes àquela obtida quando o ar atmosférico é utilizado (IGLESIAS, 2002).

O processo corona é realizado através de um gerador de ozônio constituído por dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000V). O ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos. Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de oxigênio, começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do oxigênio e a consequente formação do ozônio (RUSSEL et al, 1999; USEPA, 1999).

Na Figura 3, pode-se observar um esquema de um gerador de ozônio pelo processo corona.

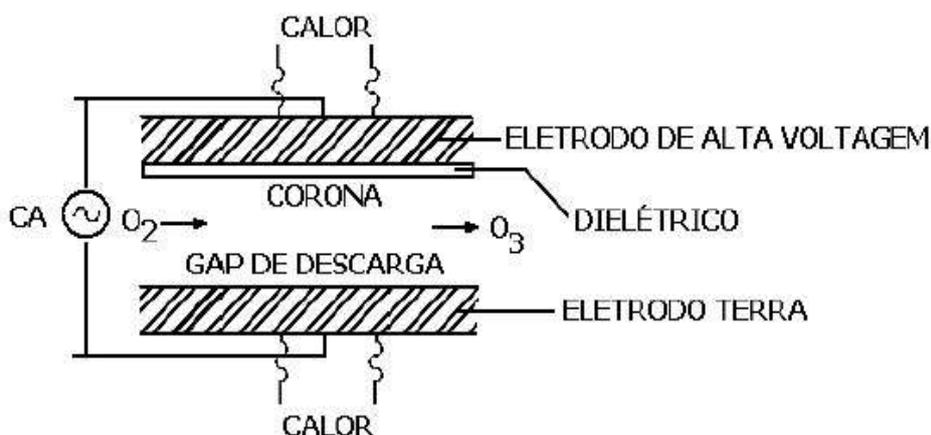


Figura 3: Esquema do sistema tipo descarga corona de geração de ozônio.

Fonte: Adaptado de USEPA (1999).

2.8 Aplicação do Ozônio

O processo de desinfecção para obtenção de água potável foi o maior triunfo da saúde pública do século XX. A ação germicida do ozônio foi evidenciada na França, no final do século XIX, quando este gás começou a ser utilizado como desinfetante no tratamento de água. As técnicas de ozonização foram desenvolvidas mais significativamente nos últimos 40 anos, particularmente na França, na Alemanha Ocidental e na Suíça (LAPOLLI et al., 2003).

Em 1982, o ozônio foi considerado como um produto seguro (*“General Recognized As Safe”* - GRAS) para o tratamento de garrafas de água pela FDA (*Food and Drug Administration*). Ainda na década de 90, os Estados Unidos indicaram o ozônio como uma substância GRAS para aplicação direta em produtos alimentícios. Dessa maneira houve um crescente interesse na aplicação de ozônio no processamento de alimentos devido ao seu alto poder sanitizante e pela sua rápida degradação, não deixando resíduos nos alimentos tratados (GRAHAM, 1997; KIM et al, 1999; GUZEL-SEYDIM et al., 2004a, 2004b; FREITAS-SILVA & VENANCIO, 2010). Essas são propriedades intrínsecas que o ozônio possui que

permitem a ingestão de alimentos submetidos ao processo de ozonização sem trazer riscos à saúde (MANCUSO, 2003; NAITO; TAKAHARA, 2006).

O poder de desinfecção do ozônio é explicado pela combinação entre sua habilidade de se difundir através de membranas biológicas e seu alto potencial de oxidação (2,07 volts) (KOLTUNSKI; PLUMRIDGE, 2000). A inativação da microbiota em alimentos por ozônio depende muito da natureza e da composição da superfície dos alimentos, do tipo de contaminação microbiana, bem como o grau de associação de microrganismos com alimentos (KIM et al., 1999; FREITAS-SILVA et al, 2013b).

O caráter fortemente oxidante da molécula de ozônio lhe confere habilidade para reagir com grande variedade de grupos funcionais orgânicos e organometálicos, originando subprodutos de menor peso molecular, consideráveis ainda mais biodegradáveis que seus precursores. Sua presença pode remover substâncias responsáveis pela cor, gosto e odor, além de microrganismos resistentes a outras técnicas de desinfecção e traços de metais de transição (MAUSTELLER, 1989).

A oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos durante o processo de ozonização pode ocorrer via ozônio molecular através de uma reação direta predominante em meio ácido ou via radical hidroxila, por meio de uma reação indireta predominante em meio alcalino (KIM, 1999 et al).

2.9 Descontaminação pela Ação do Ozônio

O espectro de ação do ozônio é amplo, agindo contra bactérias, fungos, vírus e protozoários, incluindo esporos de fungos e bactérias, além da possibilidade de degradar micotoxinas. O efeito antimicrobiano do ozônio deve-se às suas fortes propriedades de oxidação de componentes celulares tais como grupos sulfidril e aminoácidos de enzimas, peptídeos, proteínas e ácidos graxos poli-insaturados, e à sua capacidade de se difundir através das membranas celulares (TIWARI et al., 2010). A parede celular dos fungos e bactérias é composta por camadas que contêm carboidratos, proteína e glicoproteína além de pontes de enxofre, tornando-os alvo a oxidação pelo ozônio. O ozônio dissolvido ou seus radicais livres danificam as membranas, causando ruptura celular e dispersão do citoplasma. Além disso, pode ainda danificar proteínas e DNA reagir com as células presente no citoplasma, levando a um desequilíbrio entre as componentes da célula e assim a sua morte, além de incapacita-las de executar as funções naturais (EL-DESOUKY et al, 2012; KOMANA- PALLI; LAU, 1998).

A destruição de esporos parece ser resultado da degradação das camadas que revestem os esporos, expondo o córtex à ação do ozônio (KHADRE; KOUSEF, 2001). A ozonização é também usada como método de fumigação, destruindo pragas, especialmente insetos (WU et. al., 2007; TIWARI et al., 2010).

O tratamento com ozônio pode diminuir a contagem de mesófilos aeróbicos, coliformes e clostrídios sulfito redutores, além de melhorar a qualidade de armazenamento. A exemplo de um estudo realizado com carne transportada, as carcaças foram tratadas por nove dias com 0,03 ppm de ozônio a 1,6°C e 95% de umidade relativa, não apresentaram crescimento bacteriano na superfície das peças (KIM et al., 1999). A utilização de água de lavagem ozonizada a 2,1 ppm pulverizada em carcaças de frango reduziu em 95% a contagem microbiana, sem afetar a coloração, o sabor e o odor da carne (TORRES et al., 1996).

O processo de descontaminação por ozônio também já foi testado tanto em outros alimentos sólidos como em frutas (BIALKA; DEMIRCI, 2007; SELMA et al., 2008; NAJAFI, KHODA-PARAST, 2009), pescados (GONÇALVES, 2009) e grãos (TIWARI et al., 2010; FREITAS-SILVA, 2013; LUO et al, 2014), quanto em pasteurização de produtos

líquidos, como cidra de maçã (STEENSTRUP; FLOROS, 2004) e suco de laranja (PATIL et al., 2009).

O uso do ozônio também tem se mostrado uma eficiente ferramenta de ajuda na conservação de alimentos. Quando se trata de armazenagem de grãos é importante ressaltar que muito sobre a aplicação de ozônio está limitado a estudos laboratoriais e experimentais (ROZADO, 2013; IBANOGLU, 2002). O mesmo pode ser afirmado quanto ao uso do ozônio na prevenção da degradação por fungos de produtos armazenados. Pesquisas sobre seu uso têm sido realizadas na forma de ozônio aquoso contando apenas com testes *in vitro*, com culturas puras e em sistemas modelo (ZOTTI et al., 2008).

Estudando a eficácia do ozônio como fumigante para desinfestação de milho armazenado, Strait (1998) e Kells et al. (2001) constataram que o processo de fumigação com ozônio apresenta duas fases distintas: na primeira fase, ocorre uma rápida decomposição e movimentação lenta através da massa de grãos com baixa taxa de decomposição, pois nesse momento, os sítios ativos responsáveis pela decomposição do ozônio estão saturados. Segundo esses mesmos autores, a taxa de saturação depende da velocidade ou do fluxo de injeção do ozônio no meio. Esse movimento inicial do ozônio através da massa de grãos é impedido por fenômenos descritos como demanda de ozônio do meio que neste caso é o milho (KIM et al., 1999).

Durante o processo de fumigação, o gás ozônio se move ao longo da camada de grãos devido o processo de difusão, e as moléculas se deslocam através da massa de grãos, dos pontos de maior concentração para os de menor concentração até atingir o equilíbrio. Mendez et al. (2003) afirmaram que a taxa de penetração do gás ozônio na massa de grãos não é constante. Entre os fatores que afetam tal propriedade do gás, destacam-se o tempo de exposição, as propriedades do produto, o teor de água e a altura da coluna de massa do produto (KIM et al., 1999; RAILA et al., 2006).

2.10 Considerações Sobre a Aplicação do Ozônio

Da mesma maneira que a aplicação do ozônio pode proporcionar diversas vantagens derivadas de suas características intrínsecas, há possibilidades de implicações ou limitações no que diz respeito a sua utilização (KIM et al, 1999). Como exemplo disso, já foi observado que o tempo de exposição necessário para o controle de pragas depende de fatores como a temperatura da massa de grãos e a camada em que os insetos podem estar localizados. O quão próximo o alvo estiver do ponto de injeção do gás ozônio também foi um importante fator observado (ROZADO, 2008).

Existe importante preocupação sobre modificações indesejáveis que podem ocorrer na qualidade do alimento após o processo de tratamento com o ozônio, possivelmente alterando suas características químicas, sensoriais e tecnológicas (KIM et al, 1999). Já foi revelado em pesquisa que o tratamento com ozônio aquoso em concentrações de $6,7 \text{ mg.L}^{-1}$ por 10 min em pimentas negras houve oxidação de alguns ácidos graxos voláteis que reflete na perda de qualidade do alimento (ZHAO & CRANSTON, 1995). Também já foi observado que há uma sensibilidade relativa das diferentes vitaminas para aplicação de ozônio. Esse importante fator é dependente do tipo de alimento e a combinação do tempo de exposição ao tratamento pelo ozônio. Desta forma mais estudos são necessários para validar o efeito da aplicação do ozônio sobre as proteínas, gorduras e carboidratos, além disso, o tratamento com o ozônio seja na forma aquosa ou gasosa pode interferir significativamente no tempo de vida útil dos alimentos (CULLEN et al., 2009).

A utilização do ozônio vai variar de acordo com as condições do meio, como o tipo de alimento, a quantidade de matéria orgânica presente, o tempo de contato com o ozônio, pH,

temperatura e pela presença ou ausência de aditivos químicos (FREITAS-SILVA, 2013; CAMPOS et al., 2005; GUZEL-SEYDIM et al., 2004; KIM et al., 1999).

Para maior eficiência de ozonização devem ser considerados alguns fatores como: a) o tipo de microrganismo como alvo dos efeitos do ozônio, b) a idade da cultura em questão, c) a densidade da população que será tratada com ozônio, d) se há ou não presença de compostos na solução com demanda de ozônio, e) a forma de aplicação do ozônio, f) a validação dos métodos de quantificação de ozônio e g) o procedimento para avaliar a eficácia antimicrobiana. Todos esses são fatores apontados por estudos que podem interferir na sensibilidade do microrganismo ao ozônio (KHADRE et al., 2001; KIM et al., 1999).

De acordo com Allen et al. (2003), outros fatores foram observados durante a validação do efeito fungicida do ozônio gasoso durante armazenagem de cevada. Nesse estudo foi verificada como existente a relação entre o tempo de contato, a concentração de ozônio no ar, atividade de água do alimento e o fator temperatura sobre o desempenho fungicida na cevada. O resultado dessa pesquisa apontou inativação de 96% dos esporos após cinco minutos de exposição ao ozônio.

Estudos sobre a aplicação do ozônio também apresentam resultados desfavoráveis. Já foi revelado que em testes *in vitro*, o ozônio não era letal a todos os esporos fúngicos e nem apresentava capacidade de germinação prejudicada (PALOU et al., 2001). Anos mais tarde foi observado o efeito *in vitro* do ozônio sobre o fungo da espécie *Aspergillus niger*, conhecido por causar a podridão negra da cebola. Como resultado foi constatado que o ozônio induziu a germinação dos esporos (VIJAYANANDRAJ et al., 2006). Ainda, em pesquisa anterior foi observado que a sensibilidade de esporos a ação do ozônio como agente oxidante depende da espécie do fungo, morfologia de esporos, substrato, umidade e da dosagem de ozônio utilizada no processo (HIBBEN; STOTZKY, 1969).

2.11 Aplicação do Ozônio em Alimentos Contaminados com Micotoxinas

A ozonização é um método de oxidação e pode ser utilizado para descontaminação das aflatoxinas em alimentos (FREITAS-SILVA, 2013). Muitos métodos físicos e químicos como o aquecimento por micro-ondas e tratamento com amônia tem sido recomendado para descontaminação de alimentos por aflatoxinas, inclusive o tratamento pelo ozônio (PRUDENTE; KING, 2002). Diversos estudos têm demonstrado que a ozonização é capaz de reduzir com eficácia os níveis de contaminação por micotoxinas em diferentes alimentos como castanha-do-brasil, amendoim, figos secos, além dos grãos de milho e arroz (FREITAS-SILVA, 2013; ALENCAR et al., 2012; ZORLUGENÇ et al., 2008, PRUDENTE & KING, 2002). Além de redução na contagem de microrganismos totais quando exposto em grãos, o ozônio produzido eletroquimicamente é capaz de degradar aflatoxinas, fumonisina, ocratoxina, patulina, desoxinivalenol e zearalenona (TIWARI et al., 2010; YOUNG et al., 2006).

Ao contrário do tratamento pela amônia ou de outros métodos considerados convencionais, a aplicação do ozônio é uma técnica que vem sendo muito estudada por apresentar vantagens que permitem sua aplicação de forma eficaz na destruição das aflatoxinas. É um método de oxidação capaz de reagir com grande variedade de grupos funcionais constituintes da molécula das aflatoxinas (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2010; YOUNG et al., 2006). Já se tem apresentado o mecanismo de degradação da aflatoxina B1 pela ação do ozônio, onde há reação do ozônio na dupla ligação entre os carbonos C₈-C₉ do terminal furano da aflatoxina B1, fator responsável pela ação tóxica, produzindo ao final da reação aldeídos, cetonas, ácidos e dióxido de carbono (MCKENZIE et al., 1998).

Os primeiros estudos de aplicação de ozônio na degradação de micotoxinas em grãos contaminados surgiram no final da década de 1960. Foi relatado que o ozônio gasoso (25

mg/min) reduziu as concentrações de aflatoxinas totais em farelo de algodão e farelo de amendoim em até 91% (DWARAKANATH et al., 1968). Em pesquisa com grãos de milho, o ozônio gasoso foi utilizado para tratamento em grãos contaminado artificialmente com aflatoxinas e/ou naturalmente contaminados. Foi observada uma rápida degradação das aflatoxinas B1 e G1, porém a B2 e G2 apresentaram-se mais resistentes à oxidação, necessitando de níveis mais elevados de ozônio para sua degradação (MCKENZIE et al., 1997). Anos mais tarde foi evidenciado que a ozonização reduziu em 92% o nível de aflatoxinas em grãos de milho contaminado com 587 ppb, e foi demonstrado ainda que a aflatoxina degradada não volta a sua forma original, indicando a permanência do processo de ozonização (PRUDENTE; KING, 2002).

A ozonização da castanha-do-brasil como controle da incidência de aflatoxinas promoveu uma degradação eficaz dos grupos B e G, com redução também na contagem total de fungos, sendo uma técnica ainda promissora no controle de diferentes grupos de micotoxinas (GIORDANO, 2009).

De forma também preventiva, alguns autores ainda citam o uso do ozônio no controle de fungos na pós-colheita de certos vegetais como o café, prevenindo a formação de ocratoxina A (OTA), principal micotoxina encontrada no fruto (SUSLOW, 2004; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004).

Em outro estudo foi avaliado o processo de ozonização e sua eficácia sobre a degradação das aflatoxinas em grãos amendoim. As amostras foram misturadas com concentrações conhecidas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 submetidas à ozonização gasosa em diferentes temperaturas (25, 50, 75 °C) e tempos de exposição (5, 10, 15 min). Os resultados mostraram que a eficiência da ozonização aumentou com temperaturas mais elevadas e maior tempo de tratamento, resultando na redução de 56-77 % da aflatoxina B1 e 61-80 % de redução da aflatoxina B2 (PROCTOR et al., 2004).

Em outro estudo foi avaliado a eficácia do ozônio gasoso e água ozonizada sobre a carga microbiana e o teor de aflatoxina B1 de figos secos, expostos a 13,8 mg/L de ozônio gasoso e 1,7 mg/L de água ozonizada durante 7,5, 15 e 30 min de exposição. A aplicação de ozônio por 15 min foi suficiente para a inativação de todos os fungos. As amostras que foram contaminadas artificialmente também foram tratadas com ozônio gasoso e água ozonizada por 30, 60 e 180 min, respectivamente. Em ambos os tratamentos, a degradação de aflatoxina B1, aumentou com aumento do tempo de exposição. Os resultados indicaram que o ozônio gasoso foi mais eficaz do que a água ozonizada para a redução da aflatoxina B1, enquanto a água ozonizada foi mais eficaz para diminuir a carga microbiana (ZORLUGENC et al., 2008).

Yeoh et al (2014) analisaram os efeitos do ozônio nas populações microbianas de mamão recém cortados, desse modo o tratamento pela ozonização reduziu de maneira muito efetiva as contagens de coliformes com reduções de 0,39 a 1,12 log x 10 UFC/g, além de relataram também reduções de 0,22 a 0,33 log UFC/g para contagem de bactérias mesófilas.

Mendez et al (2003) avaliaram a performance do processo de ozonização em grãos armazenados e relataram sobre os desafios do ozônio e sua alta reatividade até que o mesmo saturasse e fosse capaz de interagir com toda a massa de grãos na coluna de seu experimento. Dessa maneira eles relataram as fases de interação do ozônio, sendo a primeira fase quando o ozônio interage com toda a superfície do grão e no caso do milho por ser um grão consideravelmente poroso essa interação é grande, então conforme esses sítios de reação que degradam o ozônio diminuindo sua concentração vão sendo eliminados considera-se como fase dois o momento em que o ozônio passa a circular com poucas degradações livremente entre os grãos.

Em outro estudo, o ozônio que foi capaz de reduzir em até 95% as aflatoxinas em amostras de milho, foi observado que perus alimentados com milho contaminado tratado com ozônio não mostraram efeitos nocivos em relação aos perus alimentados com milho

contaminado não tratado, este fato evidencia mais uma vez a segurança da aplicação de ozônio em alimentos (MCKENZIE et al., 1998).

2.12 Segurança da aplicação e legislação

O aumento da preocupação com problemas ambientais tem estimulado várias pesquisas no sentido de desenvolver produtos químicos não agressivos e também visando melhorar a tecnologia existente (Green Chemical Processes ou Processos Químicos Limpos) de modo a minimizar ou evitar o impacto da atividade industrial no ambiente. Segundo Moraes e Turolla (2004), a questão ambiental criou forças nos últimos anos. O poder público em seus vários níveis, as empresas e toda a sociedade civil estão cada vez mais conscientes do problema que a deterioração ou o uso não sustentável do meio ambiente pode causar à humanidade. No Brasil, particularmente, a questão ambiental encontra-se hoje incorporada na agenda política e no planejamento empresarial. Além disso, há crescente aumento por parte da população de consumidores cada vez mais conscientes que exigem uma preocupação e demanda de produtos mais seguros e com menor impacto ao meio ambiente e à saúde da população (BEIRÃO-DA-COSTA et al, 2014).

O ozônio possui elevado potencial de oxidação. Essa característica, dentre outras, confere ao ozônio sua aplicabilidade como uma tecnologia capaz de reduzir e/ou remover inúmeros parâmetros de poluição ambiental, tais como cor, concentração de fenóis, toxicidade entre outros. Com o crescimento da industrialização ocorrido ao longo dos anos e o concomitante aumento da demanda de produtos químicos, intensificaram-se os problemas relacionados com a liberação de poluentes no meio ambiente (DE PINHO; CEDRAZ, 2011). Contudo, a toxicidade é um critério de extrema importância para aprovar o ozônio no processamento de alimentos. Os efeitos primários do ozônio em humanos estão relacionados com o trato respiratório. Sintomas de toxicidade incluem dor de cabeça, tontura, sensação de ardência nos olhos e garganta, sensação de odor pungente e tosse. Em baixas concentrações o ozônio não é um gás extremamente tóxico, mas em altas concentrações pode ser letal (RUSSEL et al, 1999).

No Brasil ainda não existe legislação específica que oriente aplicações do ozônio na área alimentícia (SILVA et al., 2011), porém o consumo de alimentos tratados com ozônio não causa qualquer efeito tóxico à saúde humana e animal. No entanto, deve-se tomar cuidado na manipulação do gás, pois, em altas concentrações no ambiente, pode causar efeitos tóxicos e até levar a morte. O nível máximo de exposição é de 0,6 mg/m³ durante 10 min., sendo possível detectar o cheiro característico do ozônio em concentrações de 0,02 mg/m³ (GUZEL-SEYDIM, 2004). Os limites de tolerância ocupacional de ozônio em até 48 horas de trabalho por semana são de 0,08 mL/m³ ou de 0,16 mg/m³, segundo a NR 15 da Portaria MTB nº 3.214, de 08 de junho de 1978, que aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho, (BRASIL, 1978). Em 2001, foi também aprovado como aditivo direto em alimentos (KHADRE et al., 2001).

O ozônio pode causar sintomas de toxicidade através do sistema respiratório, tais sintomas podem ser dor de cabeça, tontura, sensação de queimação na região dos olhos, irritação na garganta e tosse, assim a alta toxicidade do ozônio ao ser humano torna extremamente perigosa sua inalação. Caso o ozônio seja aspirado, dependendo da quantidade inalada e do tempo de exposição, deve-se sempre respeitar as restrições aplicadas quanto a exposição humana (GUZEL-SEYDIM et al, 2004).

No Brasil, a portaria da ANVISA Nr. 25/76 publicada no Diário Oficial da União em 09/11/1977 regulamenta o uso do ozônio. O uso do ozônio de maneira segura é de suma importância, pois na sua aplicação em indústrias de alimentos há necessária implantação de

sistemas detectores e de eliminação residuais no ambiente de trabalho (ROZADO et al, 2013). Além disso as pessoas que trabalham com implantação e sistemas de ozonização devem possuir acompanhamento médico regular (FREITAS-SILVA et al, 2013).

2.13 Avaliação de risco da exposição humana a aflatoxinas na dieta

A avaliação de risco tem como objetivo estimar a probabilidade da ocorrência de um efeito adverso após a exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas presentes na dieta, como as aflatoxinas (IPCS, 2009).

Primeiro identifica-se a natureza do efeito adverso causado pela exposição humana a uma determinada substância, depois tenta estabelecer uma relação quantitativa entre a exposição e a substância em estudo (relação dose/resposta) (IPCS, 2009; JARDIM; CALDAS, 2009).

Para substâncias genotóxicas, como as aflatoxinas recomenda-se que a exposição seja mantida no nível mais baixo possível (ALARA – As low as reasonably achievable) (IPCS, 2009). Contudo, parâmetros toxicológicos para avaliação de risco quantitativo a aflatoxinas podem ser obtidos através da benchmark dose (BMDL, o limite inferior desta estimativa) (JECFA, 1999, 2006).

Para avaliação da exposição ao contaminante na dieta, leva-se em consideração a concentração da substância no alimento e o padrão de consumo dos alimentos. Os dados de concentração podem ser obtidos em estudos de monitoramento de alimentos ou utilizando os limites legais (LM) como base (IPCS, 2009). Os dados de consumo de alimentos podem ser obtidos, por exemplo, dos dados de disponibilidade de alimentos no domicílio (POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares – IBGE) (IBGE, 2011). O cálculo da ingestão pode ser realizado por modelos determinísticos (valores pontuais de concentração e consumo, como médias ou percentis), como mostrado na equação 2 (IPCS, 2009).

