

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Júlia Barreto Hoffmann Maciel

**CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM TRIGO POR MEIO DE
OZONIZAÇÃO**

**Porto Alegre
2022**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JÚLIA BARRETO HOFFMANN MACIEL

**CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM TRIGO POR MEIO DE
OZONIZAÇÃO**

Trabalho de conclusão do curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Juliane Elisa Welke

Porto Alegre
2022

**CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM TRIGO POR MEIO DE
OZONIZAÇÃO**

JÚLIA BARRETO HOFFMANN MACIEL

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Juliane Elisa Welke (Orientadora)
ICTA – UFRGS

Dr. Flávio Fonseca Veras
ICTA - UFRGS

Prof^a. Dra. Giovana Domeneghini Mercali
ICTA – UFRGS

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial à minha mãe Liane e meu pai João, que sempre me proporcionaram todo o acolhimento, apoio emocional e incentivo necessário ao longo de todos os anos de faculdade.

Ao meu namorado Leonardo, pelo apoio, amor e compreensão.

A todas as amigas que construí ao longo dessa jornada, que dividiram desafios, aprendizados e bons momentos, e também, às amigas de longa data que estiveram presentes em todos os momentos que precisei.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Juliane Welke, por toda a dedicação, disponibilidade e incentivo, desde meus primeiros passos em projetos de Iniciação Científica até a elaboração deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) pela educação de qualidade e por todas as oportunidades de crescimento que proporcionaram, sem dúvida fizeram a diferença na profissional que estou me tornando.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O trigo é atualmente uma das principais fontes de nutrientes para a população mundial, o que justifica a grande importância econômica da cultura no cenário de produção de grãos. A segurança desse cereal e de produtos derivados pode ser comprometida pela ocorrência de micotoxinas, originadas desde o cultivo no campo até as etapas de processamento. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos, especialmente os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A exposição a esses compostos pode resultar em nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, carcinogenicidade, entre outros. As principais micotoxinas relacionadas à cultura do trigo e que possuem Limites Máximos Tolerados (LMTs) estabelecidos por agências reguladoras são o desoxinivalenol (DON), aflatoxinas (em particular, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA). Essas micotoxinas são produzidas por fungos como *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum*, *Fusarium pseudograminearum*, contemplados por diversos estudos na literatura quanto a sua indução a toxicidade. O objetivo deste estudo foi caracterizar, por meio de uma revisão sistemática, a ocorrência de fungos e micotoxinas em trigo e o efeito do uso da tecnologia de ozonização sobre o controle e redução dos mesmos na cultura do trigo. Foram abordados também os mecanismos envolvidos na redução de fungos e micotoxinas, aspectos regulatórios e perspectivas para uso dessa tecnologia no processamento de alimentos. O uso do ozônio (O₃) surge como uma estratégia para controle de fungos e redução nos níveis de micotoxinas em alimentos. O ozônio possui alto potencial oxidante, penetrabilidade e capacidade de ação direta na parede celular de microrganismos. Além disso, a tecnologia de ozonização é considerada ambientalmente amigável, visto que o ozônio se dissocia no oxigênio e não deixa resíduos nos alimentos. Verificou-se que poucos estudos têm se dedicado à avaliação do efeito da ozonização sobre fungos e micotoxinas presentes especialmente em trigo e derivados. O ozônio tem se mostrado eficiente para fins de descontaminação, alcançando níveis de redução superiores a 90% para fungos e micotoxinas e assegurando concentrações finais abaixo dos limites máximos regulamentados pela legislação brasileira. Foram relatadas reduções de 3,0 e 3,1 log nas contagens de *Fusarium spp.* e *Aspergillus spp.*, respectivamente, após aplicação do ozônio em trigo. Entre as variáveis analisadas, as que mais influenciam no

tratamento frente ao controle do nível de micotoxinas e contagem de fungos foram a concentração de O₃, seguida pelo tempo de exposição e tamanho da massa de grãos. Os maiores níveis de redução se originaram da aplicação das maiores concentrações de O₃. Concluiu-se que a ozonização é um método considerado eficiente na redução de contaminação de grãos de trigo por fungos filamentosos e micotoxinas.