A caracterização do risco para as aflatoxinas pode ser realizada através do cálculo da margem de exposição (MOE), como mostrado na equação 3 (JARDIM; CALDAS, 2009), onde a referência toxicológica utilizada é a BMDL₁₀ estimada pelo EFSA (European Food Safety Authority) no valor de 0,17µg/kg pc/dia, para aflatoxina B1. Quanto maior a MOE calculada, menor a preocupação, contudo valores abaixo de 10000 podem indicar risco à saúde humana e necessidade de medidas de providência pelos órgãos responsáveis (EFSA, 2005).

$$\text{Exposição} = \frac{\text{concentração da substância} \times \text{consumo do alimento}}{\text{peso corpóreo}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{MOE} = \frac{\text{referência toxicológica}}{\text{estimativa de exposição}} \quad \text{Equação 3}$$

2.14 Ocorrência de aflatoxinas em produtos derivados do milho

Nas cidades de Maringá e Miralva – PR, Amaral et al (2006) detectaram que 5,7% das suas amostras de diferentes produtos derivados do milho ($n=123$) estavam contaminadas por aflatoxinas, onde identificaram 1 amostra de canjiquinha ($n=17$) e 1 amostra de canjica de milho ($n=12$) contaminadas por aflatoxinas, sendo sua prevalência de contaminação estando atrás apenas dos alimentos fubá e farinha de milho também analisados nesse trabalho. Em Recife – PE, Kawashima e Valente Soares (2006) também analisaram diferentes produtos derivados do milho ($n=74$) e obtiveram resultados semelhantes ao detectar 6,75% de

contaminação por aflatoxinas, sendo a maior incidência verificada na identificação de 3 amostras de canjiquinha ($n=12$) e 1 amostra de canjica ($n=9$) contaminadas por aflatoxinas B1 e B2, contudo não foram detectadas nenhuma contaminação por aflatoxina G1 nem G2. Numa pesquisa com várias marcas de três diferentes produtos derivados do milho ($n=16$) vendidas nos mercados da cidade de Sete Lagoas – MG, Ferreira et al (2013) identificaram contaminação por aflatoxinas em 11 amostras, sendo 3 amostras positivas para aflatoxinas em três diferentes marcas de canjiquinha ($n=6$), com a prevalência de contaminação estando apenas atrás do fubá de milho também pesquisado nesse trabalho.

Da mesma forma, Sekiyama et al (2005) também pesquisaram a presença de aflatoxinas em vários outros produtos derivados do milho ($n=121$), exceto canjiquinha e canjica de milho, e encontraram uma baixa incidência de contaminação ao detectar que 2 amostras de milho de pipoca e 1 amostra de grãos de milho estavam contaminadas por aflatoxinas B1 e B2.

Os valores de aflatoxinas totais encontradas nos produtos contaminados milho de pipoca ($n=2/24$) e grãos de milho ($n=1/7$), pesquisados por Sekiyama et al (2005), foram de 10,4 a 59 $\mu\text{g/Kg}$ e 21,3 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente, considerando que nessa pesquisa os autores não fornecem nenhum valor sobre as aflatoxinas G1 e G2 para o somatório das aflatoxinas totais. Oliveira et al (2010) revelaram uma variação de contaminação por aflatoxinas totais de 1,0 a 2,6 ppb nas amostras de milho crioulo contaminados ($n=7/10$). Bento et al (2012) revelaram as variações de aflatoxinas totais encontradas nas suas amostras de grãos de milho contaminados ($n=18/84$) nos valores de 1 a 108,7 $\mu\text{g/Kg}$, enquanto cada aflatoxina individualmente teve seu valor descrito com variações de 1 a 84,1, 1 a 4,6, 1 a 22,6 e 1 a 1,8 $\mu\text{g/Kg}$ para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, respectivamente.

Na pesquisa de aflatoxinas em produtos derivados do milho realizada por Kawashima e Valente Soares (2006), os maiores valores de contaminação por aflatoxina B1 encontrados por esses autores foram de 20 $\mu\text{g/Kg}$, 16 $\mu\text{g/Kg}$ e 11 $\mu\text{g/Kg}$ e para aflatoxina B2 foram de 3 $\mu\text{g/Kg}$, não detectado e 1 $\mu\text{g/Kg}$ para os produtos de quirera, canjica branca e quirera fina, respectivamente. Esses autores não detectaram a presença de aflatoxinas G1 e G2 e a maior contaminação por aflatoxinas totais foi em uma amostra de quirera na concentração de 23,3 $\mu\text{g/Kg}$. Amaral et al (2006) revelaram 23,9 $\mu\text{g/Kg}$ e 13,3 $\mu\text{g/Kg}$ como os maiores valores de contaminação por aflatoxinas totais encontrados nos produtos canjiquinha e canjica de milho, respectivamente. Nas amostras de canjiquinha identificadas contaminadas por aflatoxinas totais na pesquisa de Ferreira et al (2013), esses autores revelam concentração máxima de 1,1 $\mu\text{g/Kg}$ de contaminação por aflatoxinas totais.

Nos diversos produtos derivados de milho pesquisados por Sekiyama et al (2005), esses autores revelaram a contaminação máxima pela aflatoxina B1 na concentração de 59 $\mu\text{g/Kg}$ no produto milho para pipoca e 21,3 $\mu\text{g/Kg}$ para grãos de milho, ambos os produtos também apresentaram contaminação máxima por aflatoxina B2 no valor de 2,4 $\mu\text{g/Kg}$, porém esses autores não informaram sobre detecção das aflatoxinas G1 e G2. Nos grãos de milho crioulo avaliados por Oliveira et al (2010) foi revelado contaminação máxima por aflatoxinas totais no valor de 2,6 ppb, enquanto nos grãos de milho armazenados para consumo analisados por Bento et al (2012) a concentração máxima de contaminação por aflatoxina B1 foi revelada no valor de 84,1 $\mu\text{g/Kg}$, seguida pela aflatoxina G1 no valor de 22,6 $\mu\text{g/Kg}$, depois aflatoxina B2 e aflatoxina G2 nos valores de máximos de 4,6 e 1,8 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Padrões, solventes e reagentes

Os padrões das aflatoxinas B1 (5 mg), B2, G1 e G2 (1 mg) utilizados foram da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). As soluções estoques ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e de trabalho ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) foram preparadas de acordo com AOAC (1990). As alíquotas da solução padrão em acetonitrila foram secas sob atmosfera de N_2 e diluídas em metanol para a obtenção das soluções estoques, que foram armazenadas em freezer. As soluções de trabalho foram obtidas por meio da diluição de alíquotas da solução estoque em metanol e armazenadas em frascos âmbar a 5°C . Foram confirmadas por absorvâncias a 362 nm utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1201 (Kyoto, Japan) (AOAC, 1990).

A água utilizada foi obtida por sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipore). Acetonitrila e metanol grau HPLC/UV foram usados na fase móvel e preparo das soluções padrões e foram adquiridos da Tedia (São Paulo, SP, Brasil), os demais solventes de extração e reagentes foram de grau analítico, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Para filtração das amostras foi utilizado papel filtro Whatman (qualitativo, n^o 1) e membrana de 13 mm em PVDF, com poros de $0,45 \mu\text{m}$ (Durapore[®] 13 mm , Millipore).

3.2. Amostras

3.2.1 Canjiquinha de milho

Foram adquiridos 150 Kg de canjiquinha de milho de uma indústria de alimentos, dividida e embalada de fábrica em sacos de polipropileno de 25 Kg cada. Então foram armazenadas em cilindros plásticos de 100 L em temperatura ambiente até a utilização nos experimentos.

3.2.2 Amostras comerciais de canjiquinha de milho e canjica branca

Durante os meses de Junho a Setembro de 2014 foram coletadas 46 unidades de 500 g das principais marcas de canjiquinha e canjica de milho comercializadas no município do Rio de Janeiro, RJ. Para tal foram escolhidos dez bairros de maneira aleatória. As 46 unidades estão divididas em dois tipos de produto: canjiquinha de milho ($n_1= 19$) e canjica de milho ($n_2= 27$). O critério adotado para a coleta foi à escolha de que cada unidade deveria pertencer a um lote diferente.

3.3 Parâmetros de validação estudados

Para verificar o desempenho do método analítico utilizado na determinação de aflatoxinas, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, recuperação, precisão, limites de detecção e quantificação. Todos os estudos foram conduzidos de acordo com as recomendações da SANTE (2016) Comunidade Europeia.

Seletividade é a capacidade de um método mensurar exatamente uma substância na presença de outros componentes da matriz. Neste estudo, ela foi avaliada pela ausência de interferentes nos mesmos tempos de retenção de cada uma das aflatoxinas.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico da resposta do sistema cromatográfico em função da concentração do analito e é verificada pela equação da regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2). Neste caso, foi realizada a padronização externa através de curva analítica de 5 pontos de diferentes concentrações dos padrões para as quatro

aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) em metanol. Cada curva foi preparada em quintuplicata e injetada em cinco dias diferentes.

Para análise da % recuperação foram realizados ensaios de recuperação onde utilizadas amostras em que não foram detectadas a presença das quatro aflatoxinas. Nesses ensaios as amostras foram fortificadas com solução padrão das quatro aflatoxinas em três níveis de concentração para cada aflatoxina (5 µg/Kg, 20 µg/Kg e 50 µg/Kg), com três repetições em cada nível de adição. O cálculo da recuperação para cada aflatoxina foi realizado através da relação entre as quantidades adicionada (teórica) e quantificada após extração (experimental).

As recuperações foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ rec} = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{teo}}} \times 100$$

Onde “Cexp” é a concentração determinada experimentalmente e “Cteo” é a concentração teórica adicionada.

O parâmetro precisão foi expresso pelo coeficiente de variação relativo (CV) como resultado da repetitividade obtida pelos ensaios de recuperação de cada nível de fortificação, adotando a variação máxima de 10% entre as repetições. A precisão do presente método analítico proposto foi expressa como o coeficiente de variação (CV) das medidas realizadas de acordo com a fórmula:

$$CV = \frac{s}{X} \times 100$$

Onde “s” é o desvio padrão e “X” a concentração média determinada. O valor máximo aceitável para o CV é de até 20% (SANTE, 2016).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) podem ser definidos como as menores concentrações do analito que se pode, respectivamente, detectar e quantificar. Foram calculados através da adição de concentrações decrescentes das quatro aflatoxinas nas amostras submetidas à extração e posterior quantificação por CLAE-DF até a menor concentração detectável (LD) e quantificável (LQ) sob condições adequadas de repetitividade (n= 4, CV <10%). O sinal produzido em forma de pico em resposta às diferentes concentrações do analito (quatro aflatoxinas) segue a razão de 3:1 e de 10:1 para o LD e o LQ, respectivamente.

3.4 Metodologia de extração adotada

25g de canjiquinha de milho foram misturados e pesados em frasco Erlenmeyer, em seguida foram adicionados 67,5 mL de metanol (PA) e 7,5 mL de solução aquosa KCl 4% (m/v), vedando o frasco e agitando por 1h (Orbit Shaker, modelo 3520). Após agitação foram adicionados no mesmo frasco 75 mL de CuSO₄ 10% (m/v) e 7,5 g de celite, homogeneizado com bastão de vidro por 1 min. Após a precipitação, o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo recolhendo-se 75 mL. O filtrado foi então transferido para o funil de separação previamente acrescido de 75 mL de água destilada. Foram adicionados 25 mL de hexano (PA), duas vezes, e agitando vigorosamente por 1 min. A fase hexânica (superior) foi descartada, em seguida foram adicionados ao balão duas porções de 25 mL de clorofórmio (PA), agitando vigorosamente por mais 1 min. A fase clorofórmica (inferior) foi recolhida e evaporada em banho-maria a 65°C sob fluxo de ar e proteção da luz. Com redução do volume

quase no final da secagem o extrato foi transferido quantitativamente para frasco âmbar, de 3 mL e então levado a resíduo sob fluxo de N₂.

3.5 Derivatização das aflatoxinas

O extrato foi ressuspendido com 600 µL de acetonitrila (PA), submetido a banho de ultrassom por 30 s. Logo após foi adicionado 1200 µL da solução derivatizante previamente preparada e constituída por água deionizada, ácido trifluoracético e acetonitrila (7: 2: 1, v/v/v). O frasco foi vedado e submetido a banho-maria a 65°C por 9 min para reação de derivatização (AOAC, 2005). Por fim o extrato foi filtrado em membrana Millipore 0,45 µm e submetido à injeção no sistema cromatográfico.

3.6 Quantificação das aflatoxinas e condições cromatográficas

A quantificação das aflatoxinas foi realizada em sistema CLAE-DF, utilizando-se a detecção por fluorescência (Agilent 1100 Series (Waldbronn, Alemanha), injetor Rheodyne (20 µL), coluna C₁₈ Ace (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), derivatização pré-coluna como descrito no item 2.2.2 e fase móvel em modo isocrático composta por água, metanol e acetonitrila a 70: 20: 10 (v/v/v), em fluxo de 1,0 mL/min. Os valores de excitação e de emissão foram de 365 nm e 450 nm, respectivamente, com leitura em valor de ganho 13.

3.7 Detecção de aflatoxinas nas amostras comerciais

Alíquotas de cada amostra comercial (item 3.2.2) foram preparadas para detecção e quantificação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por CLAE-DF como descrito nos itens 3.4, 3.5, 3.6 e realizadas no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – Instituto de Veterinária – UFRRJ.

3.7.1 Caracterização do risco de exposição pela aflatoxina B1 em diferentes grupos de consumidores

Os dados de disponibilidade de alimento foram obtidos da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2008-2009 fornecido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011).

Para estimativa da exposição humana à aflatoxina B1 presente no alimento pesquisado foram utilizados três dados essenciais: a concentração da substância no alimento (mg/kg), o consumo do alimento (kg) e o peso corpóreo (kg) (individual ou da população em estudo). A estimativa da exposição, dada em mg/kg peso corpóreo, pode ser definida de uma maneira geral pela Equação (1):

$$\text{Exposição} = \frac{\text{concentração da substância} \times \text{consumo do alimento}}{\text{peso corpóreo}} \quad \text{Equação (1)}$$

Para caracterizar o risco da exposição a substâncias carcinogênicas e genotóxicas, como a aflatoxina B1, foi realizado o cálculo da Margem de Exposição (MOE), utilizando a BMDL₁₀ (*benchmark dose lower confidence limit*) no valor de 0,17µg/kg pc/dia como referência toxicológica para aflatoxina B1 (EFSA, 2007). Valores da MOE calculada menores que 10.000 podem indicar preocupação em saúde pública (EFSA, 2005). O cálculo foi realizado conforme a Equação (2):

$$MOE = \frac{\text{referência toxicológica}}{\text{estimativa de exposição}} \quad \text{Equação (2)}$$

3.8 Condições do processo de ozonização

Os ensaios de ozonização foram realizados no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro – RJ.

Para a realização dos ensaios de ozonização, foi elaborado um protótipo composto por um cilindro de oxigênio de alto grau de pureza (oxigênio premier 99,99%, AirProducts, Rio de Janeiro, RJ), com válvula de regulagem de fluxo de O₂ acoplado ao ozonizador Ozone&Life 3.0 RM (Figura 4), três cilindros de PVC (60 x 15 cm, comprimento x diâmetro) e, uma sequência de três frascos lavadores de gás, preenchidos com iodeto de potássio 2%.

Os grãos de canjiquinha de milho foram acondicionados no interior dos cilindros, os quais foram suspensos a 10 cm do fundo através de um suporte de silicone e tecido de poliamida. Todas as válvulas e demais conexões utilizadas no protótipo eram de cobre e as mangueiras de silicone. A vedação do sistema, quando necessária, foi realizada com cola de silicone. A Figura 5 demonstra o esquema do sistema de ozonização utilizado e na Figura 6 é apresentada uma imagem do sistema elaborado e utilizado na presente pesquisa.



Figura 4 - Gerador de Ozônio Modelo O&L3.0 RM.

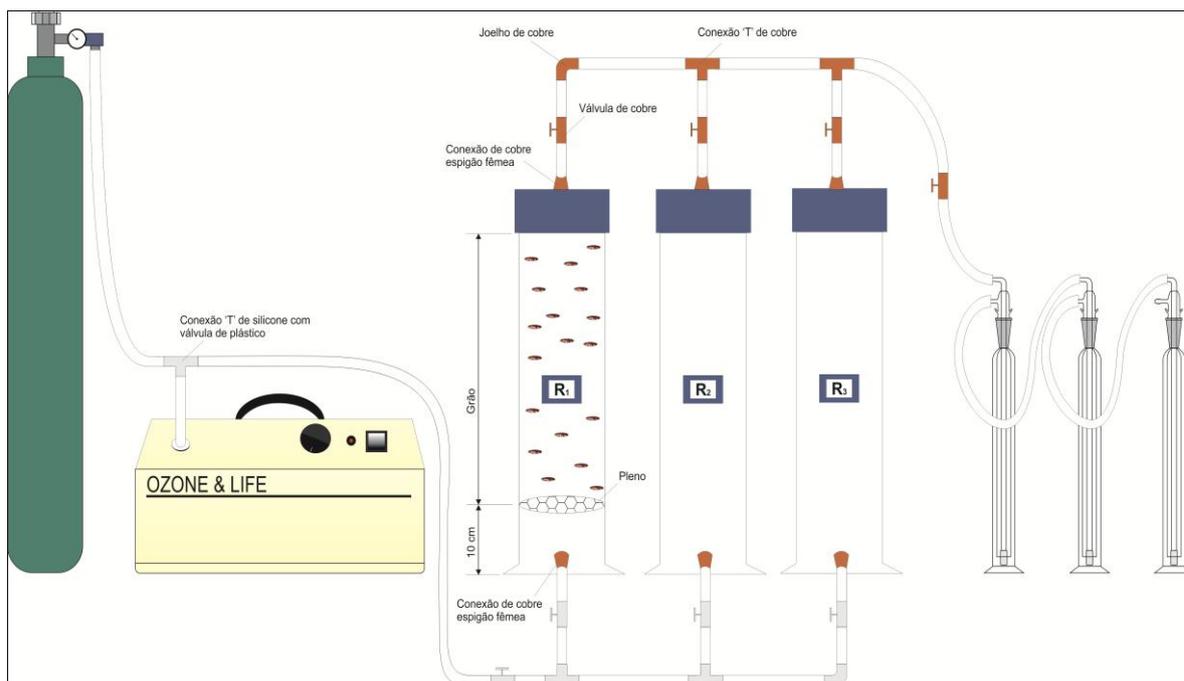


Figura 5 – Esquema ilustrado do sistema de ozonização dos grãos de canjiquinha de milho.

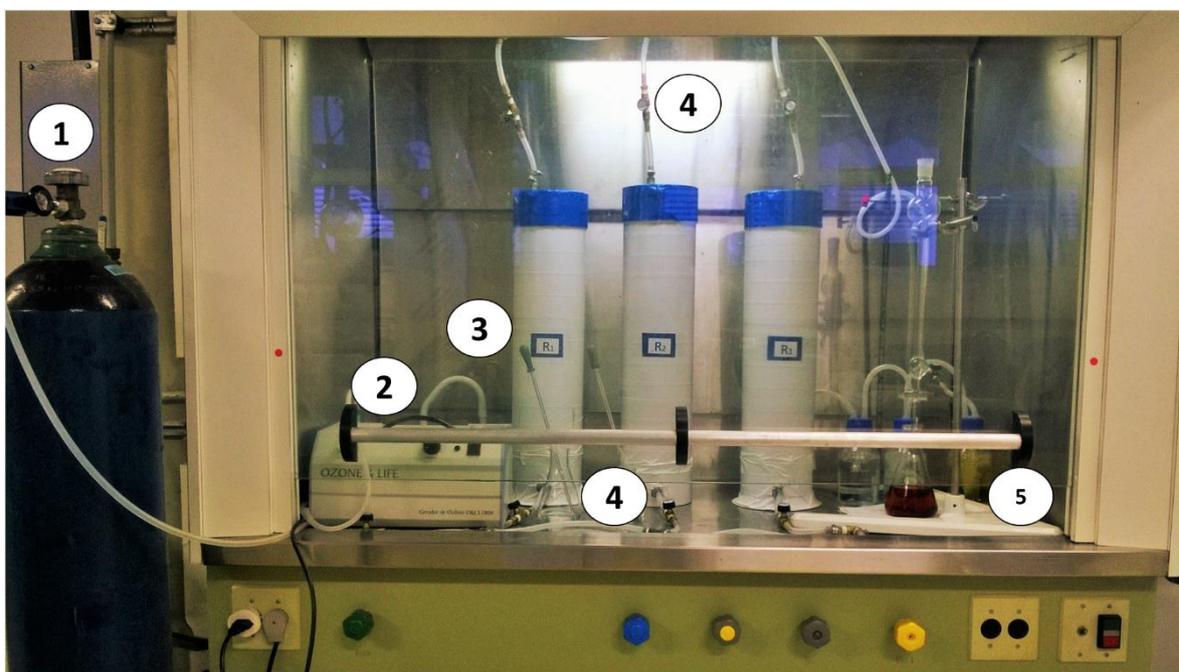


Figura 6 – Sistema de ozonização utilizado na pesquisa: 1- Cilindro de O_2 com válvula de controle de fluxo. 2- Ozonizador. 3- Cilindros de PVC contendo grãos de canjiquinha de milho. 4- Válvulas de cobre. 5 - Frascos com solução de iodeto de potássio.

Foi determinado para a presente pesquisa três diferentes concentrações de O_3 para os ensaios. Para tal o ozonizador teve a posição do dosador fixada no número 2 (produção de 20 mg/L), número 4 (produção de 40 mg/L) e número 8 (produção 60 mg/L). Essas

concentrações foram determinadas conforme a realização de testes preliminares, então, fixando o fluxo de oxigênio para 0,5 L/min, utilização de oxigênio de alto grau de pureza como insumo para produção de O₃ e utilizando o método iodométrico para quantificação da produção de O₃ (APHA, 1998).

A metodologia utilizada para a confirmação da concentração de ozônio produzido foi por titulometria APHA (1998). Consiste no borbulhamento com ozônio gasoso em uma solução de iodeto de potássio (KI) a 2%, ocorrendo a alcalinização da solução. A solução ozonizada é então acidificada com ácido sulfúrico 1 N, liberando o iodo (I₂). Imediatamente após a formação de I₂ é realizada a titulação com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃), até que a solução atinja coloração amarelo claro. Após, adiciona-se solução indicadora de amido, tornando a solução azulada. Proceder-se novamente a titulação até que a mesma se torne transparente. A seguir é descrito o passo-a-passo da quantificação:

1 - Preparar 400 mL de solução de iodeto de potássio a 2 %; 2 - Programar o equipamento para a concentração desejada, borbulhar a solução com O₃ por 2 minutos; 3 - Após o tempo de contato, coletar 200 mL da solução ozonizada; 4 - Acidificar os 200 mL com 4 mL de ácido sulfúrico 1N (fixação); 5 - Titular a solução com tiosulfato de sódio 0,005 M até atingir coloração amarelo claro; 6 - Adicionar 2 mL de solução de amido, tornando a amostra azulada; 7 - Continuar a titulação com tiosulfato de sódio até que a amostra fique transparente; 8 - Anotar o volume de tiosulfato de sódio 0,005 M gasto na titulação e calcular a produção de ozônio em g O₃/h e em mg/L. 9 – Calcular também a concentração de ozônio presente no frasco lavador (*off-gas*) e somar ao resultado obtido no passo 8.

3.9 Ensaio para ozonização

3.9.1 Delineamento experimental

A ozonização da canjiquinha de milho foi realizada através de um planejamento fatorial completo 2³ (três variáveis independentes), onde foram testadas diferentes combinações de concentração de ozônio (em mg/L), tempo de exposição da canjiquinha ao processo (em min) e massa de canjiquinha (em Kg). Foram incluídos 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Na Tabela 4 é apresentada a matriz do DCCR.

Tabela 4 – Matriz do delineamento experimental com valores codificados e reais

| Ensaio | Concentração de ozônio (mg/L) | Tempo de exposição (min) | Massa de milho (Kg) |
|--------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| 1 | -1 (20) | -1 (120) | -1 (1) |
| 2 | -1 (20) | +1 (480) | -1 (1) |
| 3 | +1 (60) | -1 (120) | -1 (1) |
| 4 | +1 (60) | +1 (480) | -1 (1) |
| 5 | -1 (20) | -1 (120) | +1 (5) |
| 6 | -1 (20) | +1 (480) | +1 (5) |
| 7 | +1 (60) | -1 (120) | +1 (5) |
| 8 | +1 (60) | +1 (480) | +1 (5) |
| 9 | 0 (40) | 0 (300) | 0 (3) |
| 10 | 0 (40) | 0 (300) | 0 (3) |
| 11 | 0 (40) | 0 (300) | 0 (3) |

As variáveis independentes foram estipuladas com base em publicações envolvendo ozonização de diferentes grãos visando à degradação de micotoxinas. As variáveis foram: 1 – Concentração do ozônio (de 20 a 60 mg/L), 2 – tempo de exposição da canjiquinha de milho ao processo (de 120 a 480 min), 3 – Massa de canjiquinha de milho (de 1 a 5 Kg). A avaliação dos resultados foi realizada por metodologia de superfície de resposta, de acordo com Rodrigues e Lemma (2009) e Calado e Montgomery (2003), usando o software STATISCA[®] 7.0. Como controles, foram utilizadas amostras de 3 Kg de canjiquinha de milho, submetidas aos mesmos processos que as amostras dos 11 ensaios, no entanto, os controles foram expostos ao oxigênio durante 480 min, sem produção de ozônio.

3.9.2 Contaminação das amostras com fungos

Foi realizada no Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – Instituto de Veterinária – UFRRJ. No mesmo laboratório foram realizadas também as etapas descritas no item 3.10.

Previamente foram utilizadas alíquotas de canjiquinha de milho (item 3.2.1) para isolamento de acordo com as recomendações de Samson et al. (2010). Para tal foram utilizados 25 g de grãos, diluídos em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, agitados manualmente por 1 min e então alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em superfície nos meios de cultura Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC), Malt Extract Agar (MEA) e Potato Dextrose Agar (PDA) Himedia[®], nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . As placas contendo os inóculos foram incubadas a 25 °C durante 5 dias.

As colônias típicas de *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp foram repicadas para outras placas contendo meio PDA e identificadas em nível de gênero com auxílio de microscópio (Olympus, BX51, Melville, USA), através das características morfológicas. Após identificação, as colônias foram repicadas para tubos contendo meio PDA inclinado e, novamente incubadas a 25 °C por 5 dias para a produção de biomassa. Após esse período, foram adicionados aos tubos contendo ágar inclinado 3 mL de água destilada estéril contendo 0,01% de Tween. Os tubos foram homogeneizados em vortex (IKA C-MAG HS7) por 30 seg e a solução contendo suspensão de conídios, fragmentos de micélio e agar foram filtradas em gaze estéril.

Os conídios presentes no filtrado foram então quantificados (em nº de conídios/mL) utilizando câmara de Neubauer, de acordo com metodologia recomendada por Menezes e Silva-Hanlin (1997). Quando necessário, a diluição da solução foi realizada adicionando água destilada esterilizada, sendo novamente realizada a contagem em câmara de Neubauer. Quantidades suficientes em µL da solução contendo os conídios foram adicionadas em amostras de 25 g de canjiquinha de milho, homogeneizados, para que fosse obtida a quantidade final de $1,0 \times 10^5$ conídios/g de amostra.

As amostras contaminadas com os conídios foram então embaladas em tecido de organza (100% poliamida) e armazenadas a -5 °C até a realização dos experimentos de ozonização.

Todos esses procedimentos foram realizados em câmara de segurança biológica.

3.9.3 Contaminação das amostras com aflatoxinas

A contaminação de cada alíquota de amostra de canjiquinha de milho (item 3.2.1) foi realizada com as soluções de trabalho preparadas como descrito no item 3.1. Dessa maneira as soluções de aflatoxinas metanólicas, com concentrações próximas a 5 µg/mL, de cada uma das aflatoxinas, foram adicionadas em cada uma das amostras de 25 g de canjiquinha de milho (item 3.2.1), para que fosse obtida a concentração de 50 µg/Kg de cada uma das

aflatoxinas. As amostras foram embaladas em tecido de organza (100% poliamida) e armazenadas a -10 °C até a realização dos experimentos de ozonização.

3.10 Avaliação microbiológica dos efeitos da ozonização

3.10.1 Fungos filamentosos totais

Para avaliar se o processo de ozonização promoveu redução na contagem de fungos após a ozonização, foram realizadas determinação de fungos totais em meio DRBC. Os procedimentos de análise adotados foram de acordo com o método oficial para contagem de fungos filamentosos em alimentos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (IN 62 de 2003).

As amostras de 25 g de canjiquinha de milho contaminadas com conídios de *Fusarium* spp e *Aspergillus* spp (item 3.9.2) que foram ozonizadas e, as amostras controle, também contendo 25 g de canjiquinha de milho, foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL e então adicionados 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Cada amostra foi homogeneizada por aproximadamente 60 s, sendo essa a diluição 10^{-1} . A partir de tal, foram efetuadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , utilizando tubos de solução salina peptonada contendo 9 mL.

O plaqueamento no meio DRBC foi realizado em superfície, com inóculos de 0,1 mL e incubados a 25° C durante 5 dias em incubadora B.O.D. Após este período foi realizada a contagem total de colônias e os resultados foram expressos em CFU / g de grãos de canjiquinha de milho.

A análise estatística dos resultados foi realizada por Análise de Variância (ANAVA) e estatística descritiva, utilizando o software Sisvar 5.0 (UFLA).

3.10.2 Microrganismos mesófilos totais

Essa análise foi realizada de acordo com o método oficial do MAPA (2003) para contagem padrão em placa, a qual se baseia na semeadura da amostra em Agar padrão para contagem (PCA) seguida de incubação em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h, conforme os procedimentos a seguir. De cada amostra de 25 g de canjiquinha de milho ozonizada foi preparada a diluição 10^{-1} , depois foram transferidas individualmente para o frasco Erlenmeyer, onde foram adicionados 225 mL de solução salina peptonada 0,1% homogeneizadas por aproximadamente 60 s. A partir dessa diluição inicial (10^{-1}) foram efetuadas as demais diluições até chegar à diluição 10^{-6} com solução salina peptonada 0,1%. Depois, cada uma das diluições foi semeada, em triplicata, em placas de Petri estéreis onde foram adicionados 20 mL de meio PCA previamente fundido mantido em banho-maria a 45°C e homogeneizada o Ágar com o inóculo com movimento em “8”. Em seguida as placas de Petri foram deixadas em superfície plana para solidificação do meio com o inóculo e incubadas invertidas na B.O.D a 36°C por 48h. Após este período, as colônias totais foram contadas e os resultados foram expressos em CFU / g de grãos de canjiquinha de milho.

3.10.3 Concentrações de aflatoxinas

Foram avaliados os efeitos da ozonização nos níveis das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 presentes nas amostras contaminadas (item 3.9.3). Cada amostra foi submetida à metodologia de extração e quantificação de aflatoxinas por CLAE-DF estabelecidas nos itens 3.4, 3.5 e 3.6, respectivamente.

3.11 Efeitos da ozonização nas características físico-químicas da canjiquinha de milho

Para as análises a seguir foram colhidas alíquotas de cada amostra de canjiquinha de milho da massa ozonizada, como descrito no delineamento experimental (item 3.9.1). Todas foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos – CTAA da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro – RJ.

3.11.1 Determinação do pH

Foi utilizado um potenciômetro para determinação direta e precisa do pH (Metronal, modelo E 120). A metodologia utilizada na presente pesquisa foi a 017/IV Determinação do pH preconizada pelo Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). Foram pesados 10 g de cada amostra em um béquer, em triplicata, depois foram diluídas com 100 mL de água deionizada e homogeneizadas com auxílio de bastão de vidro até que as partículas ficassem uniformemente suspensas. Em seguida, após calibração do potenciômetro com soluções padrão, a determinação do pH das amostras foram realizadas conforme as instruções do manual do fabricante.

3.11.2 Determinação da acidez total titulável

A metodologia utilizada no presente trabalho foi a 016/IV Acidez preconizada pelo Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008), seguindo os seguintes procedimentos. Foram pesadas 5g de cada amostra, em triplicata, e transferidas individualmente em frasco de Erlenmeyer de 125 mL com auxílio de 50 mL de água deionizada. Em seguida, em cada amostra, foram adicionadas 4 gotas de solução de fenolftaleína e fez-se a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M com auxílio de pipeta volumétrica de 10 mL até atingir a coloração rósea. Então foram anotados os volumes gastos e os cálculos efetuados conforme a equação abaixo:

Equação:

$$\% \text{ acidez total} = \frac{V \times f}{P \times c} \times 100 \quad (V|P)$$

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M gasto na titulação (mL)

f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M

P = peso da amostra usado na titulação (g)

c = correção para solução de NaOH 1 M, 10 para solução NaOH 0,1 M e 100 para solução NaOH 0,01 M.

3.11.3 Determinação do teor de umidade e atividade de água

A metodologia utilizada no presente trabalho foi a 012/IV Perda por dessecção (umidade) – Secagem direta em estufa a 105°C, preconizada pelo Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008), seguindo os seguintes procedimentos. Em balança analítica foram pesados 10 g de cada amostra ozonizada, também, a amostra controle e o branco, todos em triplicata, sendo acondicionados individualmente em graal de porcelana, previamente taradas. Todas as amostras foram levadas para secagem direta em estufa e submetidas à temperatura de 105°C por um período de 3 horas. Após término deste período, as amostras foram acondicionadas em dessecador com sílica para resfriar até a temperatura ambiente. Após resfriamento, as

amostras foram pesadas novamente e o cálculo de determinação da umidade seguiu como a equação abaixo.

Equação:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{N}{P} \times 100 \quad \langle p|p \rangle$$

N = perda de massa da amostra (g)

P = peso da amostra (g)

Para determinação de atividade de água foi utilizando um equipamento Aqualab CX-2T (Decagon Devices Inc., EUA) com metodologia de acordo com o procedimento dos fabricantes.

3.11.4 Avaliação da influência na cor

Essa análise foi realizada 14 dias após a ozonização das amostras. A análise instrumental de cor foi procedida através de colorímetro digital Konica Minolta (CR-400) em sistema tridimensional L a* b*, sistema CIELAB. Onde L* indica a luminosidade que varia entre valor 0 (para uma amostra preta; mínima refletância) e 100 (amostra branca; máxima refletância), a* consiste no eixo que vai do vermelho (valores positivos) ao verde (valores negativos) e o b* que vai do amarelo (valores positivos) ao azul (valores negativos). Com resultados expressos em ângulo Hue (ângulo da intensidade da cor (h)). Para cada amostra foram realizadas 10 leituras. A calibração do equipamento foi realizada com o disco branco (100) do equipamento após a leitura de cada tratamento.

3.11.5 Avaliação das características sensoriais

Esse estudo foi realizado 14 dias após a ozonização das amostras com aprovação no comitê de ética da UFRJ (número do processo 23083.000030/2015-33).

Foi realizado um teste sensorial para atestar a possibilidade de alterações no aroma e na aparência da canjiquinha de milho após o tratamento pelo ozônio. Desse modo, 25 provadores treinados avaliaram através de um painel um total de quatro amostras, sendo uma delas a amostra controle não ozonizada utilizada como referência e mais outras três amostras codificadas que foram ozonizadas. Essas amostras ozonizadas foram colhidas de diferentes tratamentos, sendo uma que foi submetida a baixa exposição ao O₃ (tratamento 5), uma que foi submetida a média exposição ao O₃ (tratamento 9) e uma que foi submetida a alta exposição ao O₃ (tratamento 4). Para a avaliação, os provadores utilizaram uma escala numerada de 1 a 5 para qualificar a existência ou não de diferença entre as amostras codificadas e o controle. A numeração seguiu da seguinte forma: 1 – nenhuma diferença; 2 – pouca diferença; 3 – moderada diferença; 4- muita diferença e; 5- extremamente diferente. Ao final do estudo cada provador realizou duas avaliações somando um total de 50 respostas.

3.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando estatística descritiva e Análise de Variância (ANOVA) com comparação das médias por Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Todos os dados foram tratados no Software Sisvar[®] 5.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostras

Alíquotas de canjiquinha de milho (item 3.2) foram utilizadas previamente para realização da validação intralaboratorial de metodologia de extração para quantificação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF), definida e descrita nos itens 3.4, 3.5 e 3.6.

Após a definição da metodologia de extração e quantificação por CLAE-DF das aflatoxinas pela validação intralaboratorial, alíquotas finalmente foram preparadas para os ensaios de ozonização como descritos no item 3.10.

4.2 Método

Os resultados mostraram que a metodologia de extração de aflatoxinas para canjiquinha de milho, baseada no método multimicotoxinas proposto por Rodriguez Amaya e Valente Soares (1989) adaptada às condições laboratoriais da presente pesquisa para quantificação por CLAE-DF foi adequada em todos os parâmetros de validação analisados.

4.2.1 Métodos testados para a extração e quantificação das aflatoxinas

Foi necessário inicialmente definir uma metodologia para determinação e quantificação de aflatoxinas por CLAE-DF mais adequada de acordo com as condições de análises disponíveis no laboratório. Dessa forma, foram selecionadas duas metodologias de extração mais utilizadas no Brasil e essas foram avaliadas com objetivo de obter a mais adequada para a extração de aflatoxinas em grãos de milho. Os critérios iniciais adotados para a escolha da metodologia foram a taxa de recuperação e a seletividade do método. A primeira metodologia testada e adaptada é preconizada pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), realizando extração com clorofórmio, remoção dos interferentes por filtração, partição líquido-líquido com metanol-água-hexano e metanol-água-clorofórmio, derivatização pré-coluna com ácido trifluoroacético e quantificação por CLAE-DF.

A segunda metodologia foi adaptada a partir do método multimicotoxinas proposto por Valente Soares e Rodriguez-Amaya (1989), consistindo na extração com metanol e cloreto de potássio, purificação por filtração, precipitação com sulfato de cobre, adição de celite e partição líquido-líquido com metanol-água-hexano e metanol-água-clorofórmio, derivatização pré-coluna com solução composta por ácido trifluoroacético e quantificação por CLAE-DF. Esta foi a metodologia que mais se apresentou satisfatória às condições laboratoriais para a presente pesquisa.

4.2.2 Validação dos parâmetros analíticos

Os resultados de recuperação e repetitividade estão apresentados na Tabela 6. Todos os valores de recuperação encontram-se dentro das faixas preconizadas pela Comissão Europeia, bem como coeficiente de variação (EC, 2006) para cada uma das aflatoxinas em todos os níveis de fortificação analisados (5, 20 e 50 µg/Kg), com variação máxima abaixo de 10 %.

Recuperação

A metodologia de extração de aflatoxinas utilizada no presente trabalho também foi adotada por diversos pesquisadores para identificar a presença dessas micotoxinas em matrizes ou produtos derivados do milho.

Mattos et al (2009) afirmaram ter obtido recuperação média superior a 71,7% para cada uma das aflatoxinas com esta metodologia. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores, que também quantificaram as aflatoxinas, por cromatografia de camada delgada (CCD) (SEKIYAMA et al, 2005; KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006; AMARAL et al, 2006). Utilizando a metodologia de extração proposta por Mallmann et al (2000) com quantificação por CLAE-DF, Bento et al (2012) encontraram valores de recuperação, das aflatoxinas B1 e G1 semelhantes, porém para B2 e G2 foram inferiores, sendo 63,2% e 58,9%, respectivamente.

Neste estudo, a utilização de CLAE-DF associada ao método de extração escolhido, propiciou a obtenção de percentagens de recuperação nas faixas de 83,8 a 107,6 %, valores estes que estão dentro das recomendações da UE. De forma mais precisa, os ensaios de recuperação das quatro toxinas apresentaram % Rec. Média para B1 - 95,4%; B2 - 95,3 %; G1 - 100,2 %; G2 - 88,2 %, além de coeficiente de variação (%CV) de 7,68. Estes resultados se encontram na Tabela 5. Considerando que os limites estabelecidos pela SANTE (2016) onde a faixa de recuperação aceitável é de 70 a 120% e o coeficiente de variação deve ser < 20%, os resultados obtidos estão de acordo com os critérios de validação exigidos pela UE tornando válida e aceita a metodologia empregada neste trabalho.

Tabela 5: Média dos ensaios de recuperação em canjiquinha de milho adicionadas com 5, 20 e 50 µg/Kg de cada uma das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

| Aflatoxina | Nível de fortificação (µg/Kg) | Recuperação ¹ (%) | Média (%) | CV (%) |
|------------|-------------------------------|------------------------------|-----------|--------|
| B1 | 5 | 85,7 % | 95,4 | 10,55 |
| | 20 | 96,1 % | | |
| | 50 | 105,1 % | | |
| B2 | 5 | 89,7 % | 95,3 | 11,23 |
| | 20 | 88,5 % | | |
| | 50 | 107,6 % | | |
| G1 | 5 | 95,1 % | 100,2 | 4,60 |
| | 20 | 101,3 % | | |
| | 50 | 104,1 % | | |
| G2 | 5 | 90,9 % | 88,2 | 4,36 |
| | 20 | 83,8 % | | |
| | 50 | 89,6 % | | |

¹Média referente a quatro extrações para cada nível de fortificação.

Linearidade

Neste parâmetro, pode-se observar que na curva analítica de cada uma das quatro aflatoxinas apresentaram coeficientes de correlação (R^2) com valores entre 0,9911 e 0,9995 (Figura 7).

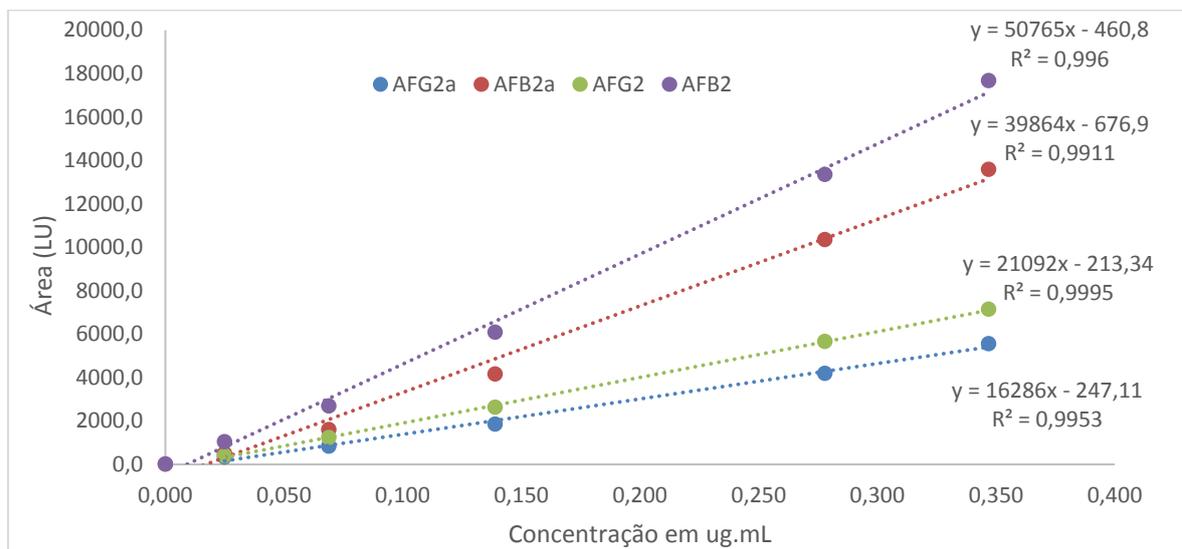


Figura 7: Curvas analíticas obtidas por padronização externa através de 5 pontos de diferentes concentrações dos padrões das aflatoxinas.

É recomendado pela ANVISA (2003) que esse valor seja de 0,99 para coeficiente de correlação, enquanto o INMETRO (2003) estipula valor acima de 0,90. Sendo assim, foi constatado que a metodologia utilizada neste estudo atende as recomendações destes órgãos com relação à linearidade dos resultados.

Limites de detecção e de quantificação

Nas condições experimentais adotadas, os limites de detecção do método foram de 0,8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para todas as aflatoxinas, valores bem próximos aos descritos por Kawashima & Valente Soares (2006), entretanto outros autores adotaram valores variados e ligeiramente superiores a estes (SEKIYAMA et al, 2005; AMARAL et al, 2006).

O limite de quantificação do método utilizado neste estudo, foi de 3,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, para todas as 4 aflatoxinas avaliadas resultados estão apresentados no Tabela 6. Valores estes, superiores aos obtidos por Mattos et al (2009) que obtiveram valores ligeiramente mais sensíveis como 2,08, 0,84 e 3,04 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para as aflatoxinas B1, B2 e G2, respectivamente.

Visto que na legislação nacional o limite para os níveis de aflatoxinas no tipo de amostra analisada nessa pesquisa é de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, é portanto aceitável os LD e LQ obtidos com o método utilizado ou seja, podem ser considerados suficientes para a avaliação das amostras de mercado.

O método adotado e utilizado nesse estudo mostrou ser sensível, seletivo, preciso e com valores de recuperação acima de 80 % para cada uma das aflatoxinas em amostras de matriz de milho. Desta forma esta metodologia pode ser considerada adequada para extração e

quantificação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por CLAE-DF em amostras de canjiquinha e canjica de milho.

Tabela 6: Faixa de trabalho, equação da reta, coeficiente de determinação (R^2) e limites de detecção e quantificação de metodologia para quantificação de aflatoxinas em canjiquinha.

| Aflatoxina | Faixa de trabalho ($\mu\text{g/Kg}$) | Equação $y = ax + b$ | R^2 | LD ($\mu\text{g/Kg}$) | LQ ($\mu\text{g/Kg}$) |
|----------------|--|-----------------------|-------|-------------------------|-------------------------|
| B ₁ | 3,6 – 50,0 | $y = 39864x - 676,9$ | 0,991 | 0,8 | 3,6 |
| G ₁ | | $y = 16286x - 247,11$ | 0,995 | | |
| G ₂ | | $y = 21092x - 213,34$ | 0,999 | | |
| B ₂ | | $y = 50765x - 460,8$ | 0,996 | | |

4.3 Calibração do ozonizador e quantificação do ozônio produzido

Após a realização de testes preliminares foi constatado que, nas condições experimentais da presente pesquisa, a produção de ozônio indicada pelo fabricante do equipamento ozonizador foi diferente da produção real quantificada pelo método iodométrico. Portanto, foi fixado o fluxo de oxigênio para 0,5 L/min e, a única outra variável controlável utilizada para a variação de produção de ozônio foi a posição do dosador de descarga elétrica, o qual varia de 0 a 10. Conforme apresentado na Figura 8, o aumento da posição do dosador é proporcional ao aumento da produção de ozônio.

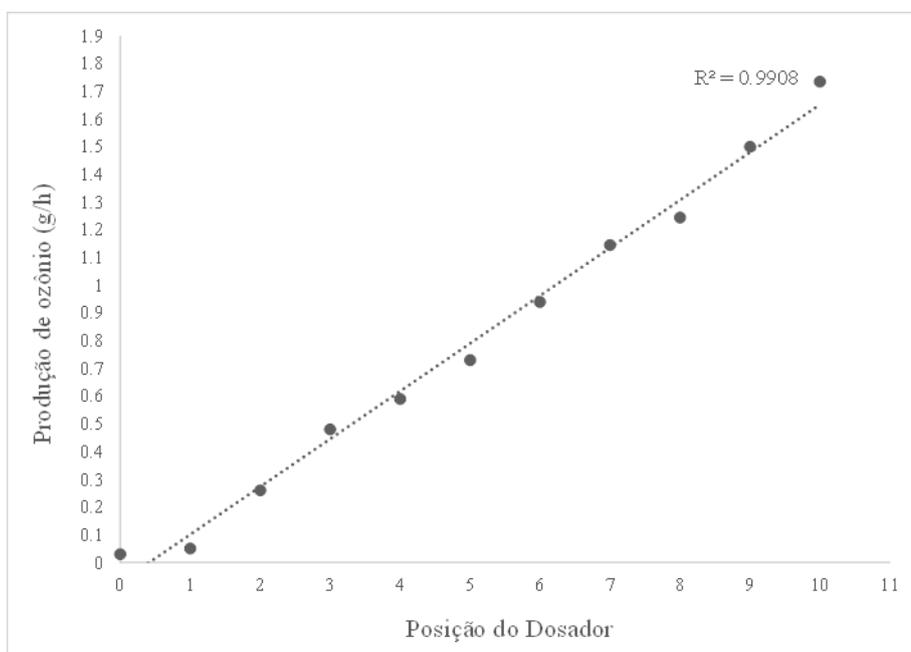


Figura 8 – Produção de ozônio (g/h) a partir da variação da posição do dosador de voltagem do ozonizador.

O ozônio utilizado nos experimentos foi produzido por processo eletroquímico, utilizando o equipamento Ozone&Life 3.0 RM que possui capacidade de produção de até 3,0 g de O₃/h. A concentração é regulada manualmente, através do dosador de frequência, com 10 posições e pelo regulador de fluxo de oxigênio que foram utilizadas para a calibração do fluxo para obtenção da concentração de O₃ a ser utilizada. A partir de tais parâmetros foi possível definir a concentração desejada de ozônio, conforme apresentado na Tabela 7.

A produção de ozônio pode variar devido a pureza do oxigênio, estabilidade da corrente elétrica e outros fatores externos ao experimento. Sendo assim, a confirmação da produção do O₃ foi realizada após metodologia adequada.

Tabela 7 – Calibração do ozonizador para produção de diferentes concentrações de ozônio (mg/L).

| Posição do dosador | Produção aproximada de O ₃ (mg/L) a partir da variação de O ₂ (L/min)* | | | | |
|--------------------|--|--|--|--|--|
| | O ₂ a 1,0 L.min ⁻¹ | O ₂ a 3/4 L.min ⁻¹ | O ₂ a 1/2 L.min ⁻¹ | O ₂ a 1/4 L.min ⁻¹ | O ₂ a 1/8 L.min ⁻¹ |
| 1 | 0,5 | 1,5 | 2 | 6 | 8 |
| 2 | 4 | 6 | 9 | 17 | 26 |
| 3 | 7 | 11 | 15 | 26 | 39 |
| 4 | 10 | 14 | 20 | 34 | 49 |
| 5 | 13 | 18 | 26 | 42 | 57 |
| 6 | 17 | 22 | 32 | 49 | 64 |
| 7 | 20 | 27 | 38 | 55 | 75 |
| 8 | 25 | 31 | 45 | 61 | 82 |
| 9 | 28 | 34 | 48 | 67 | 88 |
| 10 | 30 | 36 | 50 | 72 | 95 |

*Dados obtidos do fabricante do equipamento.

4.4 Determinação de aflatoxinas em amostras comerciais

No Brasil, a legislação vigente para aflatoxinas em produtos derivados do milho é para aflatoxinas totais (B1 + B2 + G1 + G2) com limite máximo de 20 µg/Kg determinado pela ANVISA (BRASIL, 2011). Nessa pesquisa foram analisadas 19 amostras do produto canjiquinha e 27 amostras do produto canjica branca, totalizando 46 amostras. Foi detectada a contaminação com pelo menos uma das quatro aflatoxinas em 22 amostras (47,8%) do total analisado. Os resultados estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8: Incidência das aflatoxinas nas amostras comerciais analisadas

| Produto | Amostras Positivas | Amostras Analisadas | Incidência (n° positivas/total) | | | |
|----------------|--------------------|---------------------|---------------------------------|-------|---------------------|------|
| | | | B1 | B2 | G1 | G2 |
| Canjiquinha | 10 | 19 | 7/19 | 7/19 | Nd ¹ /19 | 2/19 |
| Canjica branca | 12 | 27 | 9/27 | 6/27 | 2/27 | 4/27 |
| TOTAL | 22 | 46 | 16/46 | 13/46 | 2/46 | 6/46 |

¹Nd – não detectado.