Palavras-chave: Aflatoxinas, Aflatoxina B1, Desoxinivalenol, Ozônio, Zearalenona.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das principais micotoxinas encontradas em cereais.	18
Figura 2 - Distribuição dos níveis de (A) Desoxinivalenol e (B) Zearalenona em amostras de trigo de 78 municípios brasileiros.	24
Figura 3 - Formação da molécula de ozônio.	27
Figura 4 - Mecanismos de reação direto e indireto do ozônio com a matéria orgânica em meio aquoso (MO = matéria orgânica; MO _{ox} = matéria orgânica oxidada).	30
Figura 5 - Esquema representativo da inativação de microrganismos através da ozonização.	31
Figura 6 - Princípio de geração de ozônio pelo método de descarga eletroquímica (efeito corona).	36
Figura 7 - Efeito do gás ozônio no crescimento de <i>A. flavus</i> em diferentes concentrações e tempos de exposição (40 e 60 $\mu\text{mol/mol}$; 30–180 min).	42
Figura 8 - Efeito do gás ozônio no crescimento de <i>F. graminearum</i> em diferentes concentrações e tempos de exposição (40 e 60 $\mu\text{mol/mol}$; 30–180 min).	42
Figure 9 - Efeito do tratamento com ozônio sobre os níveis de DON em (A) grãos de trigo e (B) farinha de trigo com diferentes teores de umidade.	45
Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição sobre os níveis de DON em (A) grãos de trigo e (B) farinha de trigo.	45
Figura 11 - Efeitos da aplicação de ozônio em concentração de 80 mg/L e diferentes tempos de exposição na degradação do padrão de DON.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Maiores Produtores Mundiais de Trigo Safra 2021/2022 (1000T).	14
Tabela 2- Ocorrência de micotoxinas em trigo produzido em diversos países.	22
Tabela 3 - Limites máximos tolerados para alimentos à base de trigo.	25
Tabela 4 - Propriedades físicas do ozônio.	27
Tabela 5 - Percentual de sobrevivência de esporos em razão da umidade e temperatura em grãos de trigo.	40
Tabela 6- Efeitos do tratamento com ozônio sobre os níveis de fungos em trigo.	40
Tabela 7- Efeitos do tratamento com ozônio sobre os níveis de micotoxinas em trigo.	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
3 METODOLOGIA	13
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1 O TRIGO NA ALIMENTAÇÃO HUMANA	14
4.2 FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM TRIGO	15
4.3 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM TRIGO	17
4.3.1 Micotoxinas	17
4.3.2 Caracterização das principais micotoxinas encontradas no trigo e efeitos tóxicos relacionados	19
4.3.2.1 Desoxinivalenol (DON)	19
4.3.2.2 Zearalenona (ZEA)	20
4.3.2.3 Aflatoxinas (AFs)	20
4.3.2.4 Ocratoxina A (OTA)	21
4.3.3 Ocorrências de Micotoxinas em trigo em diversos países no mundo	21
4.3.4 Legislação e limites de tolerância de micotoxinas em trigo	24
4.4 O USO DO OZÔNIO EM ALIMENTOS	26
4.4.1 Ozônio	26
4.4.2 Mecanismos químicos da ozonização	28
4.4.3 Mecanismo de redução de microrganismos e micotoxinas através da ozonização	30
4.4.4 Legislação no Brasil e no mundo para uso de Ozônio em alimentos	32
4.5 O USO DO OZÔNIO PARA CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM TRIGO	35
4.5.1 Produção industrial de Ozônio	35
4.5.2 Efeito observado no controle de fungos e micotoxinas pela aplicação do ozônio em grãos de trigo	38

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

48

REFERÊNCIAS

50

1 INTRODUÇÃO

A cultura do trigo apresenta grande relevância na produção mundial de grãos. Em conjunto com o arroz e o milho, o trigo integra o quadro dos cereais mais cultivados no mundo (CONAB, 2022). A grande popularidade da cultura está atrelada à diversidade de cultivares e a possibilidade de empregá-las na fabricação de uma extensa gama de alimentos. A produção mundial de trigo totaliza cerca de 778,8 milhões de toneladas anualmente e estima-se que no Brasil, 78% do grãos processados deem origem a farinha de trigo, que posteriormente é destinada às indústrias de panificação, massas e biscoitos (USDA, 2021; ABITRIGO, 2021).