Em pesquisa nos centros comerciais de cidades de outros estados do Brasil, alguns autores também relataram a incidência de aflatoxinas em canjiquinha e canjica de milho além da presença das mesmas em outros produtos derivados do milho, ou em grãos também, porém a amostragem pesquisada por esses autores sobre produtos semelhantes ao do presente trabalho foi menor.

A contaminação por aflatoxinas totais variou em concentrações de 0,3 a 8,9 µg/Kg. Os resultados estão expressos na Tabela 9 e Tabela 10. Outras pesquisas revelaram valores bastante variados na contagem de aflatoxinas totais e, considerando àqueles que incluíram canjiquinha e canjica de milho, têm-se o valor de 23,9 µg/Kg e 13,3 µg/Kg para aflatoxinas totais para as únicas amostras contaminadas desses dois produtos, respectivamente (AMARAL et al, 2006). Kawashima e Valente Soares (2006) revelaram variações contaminação por aflatoxinas totais de valores até 11, 16 e 20 µg/Kg para os produtos contaminados de quirera fina ($n=1/6$), canjica ($n=1/9$) e quirera ($n=2/6$), respectivamente. Enquanto Ferreira et al (2013) revelaram valores mais baixos de contaminação por aflatoxinas totais variando entre 0,008 a 1,1 µg/Kg nos produtos de canjiquinha contaminados ($n=3/6$).

Na cidade de Campina Grande – PB, Mattos et al (2009) analisaram 40 amostras de grãos de milho destinados a uma empresa alimentícia, não detectaram nenhuma contaminação por aflatoxinas totais, porém esses autores não descartaram a presença das mesmas apontando principalmente a possibilidade de haver baixos índices de concentração como o maior fator de dificuldade para detecção através da metodologia adotada naquela pesquisa.

Oliveira et al (2010) avaliaram a contaminação por aflatoxinas totais em amostras de diferentes variedades de milho crioulo ($n=10$) para consumo originadas em três diferentes municípios do Paraná e em Pelotas – RS. Esses autores detectaram a contaminação por aflatoxinas totais em 70% das amostras.

No estado do Mato Grosso – MT, Bento et al. (2012) pesquisaram a ocorrência de aflatoxinas em grãos de milho ($n=84$) em diversas regiões (norte, sul, leste, oeste) comparando duas safras de anos diferentes, onde detectaram contaminação positiva para aflatoxinas totais em 21,4% das amostras, ou seja, 18 estavam contaminadas.

Das aflatoxinas pesquisadas, a forma B1 foi detectada com maior frequência, ocorrendo em 16 (72,7 %) das 22 amostras positivas analisadas, variando suas concentrações entre 0,3 a 7,1 µg/Kg. A forma B2 foi a segunda em maior ocorrência dentre as positivas, totalizando 13 (59,1 %) amostras com concentrações variando de 0,3 a 1,8 µg/Kg. Outros trabalhos também revelam a frequência maior por presença da forma B1 seguida pela B2; Kawashima e Valente Soares (2006) revelaram ainda valores maiores em variações de contaminação por aflatoxinas B1 e B2 na canjiquinha (de “não detectado” à 20 µg/Kg) e na canjica de milho (de “não detectado” à 16 µg/Kg). Sekiyama et al (2005), em outros produtos de milho também revelaram a mesma ordem de prevalente de frequência, com variações de contaminação aflatoxina B1 entre 8 a 59 µg/Kg e aflatoxina B2 em 2,4 µg/Kg. Essa mesma ordem de prevalência foram evidenciadas nos grãos de milho pesquisados por Bento et al (2012), onde as concentrações de aflatoxina B1 foram entre 1 a 84,1 µg/Kg e aflatoxina B2 entre 1 a 4,6 µg/Kg.

As aflatoxinas G2 e G1 ocorreram em 6 (27,3 %) e 2 (9,1 %) das amostras positivas em concentrações que variaram de 1,0 a 2,3 µg/Kg e 2,4 a 5,0 µg/Kg, respectivamente. Nenhuma outra pesquisa revela uma frequência maior de detecção pela forma G2 seguida pela aflatoxina G1, como foi encontrada no presente trabalho. Bento et al (2012) revelaram as variações de contaminação nos grãos de milho por aflatoxina G1 em níveis entre 4,8 a 22,6 µg/Kg e aflatoxina G2 em níveis entre 1 a 1,8 µg/Kg, mas não informam qual dessas duas aflatoxinas foi detectada com maior frequência.

Tabela 9: Níveis de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e aflatoxinas totais nas amostras positivas

| Produto | Aflatoxina B1 | | Aflatoxina B2 | | Aflatoxina G1 | | Aflatoxina G2 | | AFLAs Totais | |
|----------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Faixa de variação (µg/Kg) | Média (µg/Kg) | Faixa de variação (µg/Kg) | Média (µg/Kg) | Faixa de variação (µg/Kg) | Média (µg/Kg) | Faixa de variação (µg/Kg) | Média (µg/Kg) | Faixa de variação (µg/Kg) | Média (µg/Kg) |
| Canjiquinha | 0,3 – 2,6 | 1,65 | 1,3 – 1,6 | 1,38 | Nd ¹ | Nd ¹ | 1,5 – 1,8 | 1,65 | 0,3 - 3,9 | 2,55 |
| Canjica branca | 1,9 – 7,1 | 3,25 | 0,3 – 1,8 | 1,17 | 2,4 – 5,0 | 3,74 | 1,0 – 2,3 | 1,52 | 1,6 - 8,9 | 4,17 |
| Total | 0,3 – 7,1 | 2,61 | 0,3 – 1,8 | 1,29 | Nd ¹ – 5,0 | 3,74 | 1,0 – 2,3 | 1,57 | 0,3 – 8,9 | 3,44 |

¹Nd – não detectado.

Tabela 10: Concentração de aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e aflatoxinas totais detectadas em cada amostra positiva

| Produto | N | Aflatoxinas ($\mu\text{g/Kg}$) | | | | Aflatoxinas | |
|----------------|----|----------------------------------|------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-------|
| | | B1 | B2 | G1 | G2 | Totais ($\mu\text{g/Kg}$) | |
| Canjiquinha | 1 | 2,6 | 1,3 | | | 3,9 | |
| | 2 | 2,5 | 1,4 | | | 3,9 | |
| | 3 | 2,6 | 1,3 | | Nd ¹ | 3,9 | |
| | 4 | 2,6 | 1,3 | | | 3,9 | |
| | 5 | 0,806 | | | | 0,806 | |
| | 6 | 0,31 | | Nd ¹ | | 0,31 | |
| | 7 | 1,14 | | | | 1,14 | |
| | 8 | | 1,6 | | 1,8 | 3,4 | |
| | 9 | Nd ¹ | 1,4 | Nd ¹ | 1,5 | 2,9 | |
| | 10 | | | 1,4 | | Nd ¹ | 1,4 |
| Canjica branca | 1 | 2,6 | 1,4 | 2,4 | Nd ¹ | 6,4 | |
| | 2 | 3,0 | 1,4 | | | 4,4 | |
| | 3 | 7,1 | 1,8 | | Nd ¹ | 8,9 | |
| | 4 | 1,93 | 0,32 | Nd ¹ | 1,03 | 3,28 | |
| | 5 | 3,0 | | | | 3,0 | |
| | 6 | 2,9 | | | | 2,9 | |
| | 7 | 2,8 | | Nd ¹ | | 2,8 | |
| | 8 | 2,7 | | | | 2,7 | |
| | 9 | 3,3 | | | | 3,3 | |
| | 10 | | | 1,5 | | 1,7 | 3,2 |
| | 11 | Nd ¹ | 0,64 | | Nd ¹ | 1,04 | 1,68 |
| | 12 | | | Nd ¹ | 5,09 | 2,349 | 7,439 |

¹Nd – não detectado.

A concentração média da contaminação de aflatoxinas totais nas 46 amostras analisadas foi 1,64 $\mu\text{g/Kg}$. Esse foi um valor relativamente maior comparativamente com o estudo de Amaral et al (2006) que revelaram a concentração média de contaminação por aflatoxinas totais nas suas amostras analisadas no valor de 0,62 $\mu\text{g/Kg}$. Contudo, Kawashima e Valente Soares (2006) encontraram valores mais próximos como 1,4 $\mu\text{g/Kg}$ e também Oliveira et al (2010) ao revelar o valor de 1,27 pbb.

A média de contaminação por aflatoxinas totais considerando apenas as amostras positivas foi encontrada no presente trabalho foi no valor de 3,44 $\mu\text{g/Kg}$. Talvez por conta do número consideravelmente menor de amostras contaminadas, outros pesquisadores consequentemente encontraram valores médios de contaminação por aflatoxinas totais em números superiores como 6,4 $\mu\text{g/Kg}$ (AMARAL et al, 2006), 16 $\mu\text{g/Kg}$ (KAWASHIMA; VALENTE SOARES, 2006) e 1,8 ppb (OLIVEIRA et al., 2010).

A concentração média de contaminação pela aflatoxina B1 total nas 46 amostras analisadas foi 0,91 $\mu\text{g/Kg}$. Valores semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores como 0,85 $\mu\text{g/Kg}$ (KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006) e 0,82 $\mu\text{g/Kg}$ (OLIVEIRA et al, 2010), ao passo que valores relativamente menores como 0,45 $\mu\text{g/Kg}$ (SEKIYAMA et al, 2005) e 0,57 $\mu\text{g/Kg}$ (AMARAL et al, 2006) também foram encontrados. Considerando apenas as amostras positivas, a concentração encontrada pela presença da aflatoxina B1 no

presente trabalho foi 2,62 µg/Kg. Analisando dessa maneira, os valores encontrados para concentração de aflatoxina B1 somente nas amostras positivas por outros pesquisadores foram consideravelmente maiores como 3,85 µg/Kg (OLIVEIRA et al, 2010), 16 µg/Kg (KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006) e 18,26 µg/Kg (SEKIYAMA et al, 2005).

Dentre as amostras positivas, as concentrações mais altas detectadas para cada aflatoxina, bem como na contagem de aflatoxinas totais, foram encontradas na canjica branca. De forma diferente, Amaral et al (2006) apontam a canjiquinha como alimento com as contagens mais altas para aflatoxinas totais sobre a canjica branca. Kawashima e Valente Soares (2006) revelam resultados semelhantes de superioridade pela canjiquinha sobre a canjica branca na contaminação por aflatoxinas totais, também na contaminação por aflatoxina B1 seguida pela aflatoxina B2. Na pesquisa de outros diversos produtos derivados do milho, Sekiyama et al (2005) revelaram apenas os produtos milho de pipoca e grãos de milho como os que tinham contaminação por aflatoxinas, dessa maneira a maior contaminação por aflatoxinas totais encontrada foi no milho de pipoca e em ambos os produtos a aflatoxina B1 foi encontrada com maiores concentrações seguida pela aflatoxina B2. Bento et al (2012) analisou e comparou o nível de contaminação por aflatoxinas em grãos de milho de duas diferentes safras, na primeira safra eles também revelaram maior concentração de aflatoxina B1 seguida pela B2, contudo as amostras de grãos de milho provenientes da segunda safra revelaram maior concentração da aflatoxina B1 seguida pela aflatoxina G1.

O maior valor detectado para aflatoxina B1 foi à concentração de 7,1 µg/Kg, para aflatoxina B2 foi 1,8 µg/Kg, para aflatoxina G1 e G2 os valores foram 5,09 e 2,349 µg/Kg, respectivamente, e aflatoxinas totais foi 8,9 µg/Kg.

Na canjiquinha não foi detectada a presença da aflatoxina G1 em nenhuma das amostras analisadas e a contaminação máxima detectada para aflatoxinas totais foi de 3,9 µg/Kg. Comparando com a literatura consultada não detectaram aflatoxinas G1 e G2 ao passo que em outras pesquisas que analisam canjiquinha e canjica de milho, os autores não informam esses dados ao priorizar as informações quanto as aflatoxinas B1 e B2 enfocando também os resultados nas aflatoxinas totais (SEKIYAMA et al, 2005; KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006; AMARAL et al, 2006; OLIVEIRA et al, 2010; FERREIRA et al, 2013). Da mesma forma, os resultados da pesquisa de Sekiyama et al (2005) em vários produtos derivados do milho não informam quanto a contaminação por aflatoxinas G1 e G2. Enquanto que os grãos de milho analisados por Mattos et al (2009) não foi detectada nenhuma presença das aflatoxinas, nos grãos de milho armazenados analisados por Bento et al (2012) é revelado que amostras de uma das safras continham presença das aflatoxinas G1 e G2.

Das 22 amostras positivas para aflatoxinas, nenhuma ultrapassou os limites máximos de contaminação por aflatoxinas totais de acordo com os critérios adotados pela legislação nacional vigente que estabelece o valor de até 20 µg/Kg (BRASIL, 2011). Comparando esses mesmos resultados tomando como critério àquele estabelecido pela legislação da Comissão Europeia (2006), onde o limite máximo permitido de contaminação por aflatoxinas totais em produtos derivados do milho é de 5 µg/Kg, três amostras de canjica branca estariam acima do limite permitido, enquanto muitas outras amostras estariam próximas a este limite.

Embora alguns pesquisadores tenham utilizado metodologia de extração de aflatoxinas semelhante ao presente trabalho e terem quantificado as mesmas por outra técnica como a cromatografia de camada delgada (CCD), eles revelaram reduzida quantidade de amostras positivas, porém detectaram amostras contaminadas em concentrações acima da permitida por lei (BRASIL, 2011). Também, nos outros trabalhos nota-se menor quantidade de amostras de canjiquinha e canjica de milho, pois os autores analisaram diversos tipos de produtos derivados do milho.

Das 123 amostras analisadas por Amaral et al (2006), 7 encontravam-se com contaminação para aflatoxinas totais, onde 5 eram do produto fubá, 1 de canjica de milho, e finalmente 1 canjiquinha na concentração de 43 µg/Kg para aflatoxinas totais, sendo então identificada como a única amostra encontrada com concentrações de contaminação acima do limite da legislação. De forma semelhante Kawashima e Valente Soares (2006) analisaram 74 amostras revelando que 5 continham contaminação por aflatoxinas totais sendo os produtos, 1 quirera fina, 1 canjica, 2 quireras e 1 farinha de milho, e dessas amostras contaminadas 1 quirera (23,3 µg/Kg) e 1 farinha de milho (21,5 µg/Kg) extrapolaram as concentrações máximas de contaminação permitidas por lei. Sekiyama et al (2005) pesquisaram diferentes produtos derivados do milho sem incluir canjiquinha nem canjica branca e das suas 121 amostras analisadas, apenas 3 estavam contaminadas, sendo elas 1 amostra de grãos de milho (23,7 µg/Kg) e 2 amostras de milho de pipoca com uma delas na concentração de 59 µg/Kg, portanto esses autores detectaram duas amostras com contaminação por aflatoxinas totais acima do permitido por lei. Por outro lado, Mattos et al (2009) analisaram 40 amostras de grãos de milho destinados a uma indústria alimentícia e não detectaram nenhuma contaminação por aflatoxinas totais.

São diversos os trabalhos de pesquisa de micotoxinas em produtos derivados do milho que revelaram e apontaram que os níveis de contaminação por aflatoxinas totais detectados nesses mesmos produtos derivados são encontrados comumente com baixa frequência de contaminação e também em baixos níveis de contaminação quando comparados ao que pode ser detectado no milho em grão citados de outras pesquisas (SEKIYAMA et al, 2005; AMARAL et al, 2006; KAWASHIMA & VALENTE SOARES, 2006; MATTOS et al, 2009; BENTO et al, 2012, FERREIRA et al, 2013).

Moraes (2009) descreve que no processo de moagem do milho podem ser separados mecanicamente o endosperma, pericarpo e o gémem do milho, sendo a partir desse processamento que se obtém um produto derivado como a canjiquinha, farinha e fubá de milho. Sendo o pericarpo a camada mais externa do grão, Ferreira et al (2013) discutem que o essa estrutura poderia funcionar como uma barreira no sentido de dificultar o acesso do fungo ao endosperma que então poderia resultar na diminuição dos teores de micotoxinas em produtos processados como a canjiquinha, fubá e farinha de milho analisados na pesquisa deles, em relação a grãos inteiros. Seguindo esse raciocínio, Scudamore e Patel (2000) observaram que ao realizarem uma limpeza nos grãos de milho após o processo de moagem houve uma redução de 40% na concentração de aflatoxinas em relação às concentrações iniciais detectadas nessas mesmas amostras. Dessa forma se poderiam explicar parcialmente os resultados revelados nessa e em outras pesquisas de análise e detecção de aflatoxinas com baixas concentrações em produtos derivados do milho comparados a resultados analisados nos grãos de milho. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer essa grande diferença das concentrações de aflatoxinas detectadas entre os produtos derivados do milho processados e os grãos não processados, visto que os resultados das pesquisas relacionadas podem ser considerados ainda variáveis, além do mais são diversas as condições e fatores para que haja crescimento de fungo e síntese de micotoxina pelo mesmo para que contamine o grão de milho ou o produto derivado (FREIRE et al, 2007). Vale citar que, por exemplo, Mattos et al (2009) analisaram 40 amostras de grãos de milho destinados a uma indústria alimentícia e não detectaram nenhuma amostra positiva para aflatoxinas totais por CCD.

Os baixos níveis de contaminação por aflatoxinas totais encontrados no presente trabalho corroboram com os resultados revelados e discutidos em outras pesquisas, onde o maior nível de contaminação por aflatoxinas totais encontrado dentre as amostras positivas foi no valor de 8,9 µg/Kg, valor esse ainda menor que o encontrado por outros pesquisadores em produtos derivados do milho e consideravelmente menor do que o encontrado em pesquisas com grãos de milho, por exemplo, dos pesquisadores Sekiyama et al (2005) e Bento et al

(2012) que revelaram amostras positivas para aflatoxinas totais em níveis de 23,7µg/Kg e 108,7µg/Kg, respectivamente.

4.4.1 Consumo do Milho

No ano de 2011, o IBGE fez uma análise do consumo alimentar pessoal no Brasil através da última e mais recente publicação da *Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF – 2008-2009)*. Na pesquisa em questão foram levantados 105 alimentos ou grupos de alimentos mais consumidos por pessoa. De acordo com a classificação dos alimentos, no grupo milho e preparações, está contido a canjiquinha de milho, enquanto a canjica branca está contida no grupo doce à base de leite. Na Tabela 11 está representado o consumo médio *per capita* dos alimentos mais consumidos comparados aos alimentos no presente estudo.

Tabela 11 – Consumo alimentar médio *per capita* dos diferentes alimentos mais consumidos no Brasil (IBGE, 2011).

| Posição | Alimento ou Grupo de Alimento | Consumo diário <i>per capita</i> (g/dia) |
|---------|---|--|
| 1 | Café | 215,1 |
| 2 | Feijão | 182,9 |
| 3 | Arroz | 160,3 |
| 4 | Suco/refresco/suco em pó reconstituído | 145,0 |
| 5 | Refrigerante | 94,7 |
| 6 | Carne bovina | 63,2 |
| 7 | Pão de sal | 53,0 |
| 8 | Sopas e caldos | 50,3 |
| 9 | Aves | 36,5 |
| 10 | Macarrão e preparações a base de macarrão | 36,3 |
| 11 | Leite integral | 34,7 |
| 12 | Chá | 31,3 |
| 13 | Cerveja | 31,1 |
| 14 | Peixe fresco e preparações | 23,4 |
| 15 | Laranja | 20,6 |
| 16 | Milho e preparações | 20,4 |
| 42 | Doces à base de leite | 5,5 |

Baseado nessas informações mais recentes pode-se representar melhor a realidade nacional no que tange a exposição do consumidor à aflatoxina B1 nos produtos derivados do milho. Primeiramente foi realizado o cálculo da concentração média de aflatoxina B₁ detectada de cada grupo de produto no presente estudo (canjiquinha e canjica branca). Em seguida foi possível obter a estimativa da exposição pela aflatoxina B1 adotando 70 Kg como sendo o peso médio da população adulta e para consumo alimentar médio *per capita* (IBGE,

2011). E finalmente foi realizada a caracterização do risco pelo cálculo da MOE. Os resultados estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12 – Consumo alimentar médio *per capita* nacional, concentração média de aflatoxina B₁ detectada na canjiquinha do presente estudo, estimativa da exposição e caracterização do risco.

| Alimento em estudo | Classificação POF – IBGE (2011) | Consumo alimentar médio <i>per capita</i> (g/dia) | Concentração média de AFB ₁ detectada (µg/Kg) | Estimativa da Exposição (µg/Kg) | Caracterização do Risco (MOE) |
|--------------------|---------------------------------|---|--|---------------------------------|-------------------------------|
| Canjiquinha | Milho e preparações | 20,4 | 0,66 | 0,19 x 10 ⁻³ | ~ 900 |
| Canjica branca | Doces à base de leite | 5,5 | 1,09 | 0,85 x 10 ⁻⁴ | ~ 2000 |

A MOE indica o nível de prioridade para ações de gerenciamento do risco e quanto maior a MOE calculada, menor a preocupação e, geralmente, valores abaixo de 10000 tem sido proposto como indicação de risco preocupante sob a ótica de saúde pública (EFSA, 2005). Dessa forma, os resultados da caracterização do risco, baseando-se na média nacional de consumo *per capita*, indicam que ambos os alimentos estudados representam riscos à saúde da população pela exposição crônica da aflatoxina B₁ pela dieta de alimentos derivados do milho, podendo aumentar a incidência do carcinoma hepatocelular, então necessitam de atenção mesmo que nenhuma das amostras tenha ficado acima dos limites permitidos pela legislação nacional (BRASIL, 2011). A canjica branca, apesar de ter apresentado maior índice de contaminação médio de concentração de aflatoxina B₁ e aflatoxinas totais, comparado à canjiquinha no mesmo estudo, constituiu menor risco a saúde, porém ainda preocupante.

Ainda utilizando a pesquisa feita pelo IBGE (2011) foi possível melhorar a interpretação sobre exposição de aflatoxina B₁ pelo consumo *per capita* de produtos derivados do milho em diferentes tipos de grupos de consumidores que estão representados nas Tabelas 13, 14 e 15, analisando quais tipos de consumidores estão mais expostos aos riscos.

Tabela 13 – Consumo alimentar médio *per capita* por zona.

| Alimento em estudo | Classificação POF – IBGE (2011) | Consumo alimentar médio <i>per capita</i> (g/dia) | |
|--------------------|---------------------------------|---|-------|
| | | Urbano | Rural |
| Canjiquinha | Milho e preparações | 15,8 | 43,6 |
| Canjica branca | Doces à base de leite | 5,4 | 6,0 |

Tabela 14 – Consumo alimentar médio *per capita* por grandes regiões.

| Alimento em estudo | Classificação POF – IBGE (2011) | Consumo alimentar médio <i>per capita</i> (g/dia) | | | | |
|--------------------|---------------------------------|---|----------|---------|------|--------------|
| | | Norte | Nordeste | Sudeste | Sul | Centro-oeste |
| Canjiquinha | Milho e preparações | 8,1 | 50,9 | 7,4 | 12,8 | 9,2 |
| Canjica branca | Doces à base de leite | 3,2 | 5,4 | 5,6 | 5,8 | 6,4 |

Tabela 15 – Consumo alimentar médio *per capita* por classes de rendimento total e variação patrimonial familiar *per capita*.

| Alimento em estudo | Classificação POF – IBGE (2011) | Consumo alimentar médio <i>per capita</i> (g/dia) | | | |
|--------------------|---------------------------------|---|-----------------------|-------------------------|-------------------|
| | | Até 296 R\$ | Mais de 296 a 571 R\$ | Mais de 571 a 1.089 R\$ | Mais de 1.089 R\$ |
| Canjiquinha | Milho e preparações | 36,0 | 21,2 | 10,4 | 8,8 |
| Canjica branca | Doces à base de leite | 4,8 | 4,7 | 5,3 | 7,6 |

* Foi considerado R\$ 415,00 como salário mínimo vigente em 15 de janeiro de 2009, data de referência dessa pesquisa (IBGE, 2011).