A ocorrência de micotoxinas em cereais e seus derivados decorrente da contaminação por fungos é comumente relatada na literatura (ALSHANNAQ, YU, 2017). As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos, especialmente os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Sweeney, 1998). O controle da contaminação por micotoxinas surge como um desafio importante do ponto de vista de segurança alimentar e manutenção da saúde da população, uma vez que a implementação de boas práticas agrícolas (BPA's), de armazenamento e processamento nem sempre são suficientes para garantir a ausência destes compostos. A ingestão de tais metabólitos pode ocasionar uma série de efeitos adversos à saúde de humanos e animais. As complicações dependem diretamente da natureza da micotoxina e do nível de contaminação (FUNG, CLARK, 2004). Entre os efeitos crônicos e agudos de maior recorrência estão os genotóxicos, hepatotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos (SMITH, 2016).

Os fungos do gênero *Fusarium* são responsáveis pela produção das principais micotoxinas relacionadas ao trigo, como é o caso do desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA). O DON é a micotoxina mais recorrente na cultura, encontra-se disseminado nas principais regiões produtoras em níveis significativos (TIBOLA, FERNANDES, 2020). O gênero *Aspergillus* responde pela produção das aflatoxinas (AFs) e ocratoxina A (OTA), que são repetidamente encontradas em trigo e produtos à base de trigo. Essas micotoxinas possuem limites máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que segue apresentando reduções gradativas nos limites máximos permitidos para algumas

micotoxinas ao longo dos anos a fim de restringir a contaminação e proteger a saúde dos consumidores.

Nesse contexto, novas tecnologias estão sendo aplicadas com intuito de promover reduções nos níveis de micotoxinas em alimentos contaminados, incluindo o uso de radiação, enzimas, adsorventes e a ozonização (LUZ *et al.*, 2022). O uso do ozônio surge como uma alternativa promissora de redução na contaminação, uma vez que possui alta capacidade oxidante e a decomposição do composto não deixa resíduos nos alimentos, gerando como produto final o oxigênio. Resultados positivos frente ao uso da ozonização para controle de micotoxinas têm sido relatados na literatura; especialmente em frutas, vegetais frescos e cereais (TROMBETE, 2016). A tecnologia pode ser aplicada na forma gasosa ou por meio de água ozonizada. Para armazenamento de grãos e controle de fungos e micotoxinas, o uso do gás é mais relatado. Enquanto o uso de ozônio em meio aquoso está mais relacionado a higienização de frutas e hortaliças e umidificação de cereais em etapa anterior ao processo de moagem (COELHO *et al.*, 2015).

A degradação dos compostos tóxicos ocorre por meio da reação do ozônio molecular (O_3) ou radicais hidroxil com os contaminantes, ocasionando a degradação e geração de produtos de baixo peso molecular com reduzida toxicidade e atividade biológica. Uma das principais vantagens relacionadas ao uso do ozônio em detrimento de outros agentes oxidantes é o reconhecimento como uma “tecnologia ambientalmente amigável” no que tange a produção e aplicação (LUO *et al.*, 2014; TROMBETE, 2016; O’DONNELL *et al.*, 2012).

A presença de micotoxinas no trigo é inevitável em muitos casos, principalmente pelas características da infecção fúngica, que se distribui ao longo do grão desde as camadas mais externas (LEE *et al.*, 1987). Dessa forma, é essencial que mecanismos alternativos de redução desses compostos, como é o caso da ozonização, sejam aprofundados a fim de garantir que alimentos seguros cheguem à mesa dos consumidores.

2 OBJETIVOS

Apresentar, com base em dados da literatura, o estado da arte relacionado à ocorrência de fungos e micotoxinas e do uso do ozônio em alimentos, bem como

investigar o efeito do uso da tecnologia de ozonização sobre o controle e redução de fungos e das principais micotoxinas encontradas na cultura do trigo.

3 METODOLOGIA

Este trabalho consiste em uma revisão bibliográfica, um método que tem como finalidade sintetizar os resultados obtidos por pesquisas realizadas anteriormente sobre o tema proposto. A consulta aos artigos ocorreu por meio das bases de dados “Web of Science”, “Pubmed” e Biblioteca SciELO durante o período de maio até setembro de 2022. Combinações entre as palavras-chaves “wheat, mycotoxin, methods to reduce mycotoxins, fungus, ozone, deoxynivalenol, zearalenone, aflatoxin, *Fusarium*” foram utilizadas com o intuito de filtrar os materiais de interesse. Consideraram-se aptas as publicações realizadas a partir do ano de 2012. Os trabalhos foram elencados a partir de leitura criteriosa do resumo e do material na íntegra, e julgados conforme a pertinência ao tema proposto.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O TRIGO NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

O trigo (*Triticum aestivum L.*) é um cereal amplamente cultivado e possui grande importância econômica e nutricional. Atualmente, o trigo é considerado o segundo alimento mais consumido no mundo, alcançando um consumo anual de aproximadamente 791 milhões de toneladas (FAO, 2021; USDA, 2021). O consumo expressivo através da dieta se justifica pela contribuição significativa que esse alimento detém como fonte direta de energia, proteínas, vitaminas, minerais e fibras (MCKEOWN *et al.*, 2013).

A produção mundial de trigo atingiu cerca de 778,8 toneladas safra relativa ao período de 2021/2022. A Tabela 1 apresenta o ranking dos dez maiores produtores mundiais. Juntos, estes países somam aproximadamente 645,1 milhões de toneladas, equivalente a 82,8% do percentual global. O Brasil atualmente integra a décima quinta posição no ranking, com produção estimada de 7,7 milhões de toneladas (USDA, 2021; CONAB, 2022). Em âmbito nacional, a região Sul concentra aproximadamente 90% da produção brasileira de trigo, sendo o estado do Paraná o

estado que apresenta os maiores números, seguido pelo Rio Grande do Sul (CONAB, 2022).

Tabela 1- Maiores Produtores Mundiais de Trigo Safra 2021/2022 (1000T).

Posição	País	Volume (1000 T)
1	União Européia	138,4
2	China	135,9
3	Índia	109,5
4	Rússia	75,2
5	Estados Unidos	44,7
6	Austrália	36,3
7	Ucrânia	33
8	Paquistão	27,4
9	Argentina	22,1
10	Canadá	21,6

Fonte: USDA - Junho/2022.

Praticamente todo o trigo produzido é destinado à moagem com o intuito de ser transformado em farinha e posteriormente, aplicado na fabricação de pães, massas, bolos, biscoitos, entre outros. No Brasil, a maior parte da produção interna é absorvida pela indústria de panificação (46,9%), enquanto o uso doméstico faz abranger cerca de 18,7% e o restante é consumido pela indústrias de massas (17,9%), biscoitos (11,9%) e outros (4,5%) (ABITRIGO, 2020).

4.2 FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS EM TRIGO

A microbiota dos grãos de trigo é composta por uma diversidade de fungos filamentosos. Os fungos são ubíquos, estão distribuídos na natureza, no solo, ar, água de irrigação, entre outros. Todas essas podem ser consideradas potenciais fontes de contaminação em cereais, sendo recorrentemente aproveitadas por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Frequentemente, as infecções fúngicas se iniciam no campo e são levadas até os locais de armazenamento dos grãos. Ao encontrar condições propícias, especialmente umidade e temperatura elevadas, pequenas quantidades de esporos fúngicos são capazes de germinar e se

multiplicar rapidamente, ocasionando deterioração dos grãos e síntese de micotoxinas (MORETTI, PASCALE, LOGRIECO, 2019).