De acordo com os dados de pesquisa do IBGE (2011), observa-se que o consumo alimentar médio *per capita* do grupo de alimentos milho e preparações, onde a canjiquinha está contida, é consideravelmente maior na região nordeste, seguido por consumidores da zona rural e pessoas com menor renda, inclusive, estão acima da média nacional. Dessa forma é possível identificar melhor quais são os consumidores brasileiros que estão mais expostos aos riscos de contaminação alimentar por aflatoxina B1. Os resultados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados da estimativa da exposição e caracterização do risco de aflatoxina B1 nos diferentes grupos expostos, segundo consumo diário *per capita* de milho e preparações (IBGE, 2011) nos níveis médios de contaminação de aflatoxina B1 detectados nesse estudo.

| Exposição a AFB₁ | Consumo diário <i>per capita</i> (g/dia) | Estimativa da Exposição (µg/Kg) | Caracterização do Risco (MOE) |
|------------------------------------|---|--|--|
| Nordeste | 50,9 | 0,48 x 10 ⁻³ | ~ 355 |
| Rural | 46,6 | 0,44 x 10 ⁻³ | ~ 386 |
| Renda até 296 R\$ | 36,0 | 0,34 x 10 ⁻³ | ~ 500 |
| Renda entre 296 e 571 R\$ | 21,2 | 0,20 x 10 ⁻³ | ~ 850 |
| Média nacional | 20,4 | 0,19 x 10 ⁻³ | ~ 900 |
| Urbano | 15,8 | 0,15 x 10 ⁻³ | ~ 1133 |
| Sul | 12,8 | 0,12 x 10 ⁻³ | ~ 1417 |
| Renda entre 571 e 1.089 R\$ | 10,4 | 0,10 x 10 ⁻³ | ~ 1700 |
| Centro-oeste | 9,2 | 0,09 x 10 ⁻³ | ~ 1889 |
| Renda superior a 1.089 R\$ | 8,8 | 0,08 x 10 ⁻³ | ~ 2125 |
| Norte | 8,1 | 0,07 x 10 ⁻³ | ~ 2428 |
| Sudeste | 7,4 | 0,06 x 10 ⁻³ | ~ 2833 |

A Tabela 16 representa em ordem decrescente o consumo médio diário *per capita* de milho e preparações de diferentes grupos de consumidores, bem como a média nacional. De maneira óbvia, o valor do resultado do cálculo da MOE por aflatoxina B1 será inversamente proporcional para àquele grupo que consome em maior quantidade, porém significa maior preocupação com relação ao risco. Mais uma vez considerando que mesmo as 19 amostras de canjiquinha estejam com contaminação de aflatoxinas totais dentro dos limites estabelecidos pela legislação nacional vigente de 20 µg (ANVISA, 2011), a MOE nos indica que há riscos à saúde pela ingestão de aflatoxina B1.

Da mesma forma é fácil delimitar quem são os grupos de consumidores com a sua saúde mais exposta à contaminação por aflatoxina B1. São eles, os consumidores da região nordeste, do meio rural e àqueles que possuem a menor renda. A MOE calculada para aflatoxina B1 desses grupos está abaixo da MOE de aflatoxina B1 nacional. Isso demonstra também o fato de que um alimento de milho, como a canjiquinha, pode mais facilmente chegar à mesa do consumidor por se tratar de um produto acessível e barato deixando esses grupos de consumidores mais expostos aos riscos de contaminação pela aflatoxina B1.

Com relação as 27 amostras de canjica branca analisadas no presente trabalho, também foi calculado a estimativa de exposição e a caracterização de risco pela aflatoxina B1, a qual foi incluída como pertencente ao grupo de doces a base de leite, segundo IBGE (2011), visto na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados da estimativa da exposição e caracterização do risco de aflatoxina B1 nos diferentes grupos expostos pela aflatoxina B1, segundo consumo diário *per capita* dos alimentos a base de leite (IBGE, 2011).

| Grupo estudado | Consumo diário <i>per capita</i> (g/dia) | Estimativa da Exposição (µg/Kg) | Caracterização do Risco (MOE) |
|--------------------------------|---|--|--|
| Renda superior a 1.089 R\$ | 7,6 | $0,12 \times 10^{-3}$ | ~ 1417 |
| Centro-oeste | 6,4 | $0,10 \times 10^{-3}$ | ~ 1700 |
| Rural | 6,0 | $0,93 \times 10^{-4}$ | ~ 1828 |
| Sul | 5,8 | $0,90 \times 10^{-4}$ | ~ 1889 |
| Sudeste | 5,6 | $0,87 \times 10^{-4}$ | ~ 1954 |
| Média nacional | 5,5 | $0,85 \times 10^{-4}$ | ~ 2000 |
| Nordeste | 5,4 | $0,84 \times 10^{-4}$ | ~ 2024 |
| Urbano | 5,4 | $0,84 \times 10^{-4}$ | ~ 2024 |
| Renda entre 571 e 1.089 R\$ | 5,3 | $0,82 \times 10^{-4}$ | ~ 2073 |
| Renda até 296 R\$ | 4,8 | $0,75 \times 10^{-4}$ | ~ 2267 |
| Renda entre 296 e 571 R\$ | 4,7 | $0,73 \times 10^{-4}$ | ~ 2329 |
| Norte | 3,2 | $0,50 \times 10^{-4}$ | ~ 3400 |

Os resultados demonstram que todos os grupos de consumidores possuem níveis de preocupação de aflatoxina B1 com riscos a saúde, assim como a média nacional. Com relação à quantidade de consumo médio *per capita* de cada grupo nota-se diferenças do mesmo em comparação ao consumo de um alimento mais barato, como a canjiquinha. A canjica branca está no grupo de alimentos de doces à base de leite (IBGE, 2011) e analisando o conjunto são comparativamente produtos mais caros que a canjiquinha. O fato do grupo de consumidores com a maior renda serem os que mais consomem este tipo de produto pode corroborar com esta afirmativa. Os doces a base de leite podem trazer outro tipo de risco a saúde do consumidor que é a aflatoxina M1 que é o metabólito hidroxilado da aflatoxina B1. De qualquer maneira, mesmo que a canjica branca seja apenas um dos produtos classificados pelo IBGE (2011) no grupo de alimentos de doces a base de leite, certamente este produto contribui bastante para exposição de aflatoxinas totais e aflatoxina B1 à saúde do consumidor.

Embora as aflatoxinas em alimentos siga o princípio ALARA (As Low as Reasonably Achievable) de presentes em níveis tão baixos quanto razoavelmente possível (EFSA, 2012), pesquisadores ressaltam que mesmo detectando níveis de aflatoxinas totais abaixo da legislação a atenção aos possíveis riscos à saúde pode ser também verificada através da do cálculo da Ingestão Diária Provável Média (IDP_M) da aflatoxina B1. Alguns autores inclusive comparam a IDP_M a Ingestão Média Tolerável (IDT) de 0,15 ng/Kg p.c./dia proposta por Kuiper-Goodman (1995), onde encontraram valores de ingestão superiores aos “toleráveis”

(SECKIYAMA et al, 2005; KAWASHIMA & VALENTE-SOARES, 2006; AMARAL et al, 2006; FERREIRA et al, 2013).

Ainda, Amaral et al (2006) destacaram o fubá como principal produto do milho consumido pela população de baixa renda (IBGE, 2003). Nessa pesquisa, os autores encontraram o valor da IDP_M do fubá como sendo 0,21 ng/Kg p.c./dia para famílias de menor renda, mostrando que esse valor era quatro vezes superior a IDP_M comparadas àquelas de famílias de maior renda. Além disso, verificaram diferenças da IDP_M comparando-se diversas regiões do Brasil, sendo a região nordeste com o maior índice de IDP_M , no valor de 0,26 ng/Kg p.c./dia.

4.5 Influência da ozonização nos níveis de aflatoxinas

A análise por CLAE-DF das amostras de canjiquinha ozonizadas, através da combinação de diferentes valores das variáveis tempo de exposição, concentração de ozônio e massa de grãos, mostrou valores diferentes de reduções de aflatoxinas entre os 11 ensaios avaliados. As reduções mais significativas de aflatoxinas foram nos ensaios 4 e 8, onde foram utilizadas as concentrações mais elevadas de O_3 (60 mg/L) e maior tempo de exposição (8h). A maior redução de aflatoxinas totais foi obtida no ensaio 4, correspondendo a 55,4%. As maiores reduções obtidas para as quatro aflatoxinas estudadas foram 57,0%, 30,0%, 54,6% e 36,1% para B1, B2, G1 e G2, respectivamente, e também foram obtidas no ensaio 4. A aflatoxina B2 foi a menos influenciada pela ozonização em todos os ensaios. A Figura 9 mostra os resultados obtidos para cada aflatoxina em todos os ensaios, considerando a amostra de controle como referência.

Na Tabela 18 são mostrados os resultados dos níveis de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e aflatoxinas totais na amostra controle e nas amostras ozonizadas.

Tabela 18 – Níveis de aflatoxinas presentes na amostra de milho controle e nas amostras ozonizadas

| Ensaio | Valores de aflatoxinas (em µg/Kg) | | | | |
|-----------|-----------------------------------|------|------|------|---------------------|
| | B1 | B2 | G1 | G2 | Totais ¹ |
| C | 52,8 | 53,7 | 52,1 | 46,8 | 205,4 |
| 1 | 31,9 | 47,5 | 31,3 | 39,9 | 150,6 |
| 2 | 32,8 | 44,3 | 32,6 | 34,7 | 144,3 |
| 3 | 36,4 | 44,2 | 35,0 | 35,0 | 150,6 |
| 4 | 22,7 | 37,6 | 23,7 | 29,9 | 113,8 |
| 5 | 38,7 | 53,2 | 37,3 | 44,9 | 174,1 |
| 6 | 35,8 | 51,3 | 36,1 | 39,3 | 162,5 |
| 7 | 29,9 | 46,9 | 28,7 | 36,9 | 142,3 |
| 8 | 25,8 | 37,0 | 27,7 | 31,0 | 121,6 |
| 9 | 30,4 | 44,2 | 29,5 | 35,5 | 139,6 |
| 10 | 32,1 | 46,4 | 32,6 | 34,3 | 145,4 |
| 11 | 29,2 | 46,7 | 30,4 | 33,4 | 139,7 |

¹ Somatório das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

As concentrações de todas as aflatoxinas avaliadas foram menores no ensaio 4, evidenciando uma maior degradação dessas devido às condições mais drásticas do ensaio (O₃ na concentração de 60 mg/L, exposição por tempo de 8h e massa de grãos correspondente a 1 Kg). Considerando a amostra controle como referência (0% de degradação), foram calculados os níveis de redução de cada micotoxina e também das aflatoxinas totais, as quais estão apresentadas na Figura 9. Como pode ser observado na Figura 9, além do ensaio 4, foram obtidas as maiores reduções nos níveis de aflatoxinas totais na amostra do ensaio 8, atingindo até pouco mais de 40% de degradação para aflatoxinas totais, sendo principalmente degradada a aflatoxina B1 com pouco mais de 50% em nível de degradação. Dessa forma, pode-se observar que as maiores reduções nos níveis das aflatoxinas foram obtidas nos ensaios que possuíram a maior concentração de ozônio (60mg/L) e o maior tempo de exposição (8 h), independente da massa de grãos utilizada (1 Kg no ensaio 4 e 5 Kg no ensaio 8).

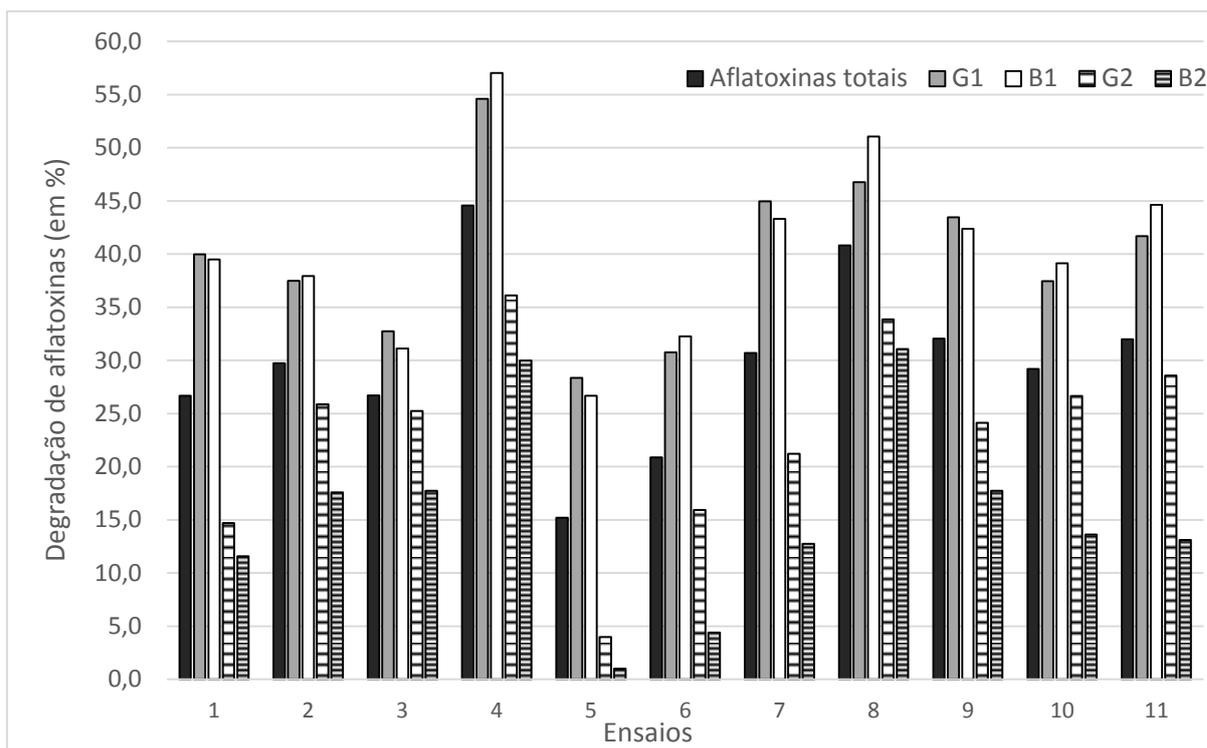


Figura 9 – Redução de aflatoxinas, expressos em %, após ozonização. A amostra controle foi utilizada como referência (0% de degradação)

Luo et al (2014) analisaram a degradação de aflatoxinas por ozônio em amostras de milho com dois diferentes teores de umidade. Seus melhores resultados de degradação foram obtidos quando submeteram suas amostras de milho com umidade a 13,47% à exposição do ozônio em concentrações de 40, 65, e 90 mg/L durante 40 min, obtendo taxas de degradação de aflatoxina B1 em 41,1, 56,2, e 88,1%, respectivamente. Esses mesmos autores trataram farinha de milho com ozônio e após 60 minutos de tratamento na concentração de 75 mg/L, as taxas de degradação das aflatoxinas B1, G1, e B2 atingiram 78,76%, 72,09% e 70,73%, enquanto as taxas de degradação de aflatoxinas totais atingiu 77,29% (LUO et al, 2013). Chen et al (2014) otimizaram condições para desintoxicar aflatoxinas em amendoim por ozonização e verificaram melhores taxas de degradação das mesmas com exposição de ozônio a uma concentração de 6,0 mg/L durante 30 min, onde as taxas de degradação na contagem de aflatoxinas totais e aflatoxina B1 foram 65,8% e 65,9%, respectivamente. Trombete et al (2016) ozonizaram amostras de grãos de trigo e revelaram seus melhores resultados ao realizarem o tratamento em concentrações do ozônio em 60 mg/L por um período de 5 h, obtendo as maiores reduções para as quatro aflatoxinas em 54,4%, 63,2%, 40,3% e 34,0% para G1, B1, B2 e G2, respectivamente.

Em todos os 11 ensaios avaliados, os níveis de degradação foram maiores e semelhantes nas aflatoxinas G1 e B1, sendo a forma G2 mais resistente que essas e a B2 mais resistente à ozonização dentre todas estudadas. Essa diferença de degradação entre as aflatoxinas revela uma característica de maior estabilidade pelas formas B2 e G2 frente ao poder oxidativo do ozônio. McKenzie et al. (1997) já haviam observado maior resistência de aflatoxina B2 e G2 em relação a B1 e G1 pela presença de ligações duplas na posição C8-C9 que as formas B1 e G1 possuem em sua estrutura, onde há a ação oxidante do ozônio indicando maior sensibilidade das mesmas. Essa maior estabilidade das formas B2 e G2 comparadas as formas B1 e G1 frente à ação oxidativa do ozônio também foi relatada em

outras pesquisas (TROMBETE et al, 2016; CHEN et al, 2014; LUO et al, 2014; TIWARI et al, 2010).

Nesse trabalho, através do planejamento fatorial completo 2^3 , foi possível estudar os efeitos de cada variável independente utilizada no estudo, bem como suas interações. Através da análise de variância, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 5% ($p < 0,05$). Conforme apresentado no gráfico de Pareto (Figura 10), as variáveis X_1 (concentração de ozônio), X_2 (tempo), X_3 (massa de grãos) e as interações $X_1.X_3$ foram significativas na redução dos níveis de aflatoxinas totais, dentro das condições estudadas. A interação $X_1.X_2$ apresentou p-valor correspondente a 0,051 e foi considerada um termo marginalmente significativo, não sendo eliminada na construção do modelo matemático. A Figura 10 representa, através do diagrama de Pareto, os termos considerados significativos ($p < 0,05$) e não significativos ($p > 0,05$) pela ANAVA.

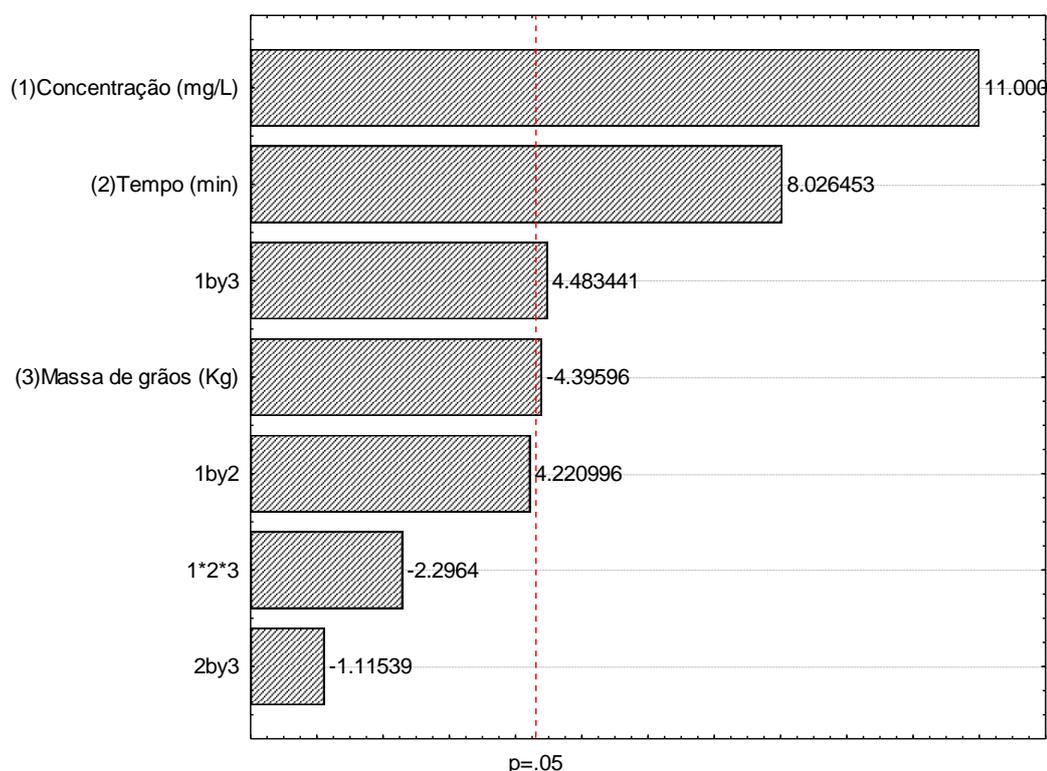


Figura 10 – Gráfico de Pareto para a variável degradação de aflatoxinas totais.

A partir do Diagrama de Pareto, percebe-se que o termo que mais influenciou a degradação das aflatoxinas foi a concentração do ozônio, seguido do tempo de exposição do milho ao processo. Outros pesquisadores também revelaram em seus resultados que os efeitos desintoxicantes em alimentos pela ação do ozônio sobre as aflatoxinas também tornava-se mais evidente conforme o aumento da concentração de ozônio e o tempo de exposição utilizados no tratamento (TROMBETE et al, 2016; LUO et al, 2014; CHEN et al 2014; LUO et al 2013; MENDEZ et al, 2003). As duas fases sobre a interação do ozônio em grãos de milho já tinham sido descritas anteriormente (MENDEZ et al, 2003; KELLS et al, 2001; STRAIT, et al 1998) pode explicar que em altas concentrações de ozônio mais rapidamente os sítios de degradação são eliminados e o ozônio possa interagir com toda a massa de grãos.

Para a elaboração do modelo matemático que representa a degradação de aflatoxinas totais pela ozonização, foi utilizado o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos, com exceção da interação $X_1.X_2$ que foi considerada marginalmente significativa. O modelo possuiu um percentual de variação ajustado R^2 91.47%. A equação x é

o modelo codificado obtido que descreve as superfícies de resposta da degradação de aflatoxinas através da ozonização, expresso em % de degradação, onde: X_1 = Concentração do ozônio (mg/L), X_2 = Tempo de exposição dos grãos (em min), e X_3 = Massa de grãos utilizado no processo (Kg).

Neste caso a equação de degradação fica transcrita da seguinte maneira:

$$\% \text{ Degradação de AF} = 29.8 + 6.3 X_1 + 4.6 X_2 - 2.5 X_3 + 2.4 X_1.X_2 + 2.5 X_1.X_3$$

Na Figura 11 são apresentadas as superfícies de resposta e o gráfico de médias que representam a degradação de aflatoxinas, através da ozonização, nas condições experimentais estudadas nesse trabalho.

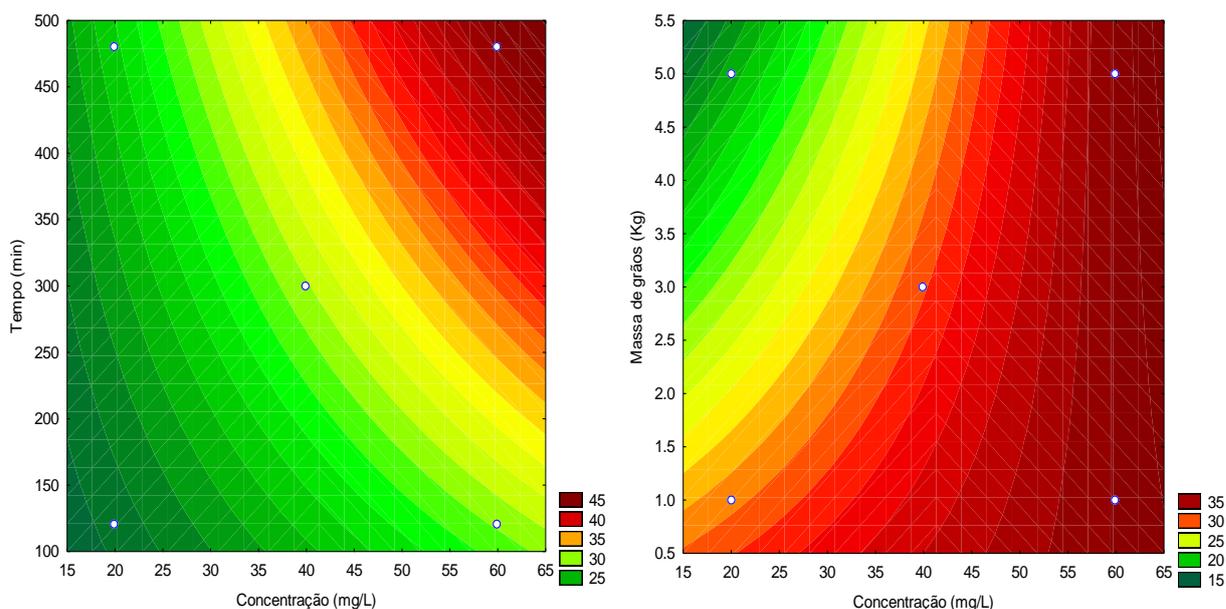


Figura 11 – Superfícies de resposta para a degradação de aflatoxinas, através da ozonização. Influência das variáveis independentes tempo e concentração (à esquerda, Figura 11A) e massa e concentração (à direita, Figura 11B).

Conforme apresentado na Figura 11A, aumentando a concentração de ozônio até um nível próximo de 60 mg/L e aumentando o tempo de exposição do milho ao processo próximo de 480 min, é possível obter a região máxima de degradação de aflatoxinas nas condições estudadas. O ensaio 4 com concentração de 60 μ g/L ozônio e 480 minutos de tempo de exposição representa tais condições, através do qual foi atingido os níveis máximos de degradação de aflatoxinas (54% para G1, 57% para B1, 36% para G2 e 30% para B2).

Já a Figura 11B demonstra que, a massa de grãos somente influencia quando são utilizadas concentrações baixas de ozônio, corroborando com o que foi descrito sobre as fases de interação do ozônio com a massa na pesquisa de Mendez et al (2003). Da mesma forma, Trombete et al (2016) relataram que a massa de grãos influenciaram negativamente na redução de aflatoxinas tratados com ozônio. E Steponavicius et al (2012) ao investigar sobre a penetração do ozônio entre os grãos relataram que a concentração de ozônio diminui conforme o tratamento em amostras com massa maior.

Então, no presente trabalho, quando utilizadas altas concentrações de ozônio (acima de 50 mg/L), a massa de grãos pouco influencia. Assim, usando uma concentração alta de ozônio a massa de grãos é rapidamente saturada, independente se for utilizada 1 Kg ou se foi

utilizado 5 Kg para as condições experimentais aqui apresentadas, pois o nível de saturação ozônio não foi avaliado experimentalmente.

Analisando as duas Figuras 11, pode-se observar que nas condições experimentais estudadas, a melhor condição para a degradação de aflatoxinas totais em canjiquinha de milho pode ser obtida usando a concentração de ozônio de 60 mg/L, durante 8 h, independente da massa de milho utilizada (1 a 5 Kg).

4.6 Efeitos da ozonização na redução de fungos filamentosos totais

Após a ozonização das amostras, foram realizadas as contagens de fungos filamentosos totais, nas amostras de canjiquinha de milho adicionadas de conídios, a fim de avaliar o efeito do processo na redução fúngica. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 19 e ilustrados na Figura 12.

Tabela 19 – Contagem de fungos filamentosos totais em amostras ozonizadas e amostras controle

| Ensaio | Amostras adicionadas com conídios de <i>Fusarium</i> spp | | Amostras adicionadas com conídios de <i>Aspergillus</i> spp | |
|----------------------|--|--|---|--|
| | Contagem UFC/g | Resultados log ₁₀ N ₀ /N | Contagem UFC/g | Resultados log ₁₀ N ₀ /N |
| 1 | 5,0x10 ⁴ | 1,10 | 5,4x10 ⁴ | 1,08 |
| 2 | 5,5x10 ³ | 1,34 | 6,5x10 ³ | 1,33 |
| 3 | 1,2x10 ³ | 1,64 | 1,5x10 ³ | 1,62 |
| 4 | 6,5x10 ¹ | 2,77 | 3,1x10 ² | 2,04 |
| 5 | 4,6x10 ⁴ | 1,08 | 3,0x10 ⁴ | 1,14 |
| 6 | 3,5x10 ⁴ | 1,11 | 1,6x10 ⁴ | 1,21 |
| 7 | 4,2x10 ³ | 1,39 | 3,4x10 ⁴ | 1,12 |
| 8 | 5,9x10 ³ | 1,33 | 2,6x10 ³ | 1,49 |
| 9 | 3,9x10 ⁴ | 1,11 | 1,5x10 ⁴ | 1,22 |
| 10 | 4,3x10 ⁴ | 1,09 | 1,5x10 ⁴ | 1,21 |
| 11 | 6,3x10 ⁴ | 1,05 | 6,2x10 ⁴ | 1,08 |
| C¹ | 1,1x10 ⁵ | 1,00 | 1,2x10 ⁵ | 1,00 |

¹Amostra controle, não ozonizada. Limite de quantificação do método: 1x10¹ UFC/g

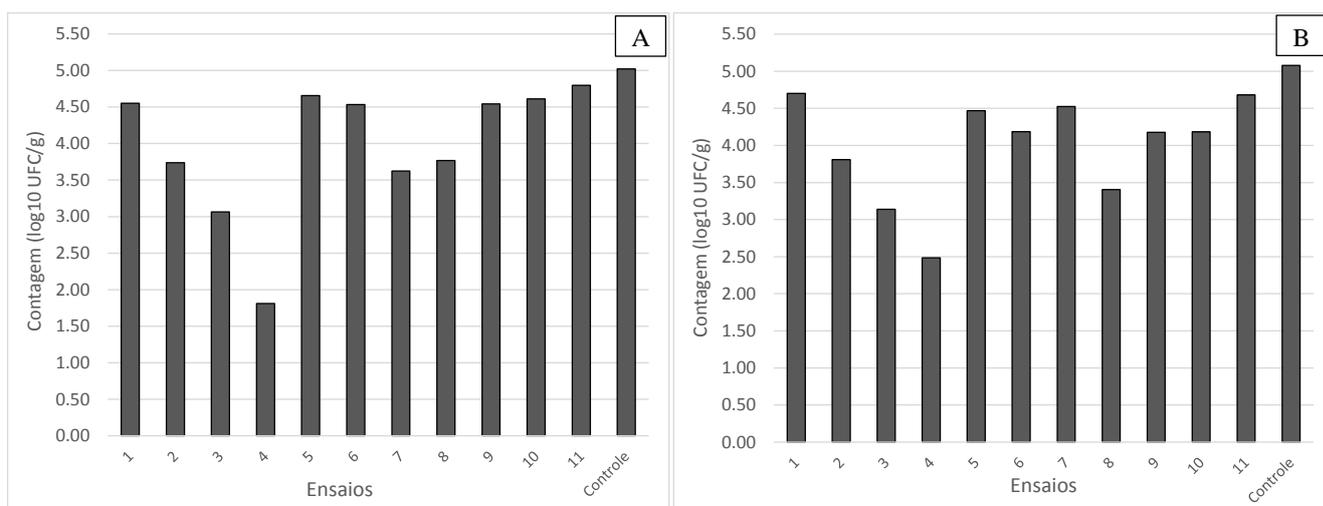


Figura 12 – Contagem de fungos filamentosos totais (log₁₀ UFC/g), em amostras de canjiquinha de milho ozonizadas e amostras controle. A – Amostras adicionadas de conídios de *Fusarium* spp. B – Amostras adicionadas de conídios de *Aspergillus* spp.

Percebe-se através da Figura 12 que nas amostras onde foram adicionados conídios de *Fusarium* spp (amostras A) e *Aspergillus* spp e então ozonizadas (amostras B), as menores contagens de fungos totais foram obtidas nos ensaios 4 e 3. Nesses ensaios foram utilizadas concentrações altas de ozônio (60 mg/L), onde foi observado que as maiores reduções fúngicas foram obtidas quando utilizadas altas concentrações de O₃. Como descrito em outras pesquisas de aplicação de ozônio em diversas condições de concentração, obtendo melhores resultados sobre a degradação de fungos conforme maior concentração do ozônio. O ozônio foi efetivo no controle de *Fusarium verticillioides* em milho armazenado (MILONA K. et al, 2014), *Fusarium graminearum* e *Penicillium citrininum* (SAVI & SCUSSEL, 2014), *Fusarium* spp e *Aspergillus* spp em grãos de trigo (TROMBETE et al, 2016), *Aspergillus flavus* também em grãos de trigo (EL-DESOUKY et al, 2012), *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp em grãos de arroz (SANTOS et al, 2016).

Para a avaliação dos efeitos das variáveis independentes estudadas na redução da contagem de fungos filamentosos totais nas amostras de canjiquinha de milho, foram considerados os resultados em UFC/g expressos como log₁₀ N₀/N. A partir da ANAVA foi possível conhecer quais foram os termos que influenciaram significativamente (p< 0,05) a redução dos fungos das amostras contaminadas com *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp, conforme apresentado nos gráficos de Pareto (Figuras 13 e 14).

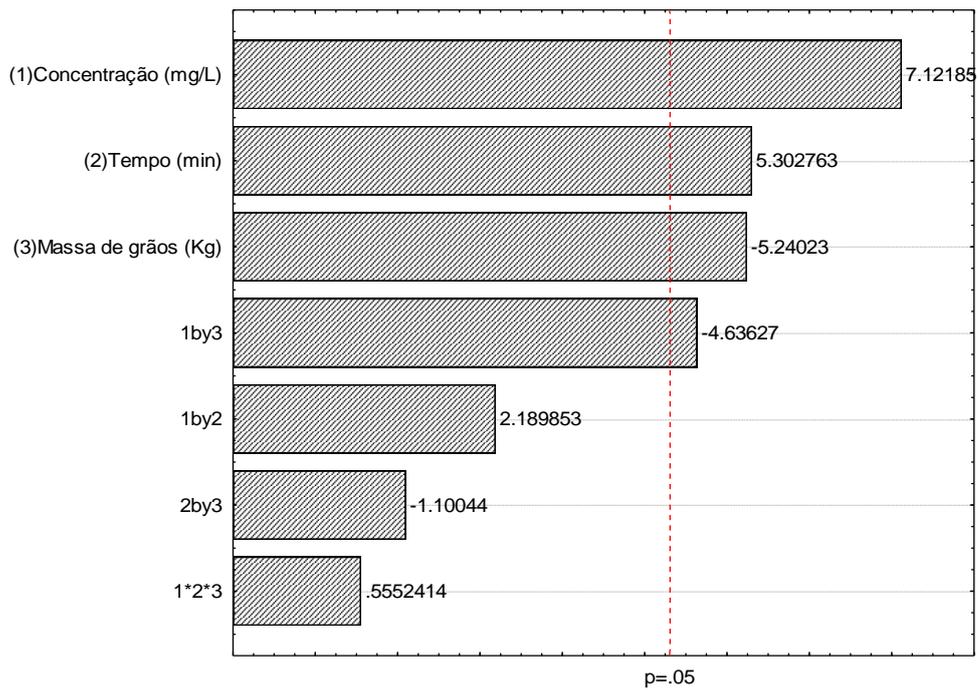


Figura 13 – Gráfico de Pareto para a variável “redução de fungos em amostras adicionadas com conídios de *Aspergillus spp*”.

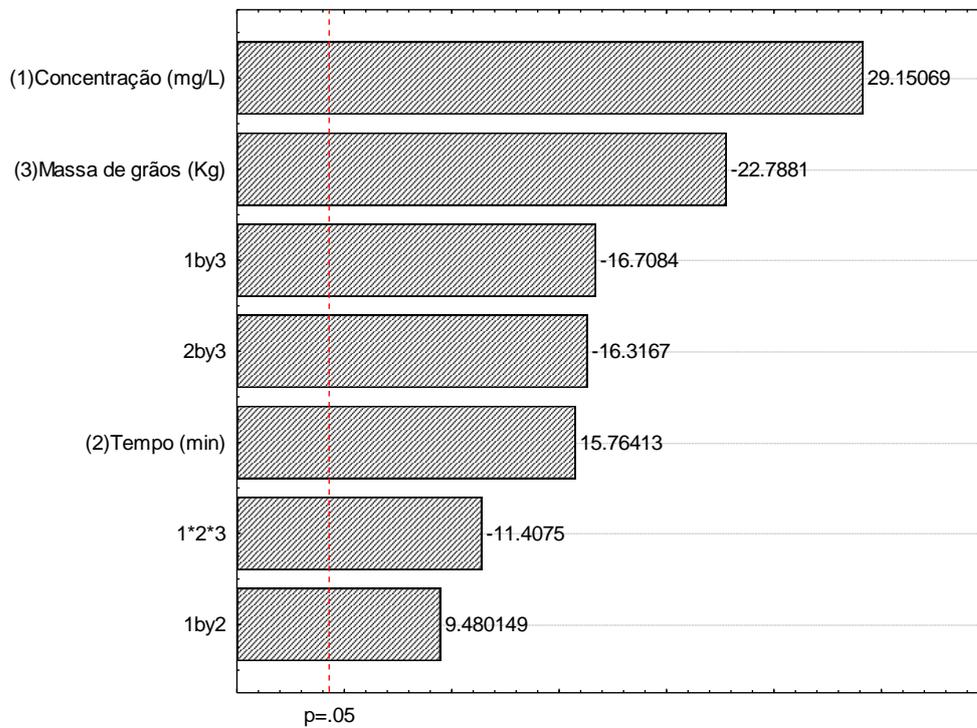


Figura 14 – Gráfico de Pareto para a variável “redução de fungos em amostras adicionadas com conídios de *Fusarium spp*”.

A partir do Diagrama de Pareto, percebe-se que o termo que mais influenciou positivamente a redução fúngica, tanto nas amostras contaminadas com conídios de *Fusarium* spp quanto nas adicionadas de *Aspergillus* foi a concentração do ozônio. A variável tempo de exposição também teve influência positiva ($p < 0,05$), enquanto a massa de grãos influenciou de forma negativa em ambos os estudos, ou seja, quanto maior a quantidade de grãos, menor é a redução fúngica. Outros autores também revelaram essas mesmas relações positivas de concentração de ozônio e tempo de exposição em relação a degradação de fungos, como também acrescentaram que a quantidade de massa de grãos interferem de maneira negativa, quanto maior a massa mais degradação do ozônio diminuindo sua concentração para agir na oxidação das estruturas dos microrganismos (SANTOS et al, 2016; TROMBETE et al, 2016; LUO et al, 2014; CHEN et al 2014; LUO et al 2013; MENDEZ et al, 2003).

Em ambos os estudos de redução fúngica não foi possível a obtenção das superfícies de resposta, pois o percentual de variação ajustado R^2 foi baixo, correspondendo a 73,4% para as amostras de *Fusarium* spp e 55,8% para amostras de *Aspergillus* spp. Portanto, as superfícies de resposta não representariam a realidade do experimento. Dessa forma, os resultados foram representados e avaliados apenas pelo gráfico de médias (Figuras 15 e 16).

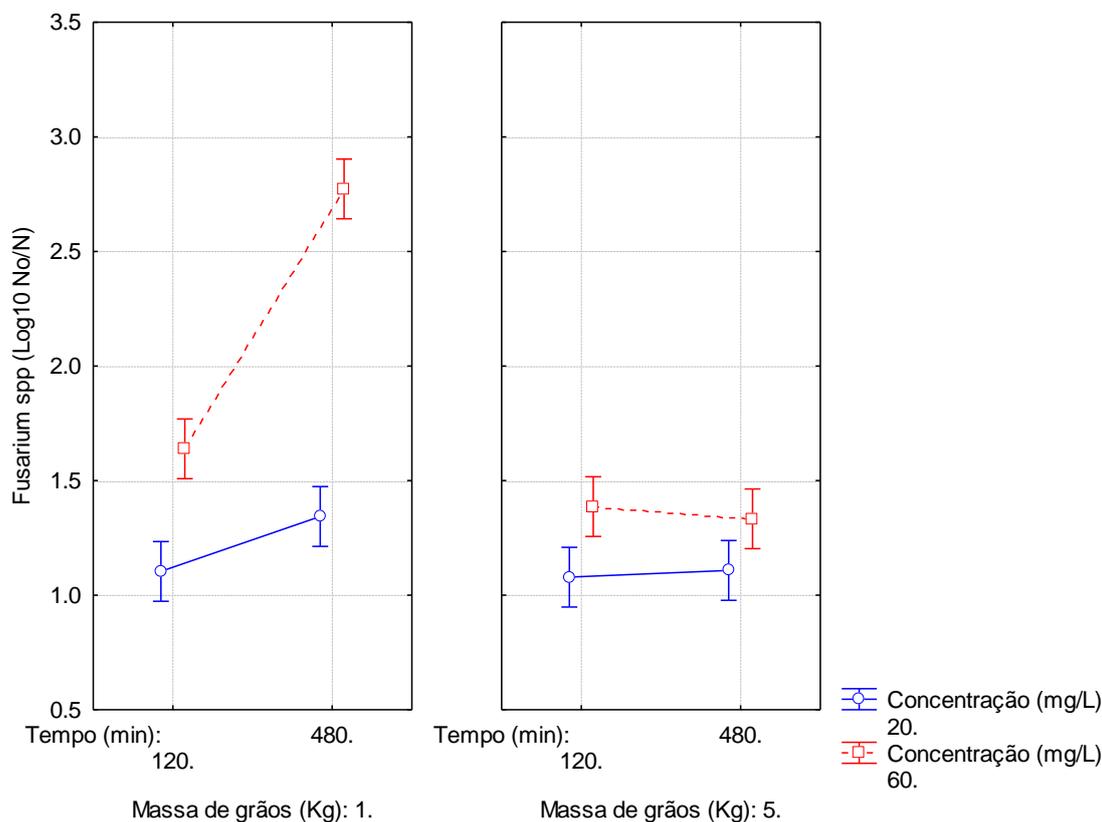


Figura 15 – Gráfico de médias para a variável redução de fungos totais em amostras adicionadas de conídios de *Fusarium* spp

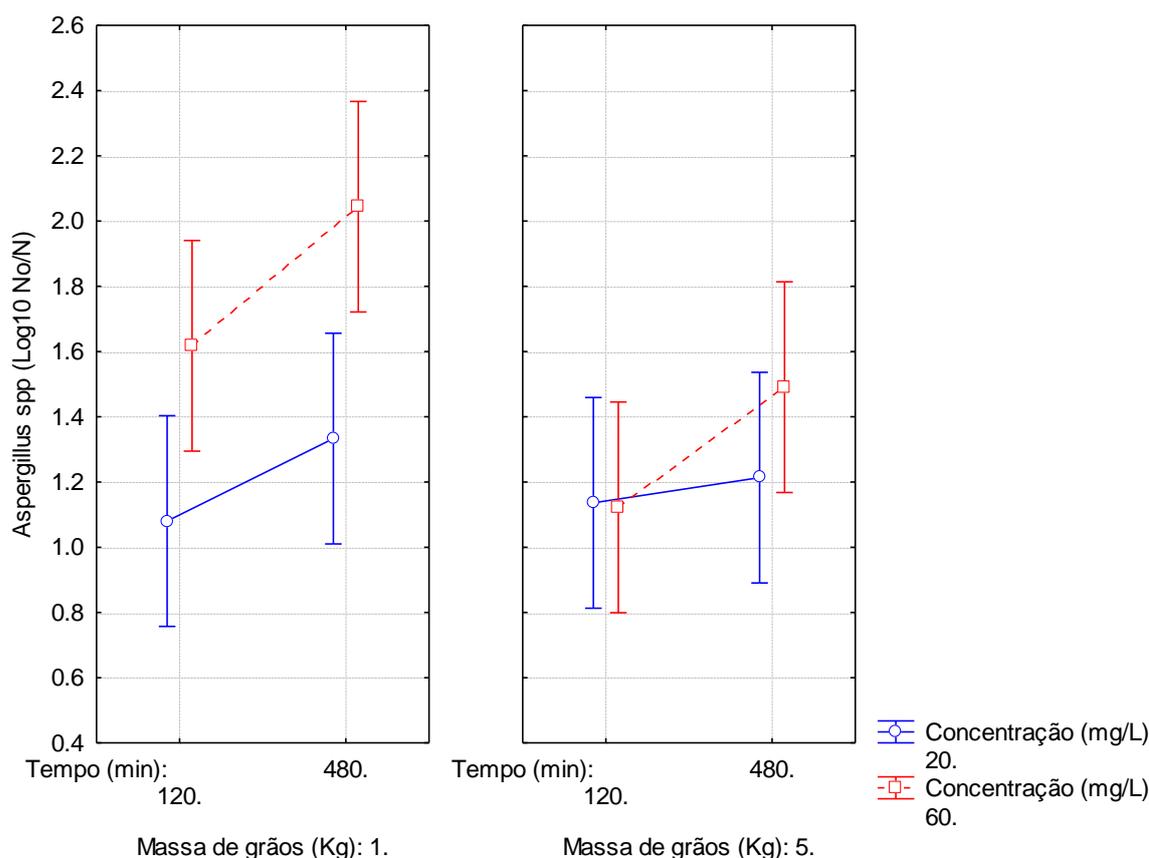


Figura 16 – Gráfico de médias para a variável redução de fungos totais em amostras adicionadas de conídios de *Aspergillus* spp

A partir dos gráficos de médias percebe-se que a maior redução fúngica, tanto nas amostras adicionadas de conídios de *Aspergillus* spp quanto nas amostras adicionadas de *Fusarium* spp, é obtida quando utilizadas menor quantidade de grãos (1 Kg), maior tempo de exposição (480 min) e maior concentração de ozônio (60 mg/L). Dessa maneira, o ozônio em altas concentrações eliminam rapidamente os sítios de degradação presente na superfície do grão que diminuiria suas concentrações e passa a interagir livremente entre os grãos aumentando sua capacidade oxidativa frente as células fúngicas, da mesma maneira que agiria nas aflatoxinas.

4.7 Efeitos da ozonização na contagem de microrganismos mesófilos totais

A contagem total de mesófilos foi realizada nas amostras ozonizadas sem contaminação artificial. As amostras de canjiquinha de milho ozonizadas e controle foram analisadas e a contagem de mesófilos totais está apresentada na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultado da contagem de microrganismos mesofílicos totais em amostras de canjiquinha de milho ozonizadas e amostra padrão

| Ensaio | Contagem (UFC/g) |
|----------|-------------------|
| 1 | $4,0 \times 10^2$ |
| 2 | <LQ |
| 3 | <LQ |
| 4 | <LQ ¹ |
| 5 | $7,0 \times 10^1$ |
| 6 | $1,6 \times 10^2$ |
| 7 | $1,1 \times 10^2$ |
| 8 | <LQ |
| 9 | $1,4 \times 10^2$ |
| 10 | $1,3 \times 10^2$ |
| 11 | $1,2 \times 10^2$ |
| Controle | $3,4 \times 10^3$ |

¹Limite de quantificação do método: 1×10^1 UFC/g

Devido a alguns ensaios terem apresentado resultados negativos (não houve nenhuma colônia na placa), não foi possível fazer avaliação estatística. Em alguns ensaios a ozonização reduziu o número de CFU / g para abaixo do limite de determinação do método (1×10^1 UFC / g). A amostra de controle tinha uma contagem correspondente a $3,4 \times 10^3$ CFU / g, enquanto que no tratamento 5, que utilizou a menor concentração de O₃, a contagem original foi reduzida para $7,0 \times 10^1$ CFU / g de canjiquinha de milho. Esta redução das células microbianas pelo O₃ pode estar relacionada a alterações do metabolismo celular, levando a apoptose e estresse oxidativo, o que torna esta tecnologia muito interessante para o controle do desenvolvimento de fungos e bactérias toxigênicas, que estão entre os principais problemas de contaminação alimentar (SAVI & SCUSSEL 2014).

Na inativação das bactérias pelo ozônio o primeiro alvo da oxidação é a membrana celular, contudo há evidências de que o ozônio possa também agir sobre a atividade enzimática das bactérias. A oxidação e a inativação pelo ozônio pode ser considerada uma reação rápida e não tão específicas em relação aos constituintes celulares, pois já foram relatadas que o ozônio também pode reagir com as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos da *Escherichia coli* (LAPOLLI et al., 2003).

Outros autores avaliaram a eficácia da ozonização em alimentos e verificaram a eficácia do poder oxidante do ozônio sobre as bactérias. Cardoso et al (2015) relataram que suas amostras de carcaças suínas foram submetidas a dois períodos de quatro horas de aplicação de até 5 ppm de ozônio durante o período de resfriamento (16 horas a 3°C) e após o tratamento houve redução significativa ($p < 0,05$) de mesófilos aeróbios. Couto et al (2014)

verificou a ação do ozônio sobre *Staphylococcus aureus* em leite desnatado e leite integral, nas concentrações de 34,7 e 44,8 mg/L e a partir dos 20 minutos de tratamento por ozonização, as reduções foram significativamente maiores.

4.8 Resultados da análise de qualidade

4.8.1 Avaliação sensorial

Os resultados da análise sensorial, realizado através do método de comparação múltipla para aroma estão apresentados na Figura 17.

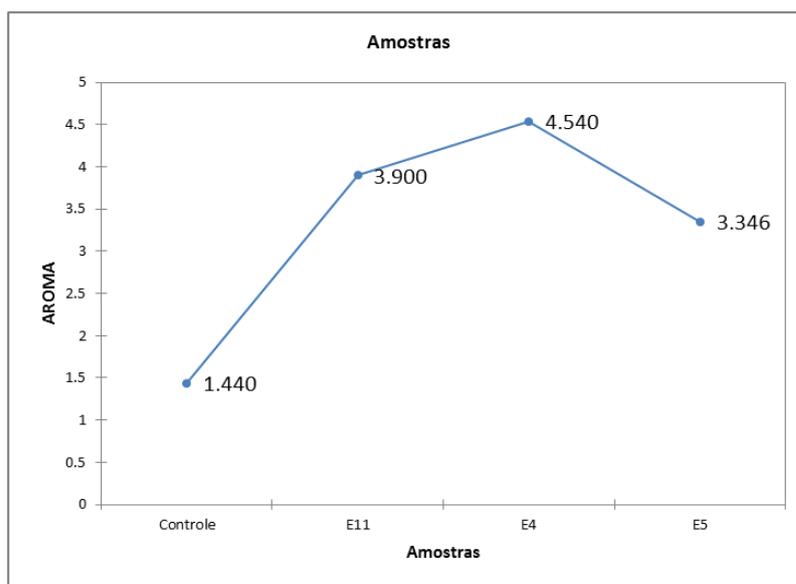


Figura 17 - Notas médias de diferença obtidas em escala variando de 1-nenhuma diferença a 5- extremamente diferente, pelo método de comparação múltipla para o parâmetro “aroma”.

Todas as amostras foram consideradas significativamente diferentes do controle, apresentando notas médias entre 3,35 e 4,54 que são representadas na escala como uma diferença entre moderada e extrema.

amostra e5 - nota 3,34 representada na escala como moderadamente diferente

amostra e11 - nota 3,9 representada na escala como muito diferente

amostra e4 - nota 4,54 representada na escala como uma diferença entre muita e extrema

Todas as amostras diferiram do controle ($p < 0,05$). Provável oxidação lipídica é a diferença foi causada por “aroma de ranço”.

Os resultados da análise sensorial, realizado através do método de comparação múltipla para aparência geral estão apresentados na Figura 18.