Durante o cultivo no campo, fungos toxigênicos podem atuar de outras maneiras. Algumas espécies do complexo *Fusarium graminearum* atuam como patógenos nas plantas, estando relacionadas a ocorrência de uma das doenças mais importantes no trigo, a Fusarium Head Blight (FHB) ou fusariose. O início da infecção fúngica se concentra na ocasião de extrusão das anteras sob temperatura ótima de 20 a 30°C, caracterizando o estágio de florescimento como o mais sensível à contaminação pelo patógeno. Após a infecção, o fungo se propaga por meio dos ráquis e é possível perceber a senescência prematura de espiguetas infectadas. Por vezes as infecções fúngicas ocorrem tardiamente, durante o enchimento dos grãos, gerando menores impactos na produtividade mas contribuindo para aumentar os níveis de micotoxinas no produto final (DEL PONTE et al, 2004). Os principais patógenos associados à doença são membros do complexo, porém outros patógenos como *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* e *F. cerealis* também podem ocasioná-la (AOKI et al., 2012; VALVERDE-BOGANTES et al., 2019). As espécies de *Fusarium* causadoras da FHB são capazes de sintetizar as substâncias tóxicas ainda no processo de colonização dos grãos, afetando não só a produtividade como a segurança e a qualidade do produto. A qualidade é reduzida quando os grãos ficam murchos, descoloridos e ocorre a degradação das proteínas em razão da infecção fúngica. Micotoxinas do grupo dos tricotecenos (desoxinivalenol e nivalenol) e a zearalenona são as principais toxinas produzidas pelas espécies causadoras de fusariose.

Alguns fungos também se desenvolvem na planta durante a senescência ou em condições de estresse, como é o caso do *Aspergillus flavus*. O *Aspergillus flavus*, assim como o *Aspergillus parasiticus* são as principais espécies relacionadas à produção de aflatoxinas (BENNETT, KLICH, 2003). Enquanto *A. flavus* é capaz de produzir as aflatoxinas B1, B2, o *A. parasiticus* sintetiza também as aflatoxinas G1 e G2. Da mesma forma, as aflatoxinas podem ser produzidas por *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. toxicarius*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus* e *A. arachidicola*, e manifestadas sobretudo, em áreas de clima tropical e subtropical (SAMSON et al., 2006).

Existem fungos que colonizam a planta e predispõe o trigo à contaminação por micotoxinas após a colheita, a exemplo do *Penicillium verrucosum*,

predominantemente vinculado a produção de ocratoxina A em cereais em climas temperados ou frios (PITT, HOCKING, 1997). O *P. verrucosum* é uma espécie saprófita, que se instala no solo e consegue se desenvolver em condições de reduzida atividade de água e, até mesmo em resíduos de outras culturas. O fungo em questão é capaz de colonizar os grãos durante a etapa de secagem tardia e em situações de pós-colheita deficitária, se beneficiando de bolsões de umidade para a produção de OTA. Em partes mais quentes e tropicais no mundo, a OTA também pode ser produzida por algumas espécies de *Aspergillus*, como *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. melleus* (BAYMAN *et al.*, 2002). Há relatos de ocorrência de outros fungos toxigênicos na cultura do trigo, contudo, os apresentados até então demonstram maior relevância na produção de micotoxinas legisladas.