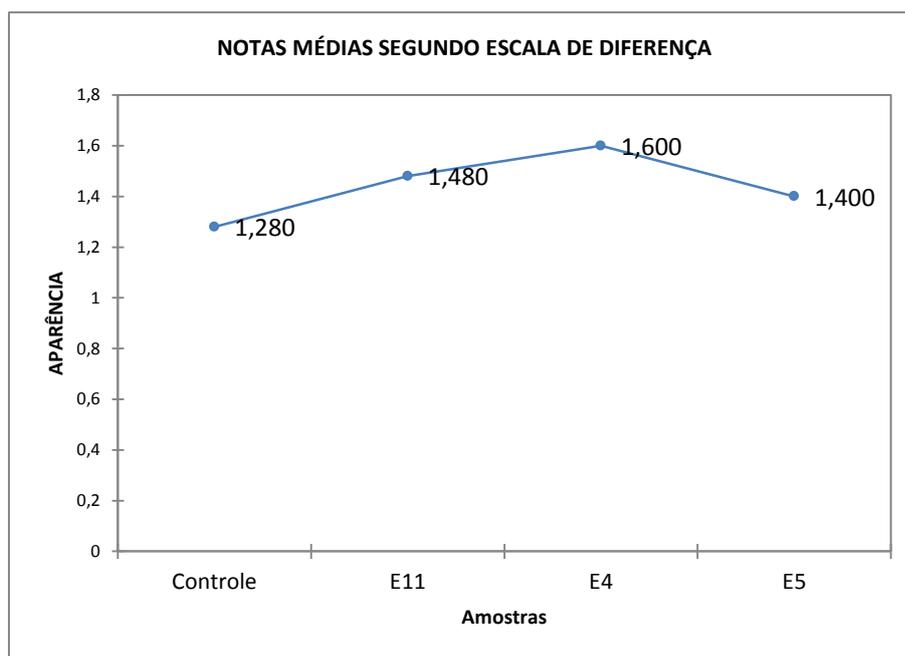


Figura 18 - Notas médias de diferença obtidas em escala variando de 1-nenhuma diferença a 5-extremamente diferente, pelo método de comparação múltipla para o parâmetro “aparência geral”.

Apenas a amostra e4 foi considerada significativamente diferente do controle, apresentando nota média de 1,6 que é representada na escala como uma diferença entre ligeira e moderada. A variação de cor ocorreu, provavelmente, pela oxidação dos carotenoides do milho, tornando esse mais branco.

4.8.2 Resultado da análise de cor

O valor L^* deu diferença no ensaio 4, pois este valor aumentou e foi o único que diferenciou do controle. Essa diferença significativa entre a luminosidade L^* da amostra ozonizada do ensaio 4 e a amostra controle indicam aumento da intensidade do branco, ou seja, houve degradação significativa dos carotenoides responsáveis pela cor natural do milho. Assim aumentou o L^* , pois a canjiquinha ficou mais branca. O valor de a^* não foi estatisticamente diferente ($p > 0,05$), pois se trata da tonalidade verde ausente no milho. Contudo o valor de b^* foi menor no ensaio 4, pois o valor de b refere-se ao amarelo que diminuiu com o tratamento pelo ozônio fazendo o milho perder a cor amarela promovida pelos compostos bioativos carotenoides. No entanto, estas coordenadas devem ser analisadas juntamente com L^* , pois assim indicaria se os grãos ficaram brancos ou não. A canjiquinha seria considerada branca conforme os valores de a^* estivessem mais próximos de zero e os valores de luminosidade de 100 (ORTOLAN et al., 2010).

Os carotenoides são uma família de mais de 600 compostos lipossolúveis encontrados nas plantas conferindo cor às folhas e frutos (BRITTON et al., 2004; AMBRÓSIO et al., 2006). O grão de milho possui menor concentração de carotenoides quando comparado a outros alimentos, porém ainda é considerado um alimento com fontes de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA et al, 2001). Os principais carotenoides encontrados nos grãos de milho são as xantofilas (luteína, betacriptoxantina e zeaxantina) e os carotenos (betacaroteno, alfacaroteno e betazeacaroteno) (JANICK BUCKNER et al., 1999). A capacidade do ozônio

em branquear ou descolorir pigmento, tal como os carotenóides, é uma de suas características mais conhecidas. No milho a cor amarela está relacionada com a presença de carotenoides os quais são facilmente oxidados por agentes oxidantes como o ozônio (TIWARI et al., 2008).

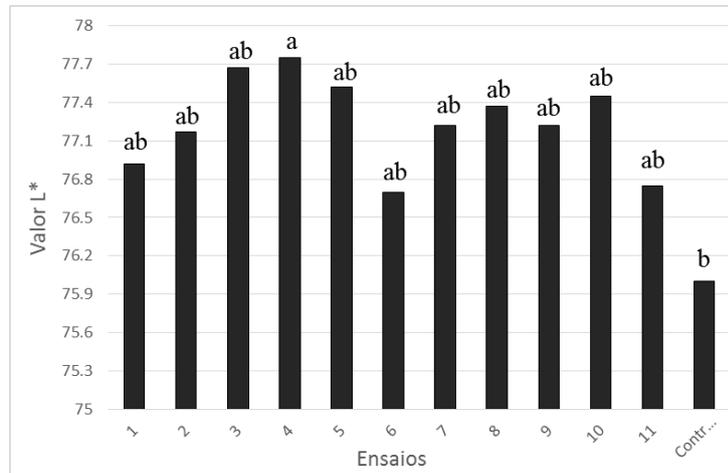


Figura 19 – Resultados da análise de colorimetria. Parâmetro L*.

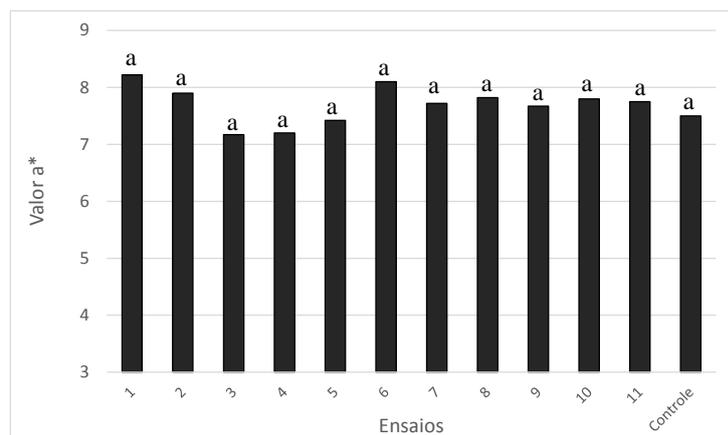


Figura 20 – Resultados da análise de colorimetria. Parâmetro a*.

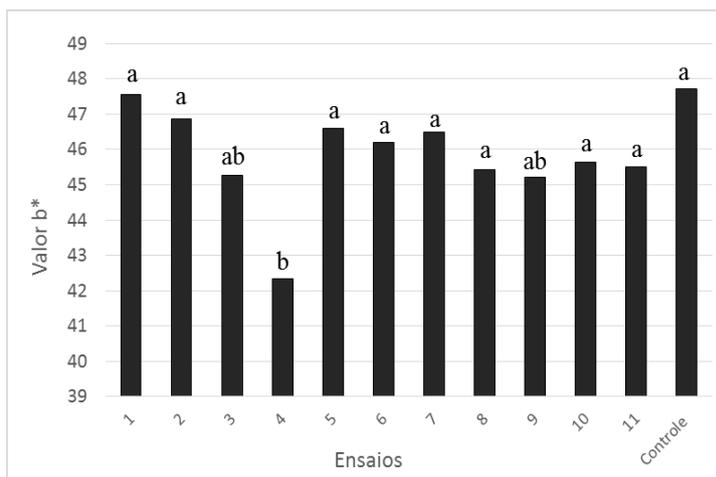


Figura 21 – Resultados da análise de colorimetria. Parâmetro b*.

4.8.3 Acidez total titulável

A determinação de acidez pode fornecer informações sobre o estado de conservação de um produto alimentício, pois qualquer processo de decomposição pode alterar concentração dos íons de hidrogênio. Houve diferença entre as amostras. O ensaio 4 apresentou o menor valor devido as condições mais extremas de ozonização apresentados no presente trabalho, onde este tratamento foi realizado com menor massa de grãos (1Kg), maior tempo de exposição pelo ozônio (8 h) e maior concentração de ozônio (60 mg/L). As amostras 5, 6, 7 e 9 não diferenciaram do controle. Quando ocorre oxidação do alimento, altera quase sempre a concentração dos íons de hidrogênio, então a acidez é aumentada (IAL, 2008).

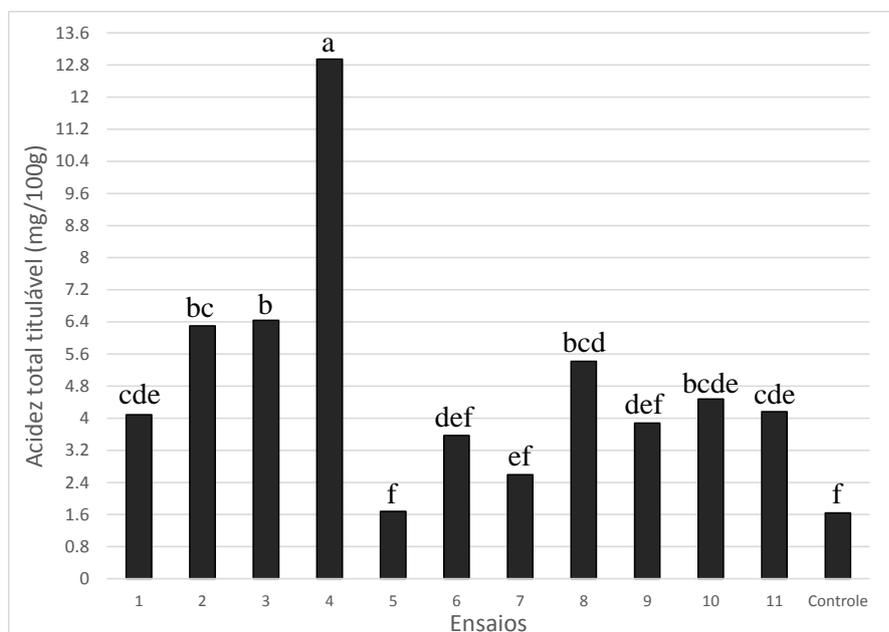


Figura 22 – Resultados da análise de acidez total titulável.

4.8.4 pH

Houve diferença significativa ($p < 0,05$). O ensaio 4 apresentou o menor valor devido as condições mais extremas de ozonização apresentados no presente trabalho, onde este tratamento foi realizado com menor massa de grãos (1Kg), maior tempo de exposição pelo ozônio (8 h) e maior concentração de ozônio (60 mg/L). A diferença significativa entre o pH da canjiquinha controle e as demais amostras ozonizadas em diferentes concentrações de ozônio (20, 40 e 60 mg/L) pode ser atribuída à oxidação dos lipídios, produzindo assim ácidos graxos, que são diretamente relacionados com a redução da qualidade final dos produtos (GUZEL-SEYDIM et al., 2004).

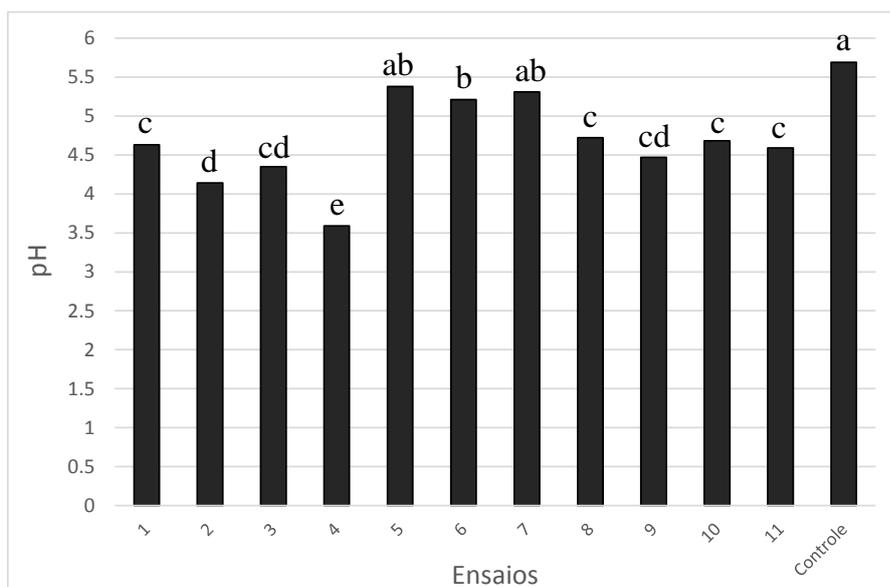


Figura 23 – Resultados da análise de pH.

4.8.5 Umidade e atividade de água

A umidade corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida e, possivelmente, outras substâncias que se volatilizam nessas condições também são removidas. O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado de resíduo seco. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$). O teor de umidade do utilizado no presente estudo foi muito baixo ($9,5 \pm 0,4\%$). Quanto maior o teor de umidade, maior será o potencial de degradação das micotoxinas, devido à formação de radicais $\cdot\text{OH}$ de forte capacidade de oxidação, como demonstrado por El-Desouky et al. (2012). Preferimos usar um baixo teor de umidade, uma vez que é a condição sob a qual o grão de milho é armazenado na indústria de alimentos, e porque este alimento ainda não foi estudado sobre ozonização. Luo et al (2014) verificaram que a ação oxidante do ozônio sobre a aflatoxina B_1 foi mais eficiente quando tratado o milho numa umidade menor comparando suas condições de tratamento. Esses mesmos autores revelaram ainda que depois do tratamento de farinha de milho exposta a concentrações de 15, 30, 45 e 75 mg/L de ozônio durante 60 minutos, houve diminuição da umidade de 17,4% para menos de 15% (LUO et al, 2013).

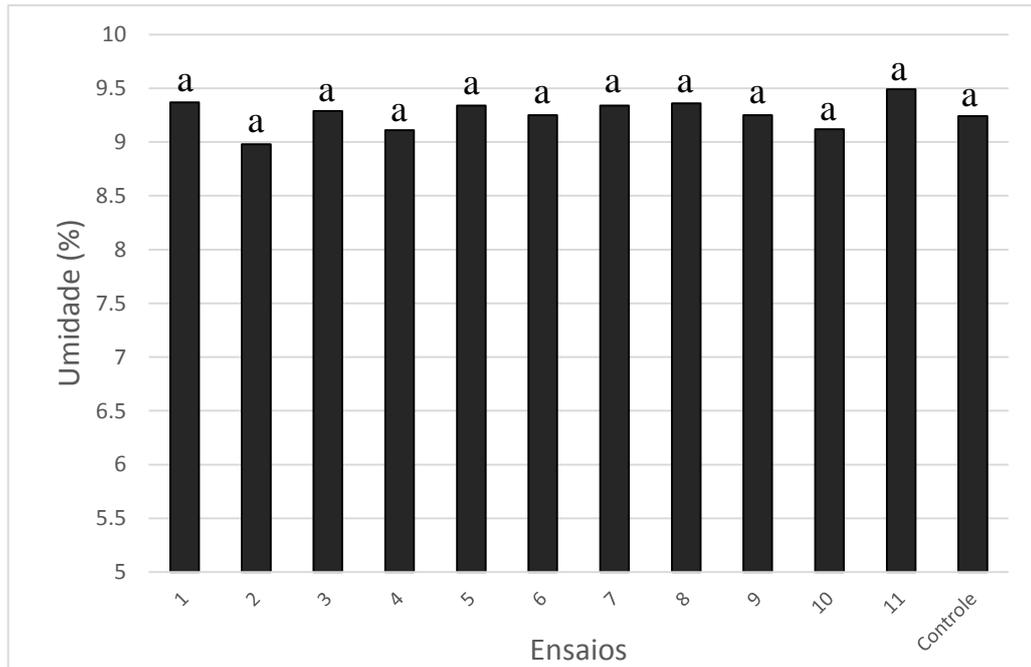


Figura 24 – Resultados da análise de umidade.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que o desenvolvimento da metodologia visando análise de um produto derivado do milho com uma técnica mais precisa e confiável como a CLAE-DF mostrou vantagens quanto à sensibilidade na detecção de aflatoxinas. Assim, desde a etapa de extração pelo método adaptado quanto a etapa de quantificação aflatoxinas em canjiquinha e canjica de milho por CLAE-DF ofereceram resultados satisfatórios, com parâmetros de validação avaliados pela presente pesquisa estando adequados de acordo com critérios oficiais adotados.

Do total de 46 amostras de mercado analisadas, 22 (47,8%) foram positivas para pelo menos uma aflatoxina. Nenhuma amostra foi detectada com os níveis de contaminação para aflatoxinas totais acima da vigente legislação brasileira (20 µg/Kg), contudo quase metade do total de amostras analisadas apresentou contaminação com pelo menos uma das quatro aflatoxinas, principalmente aflatoxina B1, que possui maior potencial patogênico dentre as aflatoxinas. Dessa maneira, mesmo que a contaminação esteja em quantidades aceitáveis, as aflatoxinas podem causar problemas de saúde em médio ou longo prazo.

A partir do cálculo da Margem de Exposição (MOE) foi possível caracterizar e avaliar o risco de exposição da aflatoxina B1 nos diferentes tipos de grupos consumidores apontando àqueles mais susceptíveis. Embora esse fator não seja uma quantificação do risco, ele pode ser usado para indicar o nível de preocupação em saúde pública, fornecendo dados para subsidiar a ANVISA em suas ações de gerenciamento de risco da exposição e garantir alimento seguro para a população, e para dar suporte informativo aos consumidores para decisões pessoais de estilo de vida no consumo de alimentos.

A ozonização gasosa mostrou-se como tecnologia não térmica eficaz para reduzir a contaminação aflatoxina e microbiana em canjiquinha de milho. Foi verificado que os tratamentos de ozonização mais drásticos estudados alcançaram melhores resultados na redução de contaminação, sendo influências positivas, quanto a maior concentração de ozônio, maior tempo de exposição ao ozônio e menor massa de grãos para interação com o ozônio. Utilizando diferentes concentrações de ozônio, foi possível obter reduções de 54,6%, 57,0%, 36,1% e 30,0% para as aflatoxinas G1, B1, G2 e B2, respectivamente. A contaminação fúngica foi reduzida em torno de 3 ciclos log CFU/g. Verificou-se o mesmo efeito microbicida na contagem total de mesófilos.

Uma vez que o grão de milho é uma matéria-prima utilizada para produzir uma grande variedade de alimentos, a ozonização gasosa pode ser considerada uma opção promissora para melhorar sua segurança, reduzindo efetivamente aflatoxinas e a contaminação microbiana. Contudo, mais pesquisas precisam ser realizadas e analisadas quanto a qualidade físico-química da canjiquinha, também com relação a aceitabilidade do produto pelo consumidor, devido diferença sensorialmente detectada entre a canjiquinha ozonizada e a não tratada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMILHO: Milho e suas riquezas: o cereal que enriquece a alimentação humana. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/ocereal.htm>>. Acesso em 18 Mai 2014.
- ABIMILHO: Milho e suas riquezas: Produtividade. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/riqueza.htm>>. Acesso em 18 Mai 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA LEGISLAÇÃO. Resolução RDC 274, de 15 de outubro de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm>. Acesso em 9 de Jun 2013.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.A.; 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, n.4, p.899-905, 2012.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.A.; MARTINS, M.A.; COSTA, A.R.; CECON, P.R. Decomposition kinetics of gaseous ozone in peanuts. *Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering*, v.31, n.5, p.930-930, 2011.
- AL-HADDAD, K. S. H.; AL-QASSEMI, R. A. S.; ROBINSON, R. K. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. **Food Control**, v. 16, n. 5, p. 405-410, 2005.
- ALLEN, B.; WU, J.; DOAN, H. Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. **Journal of Environment Science**, v. 38, p. 617-630, 2003.
- ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; VALENTE SOARES, L. M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.
- AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos a base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 336-342, 2006.
- ALMEIDA, E. et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis 994.08 – Derivatization of standards for aflatoxins, chapter 49, 2005.
- AOAC. Aflatoxin M₁ in milk and Cheese. Method 980.21. In: **Official Method of Analysis of AOAC International**, 16 ed., v. 2. Food composition; additives; natural contaminants, Natural Toxins, p.37-38, 2000.
- APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington: APHA, 1998.
- ARANA, S.; DAGLI, M.L.Z.; SABINO, M. et al. Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 9, set., 2011 .
- ARAÚJO, A. C. P; TELLES, D. L.; ALMEIDA, M. G.; NASCIMENTO, E. S. Determinación de aflatoxinas em cacahuetes comercializados em Recife-PE, Brasil. **Alimentaria**, v. 249, n. 1, p. 35-37, 1994.
- ARMOR, J.N. Striving for catalytically green processes in the 21st century. *Appl. Catal.*, p. 189-153, 1999.
- ASSIRATI, D. M. Ozônio é usado como desinfetante de efluentes. **Jornal da Unicamp**, ed. 296 -8 a 14 de agosto de 2005. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2005/ju296pag08.html>. Acesso em 6 Mar 2013.

BAHT, R. V.; VASANTHI. Contaminación por micotoxinas de alimentos y piensos: situación general, incidencia y efectos económicos sobre la disponibilidad de alimentos, comercio, exposición de los animales de granja y pérdidas económicas conexas. **Lista da Terceira Conferência Internacional Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas**. Mar. 1999.

BEIRÃO-DA-COSTA S.; MOURA-GUEDES M. C.; FERREIRA-PINTO M. M.; EMPIS J.; MOLDÃO-MARTINS M. Alternative sanitizing methods to ensure safety and quality of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, p. 1-10, 2014.

BENTO L. F., CANEPPELE M. A. B., ALBUQUERQUE M. C. F. de e, KOBAYASTI L., CANEPPELE C., ANDRADE P. J. de. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71(1):44-9, 2012.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, n.3, p.497-516, 2003.

BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A. Utilization of gaseous ozone for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on raspberries and strawberries. **Journal of Food Protection**, Amsterdam, v. 70, n. 5, p. 1093-1098, 2007.

BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORREA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, n. 2, p. 117-120, 2005.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria MTB nº 3.214, de 08 de junho de 1978. Aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas à Segurança e Medicina do Trabalho. NR 15 - **Atividades e Operações Insalubre** - Anexo no 11.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.274, de 15 de outubro de 2002. Estabelece limites de tolerância para aflatoxinas em amendoim, milho e derivados. *Diário Oficial da União*, Seção I, Brasília, 16 de outubro de 2002. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 17 Jun 2013.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 mar. 2011. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 17 set. 2013.

BULLERMAN, L. B.; TSAI, W. J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 541-546, 1994.

CALADO, V. & MONTGOMERY, D. Planejamento de experimentos usando Statistica (1st ed.). Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2005.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CALVET, R.M. **Isolamento e Identificação de Fungos Tóxicos em Carcinicultura Marinha**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

CAMPOS, C. A. et al. Evaluation of ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 223-230, 2006.

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

CARDOSO FILHO, F.C., CALVET, R.M., PEREYRA, C.M., PEREIRA, M.M.G., ROSA, C.A.R., TORRES, A.M., MURATORI, M.C.S. Ocorrência de *Aspergillus* spp., *Penicillium*

spp. E aflatoxinas em farinha de milho utilizadas no consumo humano, Piauí, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.78, n.3, p.443-447, jul./set., 2011

CASTRO, M. F. P. M.; SHEPHARD, G. S.; SEWRAM, V.; VICENTE, E.; MENDONÇA, T. A.; JORDAN, A. C. Fumonisin in Brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 7, p. 693-699, 2004.

CASTRO, M. F. P. M.; VALENTE SOARES, L. M.; FURLANI, R. P. Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, v. 2, n. 4, p. 289-295, 1995.

CHEN, RAN MA, FEI LI, PEI-WU ZHANG, WEN DING, XIAO-XIA ZHANG, QI LI, MIN WANG, YAN-RU XU, BAO-CHENG. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. **Food Chemistry**, v. 146, p. 284-8, 2014.

CHIATONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Application of ozone in industry of food. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, p. 341-349, 2008.

CHOI, L. H.; NIELSEN, S. S. The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. **Journal of Food Quality**, Westport, v. 28, p. 13-29, 2005.

CHIATTONE, P. **Ozônio e ácido ascórbico na coloração e microbiota da carne bovina maturada**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

CHIOTTA, M.L.; PONSONE, M.L.; COMBINA, M.; TORRES, A.M.; CHULZE, S.N. *Aspergillus* section Nigri species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**. 136, 137–141, 2009.

COLAÇO, W.; FERRAZ, U.; ALBUQUERQUE, L. R. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de Recife, no período de 1989 a 1991. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p. 1-4, 1994.

COMISSÃO EUROPÉIA. Directiva 98/53/CE da Comissão de 17 de Julho de 1998, Anexo II. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, p. 93-101, 1998.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, Amsterdam, n. 1/2, p. 1-10, Jan. 2002.

CULLEN, P.J.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPA, K. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends Food Science Technology**, v. 20, p. 125-136, 2009.

DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. **International Journal of Food Microbiology**. 100, 187–196, 2005.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Editora Rima, 2005, p. 784.

DE PINHO, L. M., & CEDRAZ, L. A. A importância do ozônio e seus efeitos no ambiente: propriedades, aplicabilidades e políticas ambientais, 2011. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/artigos/a-importancia-do-ozonio-e-seus-efeitos-no-ambiente/61258/>>. Acesso em 14 Mai 2013.