4.3 OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM TRIGO

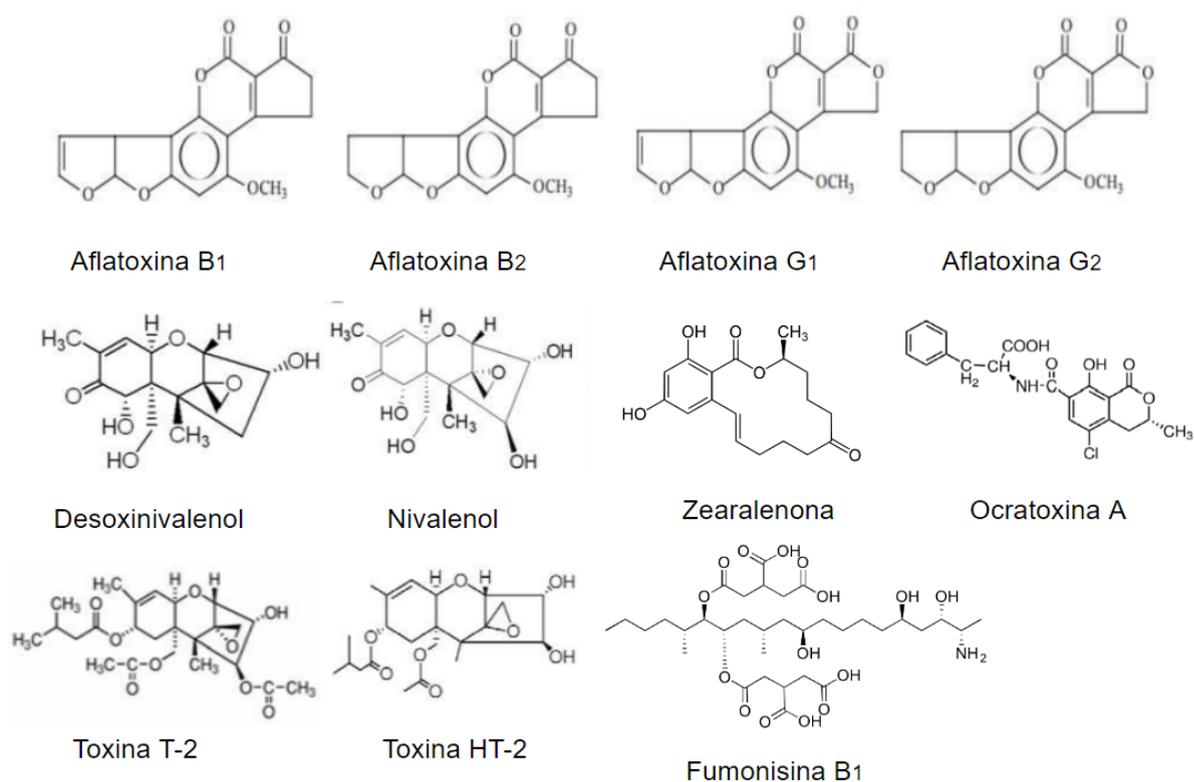
4.3.1 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diversas espécies de fungos filamentosos, especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Em condições propícias de umidade e temperatura estes fungos podem se desenvolver nas plantas durante o cultivo no campo ou nas etapas subsequentes, de armazenamento, transporte e processamento dos grãos (EFSA, 2012; SWEENEY, 1998; ALSHANNAQ, YU, 2017). A combinação de temperaturas entre 20 e 30°C e umidade relativa do ar na faixa de 75 a 95% proporciona circunstâncias favoráveis para o crescimento fúngico. Porém, a produção de micotoxinas não está condicionada apenas à presença de fungos. É necessário que ocorram oscilações em tais parâmetros para que os compostos tóxicos sejam produzidos (ANFOSSI *et al.*, 2016).

O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas pode implicar no comprometimento da saúde humana e animal. A exposição a tais compostos tóxicos está relacionada ao surgimento de efeitos de genotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, imunossupressão, carcinogenicidade e distúrbios gastrointestinais (HUSSEIN, BRASSEL, 2001; SMITH, 2016; AGRIOPOULOU *et al.*, 2020).

Entre as micotoxinas mais relacionadas a contaminação de alimentos é possível destacar as aflatoxinas (AFs), ocratoxina (OTA), fumonisina B1 (FB1), desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenona (ZEA) e toxinas T-2 e HT-2 (HUSSEIN, BRASSEL, 2001; LIEW, 2018). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica as aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 no grupo 1, que engloba os compostos considerados carcinogênicos para humanos. A OTA e fumonisina integram o grupo 2B, sendo consideradas possivelmente carcinogênicas para humanos. Enquanto, DON, ZEA e toxinas T-2 e HT-2 fazem parte do grupo 3, tratando-se de substâncias não classificáveis quanto à sua carcinogenicidade para humanos (IARC, 2020). A Figura 1 apresenta a estrutura química das principais micotoxinas encontradas em cereais no mundo.

Figura 1- Estrutura química das principais micotoxinas encontradas em cereais.



Fonte: PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Estima-se que cerca de 25% da produção agrícola mundial esteja contaminada por micotoxinas (ESKOLA *et al.*, 2020). Do ponto de vista econômico, a

presença destes metabólitos resulta em perdas significativas na produção de grãos, descarte de alimentos e rações impróprias para consumo, prejuízos na saúde de animais, e conseqüentemente, redução de produtividade da pecuária e aumento de custos com análises e regulamentação (CHELI *et al.*, 2013).