DOKO, M. B.; VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.

DOLLEAR, F.G.; MANN, G.E.; CODIFER, L.P.; GARDNER, H.K.; KOTLUN, S.P.J.R.; VIX, H.L.F. Elimination of aflatoxins from peanut meal. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 45, p. 862–865, 1968.

DWARAKANATH, C.T.; RAYNER, E.T.; MAN, G.E.; DOLLEAR, F.G. Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 45, p. 93-95, 1968.

EC. European Commission. Commission Regulation N° 401/2006 of 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. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonized approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. EFSA Journal 282: 1-31, 2005.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. EFSA Journal 446: 1-127, 2007.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Micotoxinas. 2012. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa.htm>> Acessado em: Mai., 2013.

EL-DESOUKY, T. A., A. M. A. SHARABA, A. I. EL-DESOUKY, AND H. A. EL-MANSY. “Effect of Ozone Gas Degradation of Aflatoxin B1 and Aspergillus Flavus Fungal.” **Journal of Environmental & Analytical Toxicology** 02 (02): 1–6, 2012.

EMBRAPA. Ozônio: tecnologia limpa e segura no controle de pragas em grãos armazenados. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=2437>>. Acesso em 2 Jun 2013.

ESCRICHE, I. et al. Effect of ozone treatment and storage temperature on physicochemical properties of mushrooms (*Agaricus bisporus*). **International Food Science Technology**, v. 7, n. 3, p. 251-258, 2001.

EUROPEAN COMMISSION (EC) Regulation. Commission regulation. No. 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, p. 2-25, 2006.

FAO. Almacenaje. 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em 23 Set 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 1992. Maize in human nutrition. Online. Disponível em: www.fao.org

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Maize in human nutrition, 1992. Online. Available at: www.fao.org

FEDDERN, V.; DORS, G.C.; TAVERNARI, F.C.; MAZZUXO, H.; CUNHA, A.; KRABBE, E.; SHEUERMANN, G.N. Aflatoxins importance on animal nutrition. In: Aflatoxins – recente advances and future prospects, cap.8, p.171-195, 2013.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L.; MANSILLA, M.L.; TADEO, J.L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**, 1, 113–122, 2010.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F. Aflatoxinas: um risco à saúde animal. **Ambiência**, v.2, n.1, p.113-127, 2006.

FERREIRA P.; QUEIROZ V. A. V.; CONCEIÇÃO R. R. P. da; MIGUEL R. A. de. Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 1, p. 54-60, 2013.

FONSECA, H. Pequeno histórico das micotoxinas no mundo e no Brasil. In: MOLIM, R. & VALENTINI, M. L. **Simpósio sobre Micotoxinas em Grãos**. Fundação Cargill/Fundação ABC, São Paulo. 208 p. 1999.

FRANKEN, M. S. The application of ozone technology for public health and industry. 2005. **Food Safety & Security at Kansas State University**. Disponível em: <<http://www.fss.k-state.edu>>. Acesso em 11 Dez 2013.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v. 149, n. 1, p. 13-19, 2000.

- FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Documentos 110, Embrapa – Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2007. 48p.
- FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Supressão de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por ozônio. **Revista Ciências Vida**, v. 28, p. 198-200 (Suplemento). Edição do XIII Encontro Nacional de Micotoxinas, Rio de Janeiro, ago. 2008.
- FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. **Drug Metabolism Reviews**, 42: 612–20, 2010.
- FREITAS-SILVA, O.; MORALES-VALLE, H.; VENÂNCIO, A.. Potencial of aqueous ozone to control aflatoxigenic fungi in brazil nuts. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-6, 2013a.
- FREITAS-SILVA, O.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, E. M. M. Potencial da ozonização no controle de fitopatógenos em pós-colheita. In: Luz, W. C, da. (org.). **Revisão anual de patologia de plantas**. 1 ed. Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, v. 21, p.96-130, 2013b.
- GIMENO, A.; MARTINS, M. L. Mycotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. 3. ed. Miami: Special Nutrients, 2011. 129 p.
- GIORDANO, B. N. E. Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). Florianópolis: UFSC, Dissertação, 193 p., 2009.
- GLÓRIA, E. M.; FONSECA, H.; SOUZA, I. M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. **Tropical Science**, v. 37, n. 1, 107-110, 1997.
- GORMAN, B. M. et al. Evaluation of hand-trimming, various sanitizing agents, and hot water spray-washing as decontamination interventions for beef brisket adipose tissue. **Journal Food Protection**, v. 58, n. 8, p. 899-907, 1995.
- GONÇALVES, A. A. Ozone: an emerging technology for the seafood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 6, p. 1527-1539, 2009.
- GONÇALVES, R. A., DOS SANTOS J. P.; TOMÉ P. H. F.; PEREIRA R. G. F. A.; ASCHERI J. L. R.; DE ABREU C. M. P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grits. **Revista Ciência e Agroecologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 643-650, mai./jun., 2003.
- GOULART, A.C.P.; FIALHO, W.F.B. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho. **Informativo ABRATES**, v.9, p.110, 1999.
- GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.
- GUZEL-SEYDIM, Z. B. et al. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 475-479, 2004.
- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in food industry. **Swiss Society of Food Science and Technology**. *Lebensm-Wiss.u.-Technology*, v. 37, p. 453-460, 2004.
- GWIRTZ, J. A., and M. N. GARCIA-CASAL. 2014. "Processing Maize Flour and Corn Meal Food Products. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312: 66–75.
- HASHIMOTO, E.H.; SANTOS, M.A.; ONO, E.Y.S.; HAYASHI, C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; HIROOKA, E.Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 123-132, jan./jun. 2003.
- HENNIGEN, M. R.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N. M.; LONGHI, A.; TORROBA, J. E.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 1, p. 55-58, 2000a.

HERMANN, G.; PINTO, F.T.; KITAZAWA, S.E.; NOLL, I.B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, 26(1): 7-10, jan.-mar. 2006.

HIBBEN, C.R.; STOTZKY, G. Effects of ozone on the germination of fungus spores. **Canadian Journal Microbiology**, v. 15, p. 1187-1196, 1969.

HORVÁTH, M.; BILITZKY, L.; HÜTTNER, J. Bactericidal, sterilizing and other effects in lower organisms. Ozone. **Budapest: Science**, 1985. cap. 3, p. 69-74.

HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, out., 2001.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, World Health Organization, some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. In.: **Summary of data reported and evaluation**, v. 73, p.131-182, Lyon, 1999.

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. In.: **Summary of data reported and evaluation**, v. 82, p. 171-175. Lyon, 2002.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008 – 2009**, Rio de Janeiro, 2011.

IGLESIAS, S.C. Degradation and biodegradability enhancement of nitrobenzene and 2,4-dichlorophenol by means of advanced oxidation processes based on ozone. 2002. 322f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade de Barcelona, Barcelona, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a ed., cap. CCIV – Micotoxinas, p. 759-801, 2008.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, mar. 2003. 35 p.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 240 - Principles and methods for the Risk Assessment on Chemicals in Food. WHO Press: 2009. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/index.html>. Acesso em 16 de abril de 2017.

JAKSCH, D.; MARGESIN, R.; MICOVINY, T. The effect of ozone treatment on the microbial contamination of pork meat measured by detecting the emissions using PTR-MS and by enumeration of microorganisms. **International Journal Mass Spectrometry**, v. 239, p. 239-214, 2004.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas Potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898–1909, 2009.

JECFA. Joint FAO/WHO expert committee on food additives - evaluation of certain food additives and contaminants: forty-ninth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Geneva: **WHO technical report series**; n. 884, 1999.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - Evaluation of certain food contaminants: sixty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: **WHO technical report series**; n. 930, 2006.

JEWERS, K. Mycotoxins and their effect on poultry production. **Options Méditerranéennes**, Sér. A., n.7, p.196-202, 1990.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciências Tecnológica Alimentos**, Campinas, v.26, n.35, p.516- 521, jul./set. 2006.

KELLER, K.M; QUEIROZ, B. D.; KELLER, L. A. M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA,M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. The mycobiota and toxicity of equine feeds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 8, p. 1037-1045, 2007.

KELLS, S., MASON, L.J., MAIER, D.E., WOLOSHUK, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research** 37, 371–382, 2001.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Decontamination of a multilaminar aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **Journal Food Safety**, v. 21, n. 1, p.1-13, 2001.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal Food Microbiology**, v. 71, n. 2-3, p. 131-138, 2001.

KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**. v. 66, n.9, p. 1242-1252, nov., 2001.

KIM, J.G; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v.8, p.713–722, 2007.

KOMANAPALLI, I. R.; LAU, B. H. S. Inactivation of bacteriophage 1, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, p. 766–769, 1998.

KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 853-859, 1995.

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

LAPOLLI, F.R.; SANTOS, L.F.; HÁSSEMER, M.E.N.; AISSE, M.M.; PIVELI, R.P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In. GONÇALVES, R. F. (Coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica, p.169-208, 2003.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e Rações**. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997.

LERAYER, A.; MARQUES, D. Guia do Milho: Tecnologia do campo à mesa. Conselho de informações sobre Biotecnologia. Jul. 2006. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf Acesso em: 10/05/2016.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9.623-9.635, 2006.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; BIAN, YUANYUAN, B.; CHEN, Z. Effect of ozone treatment on aflatoxin B1 and safety evaluation of ozonized corn. **Food Control**, v. 37, p. 171-76, 2014.

LUO, XIAOHU, R. WANG, L. WANG, Y. LI, Y. WANG, Z. CHEN. “Detoxification of Aflatoxin in Corn Flour by Ozone.” **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2013.

MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p. 875-879, 2000.

MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L. M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 10, p. 1001-1007, 2001.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.131-139, 2007.

MALLMANN C. A.; ALMEIDA C. A. A.; MOSTARDEIRO C. Automation of the analytical procedure for simultaneous determination of aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2. *In*: Congresso Internacional de Micotoxinas e Phicotoxinas, São Paulo, 2000.

MANCUSO, P. C.; SANTOS, H. **Tecnologia de reuso de água. Reúso de água**. Barueri, SP: Manole, 2003. p. 314-316.

MANOUSARIDIS, G. A. et al. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. **Food Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2005.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. Instrução Normativa nº 62 de agosto de 2003, 2003.

MATTOS A. ARRUDA de; ARAÚJO E. S.; ARAGÃO S. F.; FOOK S. M. L.; VIEIRA K. V. M.; MEIRA C. M. B. S.; SANTIAGO A. M. Qualidade dos grãos de milho utilizados em uma indústria alimentícia de Campina Grande – PB, no período de 2004-2005. **Revista Brasileira de Toxicologia** 22, n. 1-2 34-41, 2009.

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

MCKENZIE K.S., SARR, A.; MAYURA, K.; BAILEY, R.H.; MILLER, D.R.; ROGERS, T.D.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; PHILLIPS, T.D. Chemical degradation of diverse mycotoxins using a novel method of ozone production. **Food Chemistry Toxicology**, v. 35, p. 807–20, 1997.

MCKENZIE, K. S.; KUBENA, L. F.; DENVIR, A. J.; ROGERS, T. D.; HITCHENS, G. D.; BAILEY, R. H.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, S. A.; PHILLIPS, T. D. Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**, v.77, p.1094-1102, 1998.

MENDEZ, F MAIER, D.E MASON, L.J WOLOSHUK, C.P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *Journal of Stored Products Research*, v. 39 (1), p. 33-44, 2003.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

MORAES, S.G.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. **Chemosphere**, v. 40, p. 369-373, 2000.

MORAES, V. B. Efeito do resíduo da moagem à seco de milho, micropulverizado no metabolismo lipídico, na glicemia e na composição corporal em ratos alimentados com dieta da cafeteria. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 64 f., 2009.

MORENO, E.C.; GARCIA, G.T.; ONO, M.A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, 116, 220–226, 2009.

MURATORI, M.C.S., PEREIRA, M.M.G., COSTA, A.P.R., MACHADO JUNIOR, A.A.N., SANTOS, J.D.F., LOPES, J.B., MACHADO, F.C.F. Contaminação fúngica em rações para camarões cultivados *Comunicata Scientiae* 4(1): 85-90, 2013.

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

NAJAFI, M. B.; KHODAPARAST, M. H. H. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 1, 27-30, 2009.

NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone Contribution In Food Industry In Japan. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, p. 425-429, 2006.

NAMA. North American Millers Association. 2014. Corn Milling Process. Online. Disponível em: www.namamillers.org/education/corn-milling-process

NUNES, E.M.C.G. **Microbiota Fúngica nos Ingredientes e em Ração para Piscicultura**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

NUSS, E. T., S. A. TANUMIHARDJO. “Quality Protein Maize for Africa: Closing the Protein Inadequacy Gap in Vulnerable Populations.” **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, 2 (3): 217–24, 2011.

OGIDO, R.; OLIVEIRA, C.A.; LEDOUX, D.R. Effects of prolonged administration of aflatoxins B1 and fumonisin B1 in laying Japanese quail. **Poultry Science**, v.83, p.1953-1958, 2004.

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.221-225, mai., 2010.

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; ROSIM, R.E.; FAGUNDES, H.; FERNANDES, A.M. Ocorrência simultânea de aflatoxina e ácido ciclopiazônico em rações para vacas leiteiras. **Revista Analytica**. Agosto/Setembro, 24, 88-92, 2006.

OLIVEIRA, V.; MESQUITA, A. J.; SERAFINI, A. B.; RIBEIRO, J. L.; SILVA, M. R. R. Ocorrência de aflatoxinas B1e B2 em amendoim comercializado em Goiânia, GO, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, n. 4, p. 319-322, 1991.

OLIVEIRA T. R. de; BARANA A. C.; JACCOUD-FILHO D. de S.; NETO F. F. Avaliação da contaminação por aflatoxinas totais e zearalenona em variedades de milho crioulo (*Zea mays* L.) através do método imunoenzimático ELISA. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. ISSN: 1981-3686, v. 04, n. 02: p. 179-185, 2010.

ORSI, R. B.; CORREA, B.; POZZI, C. R.; SCHAMMAS, A. E.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 1, p. 75-87, 2000.

ORTOLAN, F.; HECKTHEUER, L.H., MIRANDA, M.Z. Efeito do armazenamento à baixa temperatura (-4 °C) na cor e no teor de acidez da farinha de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2010.

PALOU, L.; SMILANICK, J.L.; CRISOSTO, C.H.; MANSOUR, M. Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue moulds on cold stored citrus fruit. **Plant Disease**, v. 85, p. 632–638, 2001.

PARK, D.L. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 1, p. 49-60, 1993.

PATIL, S.; BOURKE, P.; FRIAS, J. M.; TIWARI, B. k.; CULLEN, P. J. Inactivation of *Escherichia coli* in orange juice using ozone. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 551-557, 2009.

PIETSCH, C.; KERSTEN, S.; BURKHARDTHOLM, P.; VALENTA, H.; DANICKE, S. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in commercial fish feed: an initial study. **Toxins**, v.5, p.184-192, 2013.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. New York: Springer Science + Business Media, 2009.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; RIBEIRO, J.M.M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em

amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil, **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p.106-112, 2005.

POHLMAN, F. W.; STIVARIUS, M.R.; MCELYEA, K.S.; JONHSON, Z.B.; JONHSON, M.G. The effects of Ozone, chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef. **Meat Science**, v. 61, p. 307-313, 2002.

POZZI, C. R.; CORREA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CHACON-RECHE, N. O.; MEIRELLES, M. C. A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO Júnior, I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

PRESTES, E. B. **Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas**. 2007. 198f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

PROCTOR, A.D.; AHMEDNA, M.; KUMAR, J.V.; GOKTEPE, I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p. 786–793, 2004.

PRUDENTE JR., A. D.; KING, J. M. Efficacy and Safety Evaluation of Ozonation to Degrade Aflatoxin in Corn. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2866–2872, 2002.

RAILA, A.; STEPONAVIČIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVIČIENĖ, A.; ZVICEVIČIUS, E. Investigation of physical prevention means to reduce mycological contamination of grain surface. **Ecologija**, v.3, p.88-95, 2006.

RAMOS C. R. B. A.; BRASIL E. M.; GERALDINE R. M. Avaliação 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, jun, 2008.

REAGAN, J. O.; ACUFF, G. R.; BUEGI, D. R.; BUYCK, M. J.; DICKSON, J. S.; CASTNER, C. L.; MARSDEN, J. L. Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 751-756, 1996.

REDDY, K.R.N.; REDDY, C.S.; MURALIDHAREN, K. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. **Food Microbiology**, 26, 27–31, 2009.

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E. W.; HANPHIL, J. B.; PALNIKAR, P. Efficacy of ozonated water against various food related micro-organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 3471-3475, 1995.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, out., 2004.

RIBEIRO, S.A.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S. e LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 26, n.2, p. 223-229. 2003.

RITTER, A.C.; HOELTZ, M.; NOLL, I.B. Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 3, set., 2011.

RODRIGUES, A.M.D., CALVET, R.M., SILVA, M.C.C., CARDOSO FILHO, F.C., MONTE, A.M., PEREYRA, C.M., MURATORI, M.C.S., NOBREGA, F.C.G., PEREIRA, M.M.G. Qualidade microbiológica de castanhas de caju (*Anacardium occidentale*, L.) industrializadas e processadas artesanalmente . *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012; 71(2):415-9

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

ROIGÉ, M.B.; ARANGUREN, S.M.; RICCIO, M.B.; PEREYRA, S.; SORACI, A.L. TAPIA, M.O. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micologia** 26 (4):233–237, 2009.

ROSA, C. A. R.; RIBEIRO, J. M. M.; FRAGA, M. J.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L. R.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M.; LOPES, C. W. G. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n.1-2, p.89-96, 2006.

ROSSETTO, C. A.; SILVA, O. F.; ARAÚJO, A. E. S. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.309-315, 2005.

ROZADO, A. F. Ozônio: tecnologia para controle de pragas em grãos armazenados. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PROTEÇÃO DE PRODUTOS ARMAZENADOS. Campinas, São Paulo, 9., 2006. Disponível em: <<http://www.seedquest.com/News/releases/2006/october/17248.htm>>. Acesso em 12 Set 2013.

ROZADO A. F. Distribuição do gás ozônio em milho armazenado em silo metálico usando sistema de aeração. Viçosa: UFV, Tese, 75 p., 2013.

ROZADO A. F.; FARONI L. R. A.; URRUCHI W. M. I.; GUEDES R. N.; PAES J. L. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 282-285, 2008.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 826p, 1999.

SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais, Parte 1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 46, n. 1/2, p. 65-71, 1986.

SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E. I.; PEDROSO, M. O., GARCIA, R. V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, v. 6, n. 3, p. 327-331, 1989.

SAMSON R. A., HOEKSTRA E. S., FRISVAD J. C., FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi**. 6th ed., Baarn, The Netherlands: CBS, 2000. 389p.

SAMSON R. A., J. HOUBRAKEN, U. THRANE. Food and indoor fungi. CBS KNAW Biodiversity Center: Utrecht, 2010.

SANTACROCE, M.P.; CONVERSANO, M.C.; LAI, O.; ZIZZADORO, C.; CENTODUCATE, G.; CRESCENZO, G. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Review in Fish Biology and Fisheries, v.18, p.99-130, 2008.

SANTE, European Commission. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. Document n° SANTE/11945/2015. Europa, 01 Jan. 2016. 46 f.

SAVI, GEOVANA D; SCUSSEL, VILDES M. Effects of Ozone Gas Exposure on Toxicogenic Fungi Species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* Genera. **Ozone: Science & Engineering**, 36(2), 144-152, 2014.

SAVI, G. D., PIACENTINI K. C., AND V. M. SCUSSEL. “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**, 39 (6): 940–48, 2015.

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 5, p. 407-416, 2000.

SCUSSEL, V. M.; BEBER, M.; SOUZA, K. K. Problemas de micotoxinas nos grãos e os novos limites toleráveis na cadeia alimentar. In: Anais da 5 Conferência Brasileira de Pós Colheita. Londrina: ABRAPOS, 2010. p. 84-93.

SEKIYAMA B. L., RIBEIRO A. B., MACHINSKI P. A., MACHINSKI M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36(3):289-294, 2005.

SELIM, K.M.; EL-HOFY, H.; KHALIL, R.H. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B1-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, n.22, p.523-540, 2014.

SELMA, M. V.; IBÁÑEZ, A. M.; ALLENDE, A.; CANTWELL, M.; SUSLOW, T. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 162-168, 2008.

SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E. W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 79, n. 3, p. 671-687, 1996.

SILVA S. B., LUVIELMO M. M.; GEYER M. C.; PRÁ I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Ciências Agrárias**, v. 32, p. 659-682, 2011.

SIMAS, M. M.; BOTURA M. B.; CORREA, B. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*, v.18, p. 404- 408, 2007

SINGH, N.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K. Sequential disinfection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfafa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide, ozonated water, and thyme essential oil. **Lebensm.-Wiss.u.-Technology**, v. 36, p. 235-243, 2003.

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.

STEENSTRUP, L. D.; FLOROS, J.D. Inactivation of *E. coli* O157:H7 in apple cider by ozone at various temperatures and concentrations, *Journal of Food Processing Preservation*, Westport, v. 28, p. 103-116, 2004.

STEPONAVIČIUS D., STEPONAVIČIENE A., RAILA A., ZVICEVIČIUS E., KEMZURAITĖ A. Investigation on ozone penetration along grain mound height. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 10 (1), p. 742-747, 2012.

STRAIT, C.A. Efficacy of ozone to control insects and fungi in stored grain. M.Sc. Thesis, Purdue University, West Lafayette, IN, 1998.

TIWARI, B. K., C. S. BRENNAN, T. CURRAN, E. GALLAGHER, P. J. CULLEN, and C.P. O' DONNELL. 2010. "Application of Ozone in Grain Processing." *Journal of Cereal Science* 51 (3): 248–55.

TIWARI, B.K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; O' DONNELL, C.P.; CULLEN, P.J. Modeling colour degradation of orange juice by ozone treatment using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 553-560, 2008.

TORRES, E. A. F. S.; REGÊ FERREIRA, A. F.; RÍMOLI, C. D. Estudos das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. **Higiene Alimentar**, Itapetininga, v. 10, n. 42, p. 8-23, 1996.

TRISTAN, T.Q. Dinâmica toxicológica de aflatoxinas em alimentos de origen animal em Aguascalientes y Querétaro. **Santiago de Querétaro: Consejo Nacional de Ciência y Tecnología**; Edición Comunicación del Centro, 2002.

TROMBETE F. M.; SANTOS T. B.; DIREITO G. M.; FRAGA M. E.; SALDANHA T. In-house validation of a method for determining aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in wheat and wheat by-products. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 44 (3), 255-262, 2014.

TROMBETE, F. M., Y. D. PORTO, O. FREITAS-SILVA, R. V. PEREIRA, R. V., G. M. DIREITO, T. SALDANHA, M. E. FRAGA. “Efficacy of Ozone Treatment on Mycotoxins and Fungal Reduction in Artificially Contaminated Soft Wheat Grains” **Journal of Food Processing and Preservation**, 2016.

TRUCKSESS, M. W. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In.: KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; EGMOND, H. P. et al. **Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium**. Wageningen: Ponsen & Looyen, p.29-40, 2001.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Ozone Disinfection. Wastewater Technology Fact Sheet. **Office of Water**, Washington, DC., v. 63, p. 832, 1999.

VALENTE SOARES, L. M.; FURLANI, R. P. Z. Micotoxinas em milho para pipoca. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1/2, p. 33-36, 1992.

VALENTE SOARES, L. M.; 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 the Association of Analytical Chemists**, v. 7, n. 1, p. 22-26, 1989.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5574-5578, 2003.

VARGAS, E. A.; PREIS, R. A.; CASTRO, L.; SILVA, C. M. G. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

VIDAL, F. J. R. Proceso de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 253p, 2003.

VIJAYANANDRAJ, V. R.; PRASAD, D. N.; MOHAN, N.; GUNASEKARAN, M. Effect of ozone on *Aspergillus niger* causing black rot disease in onion. **Ozone: Science and Engineering**, v.28, p.347-350, 2006.

WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 5, p. 1106–1122, 2004.

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

YANAKA, E.K., NETTO, D.P.; SASSAHARA, M.; TAJIRI, A.N.; OLIVEIRA, A.M. Avaliação da presença de micotoxinas em milho e rações destinadas à avicultura comercial de postura nas regiões norte e noroeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, supl.1, p.79, 2004.

YEOH W. K., ALI A., FORNEY C. F., KEAT W. Effects of ozone on major antioxidants and microbial populations of fresh-cut papaya. **Journal of 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. 417-424, 2006.

YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.192–202, 2005.

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

ZHAO, J.; CRANSTON, P. M. Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 68, n. 1, p.11-18, 1995.

ZORLUGENÇ, B; KIROĞLU ZORLUGENÇ F.; OZTEKIN S.; EVLIYA I. B. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B(1) in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 3593-3597, 2008.

ZOTTI, M.; PORRO, R.; VIZZINI, A.; MARIOTTI, M. G. Inactivation of *Aspergillus* spp. by ozone treatment. **Ozone: Science and Engineering**, v.30, p.423-430, 2008.