A maioria das micotoxinas são compostos química e termicamente estáveis, o que justifica a dificuldade de eliminação durante o processamento de alimentos. Processos como cocção, assamento, fritura e pasteurização nem sempre são suficientes para eliminar a presença de micotoxinas no produto final (KAUSHIK, 2015). Dessa forma, o conhecimento referente a outros mecanismos de redução vêm sendo aprofundado a fim de minimizar a chegada desses compostos até o prato dos consumidores. Entre eles, ressalta-se o uso do ozônio como uma alternativa viável.

4.3.2 Caracterização das principais micotoxinas encontradas no trigo e efeitos tóxicos relacionados

4.3.2.1 Desoxinivalenol (DON)

Os tricotecenos (TCTs) são o grupo que engloba micotoxinas com diversificadas estruturas químicas. São divididos em quatro tipos diferentes (A, B, C e D) conforme as disposições que ocorrem em torno da estrutura central. As toxinas T-2 e HT-2 se encontram no tipo A, enquanto o tipo B é constantemente relacionado ao desoxinivalenol (DON). Tipos C e D não incluem tricotecenos significativos para o cultivo de cereais (MARIN *et al.*, 2013).

Tricotecenos são produzidos especialmente por fungos do gênero *Fusarium*. Do ponto de vista econômico, os fungos mais importantes produtores de TCTs são o *Fusarium graminearum* e o *Fusarium culmorum*. Eles são considerados patógenos causadores da doença *Fusarium Head Blight* (ou fusariose) que infecta o trigo e outros cereais de inverno, originando diversos danos nos cultivos e perdas relacionadas à qualidade dos grãos (SON, LEE, 2012).

Entre as micotoxinas produzidas por *Fusarium*, o DON é a mais distribuída ao redor do mundo. O DON é conhecido também como “vomitoxina”, em razão da recorrência da manifestação de vômitos como sintoma. Contudo, outros efeitos

também estão relacionados a essa micotoxina, entre eles diarreia, dor abdominal, dores de cabeça e febre (SOBROVA *et al.*, 2010). A toxicidade de DON é expressa devido a facilidade do metabólito penetrar nas bicamadas lipídicas da membrana celular e reagir com DNA, RNA e organelas celulares. O principal mecanismo que DON utiliza para induzir a toxicidade é a inibição da síntese proteica ribossomal e posterior ruptura da síntese de DNA e RNA (WANNEMACHER *et al.*, 1991; ALSHANNAQ, YU, 2017; RICHARD, 2017).

A dose letal (LD₅₀), que usualmente serve como indicador da toxicidade aguda, varia entre 46 e 78 mg/kg para o desoxinivalenol. Além disso, os efeitos crônicos decorrentes da exposição a esta micotoxina incluem redução do ganho de peso e de eficiência nutricional e anorexia (PESTKA, 2004).

4.3.2.2 Zearalenona (ZEA)

A ZEA é uma micotoxina caracterizada como uma lactona macrocíclica do ácido β -resorcílico, produzida por espécies do gênero *Fusarium* que incluem o *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. pseudograminearum* (BHATNAGAR, 2002; PISTOL, 2014). Esta micotoxina exibe uma semelhança estrutural com o hormônio estrogênio e por isso, é comumente associada a sua forte atividade estrogênica e efeitos decorrentes dessa característica. A ZEA compete pela ligação com os receptores de estrogênio (ER α and ER β) em animais, o que resulta em lesões ao sistema reprodutor e efeitos como infertilidade, hiperestrogenismo, redução na produção de leite, atrofia dos ovários, entre outros (KOWALSKA, 2016; ZINEDINE *et al.*, 2007).

É recorrente a contaminação por ZEA em culturas como o trigo, milho, aveia e centeio, bem como a ocorrência simultânea dessa micotoxina com o desoxinivalenol. Da mesma forma, a produção de ZEA é auxiliada pela instauração de condições de alta umidade e baixas temperaturas (YAZAR, OMURTAG, 2008).

4.3.2.3 Aflatoxinas (AFs)

As AFs são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus* e *A. nomius*. O *A. flavus* produz

apenas os tipos de aflatoxinas B1 (AFB1) e B2 (AFB2), enquanto o *A. parasiticus* é capaz de produzir os quatro tipos mais estudados que são as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (BENNETT, KLICH, 2003; ALSHANNAQ, YU, 2017). A contaminação por aflatoxinas é comum em regiões úmidas e com temperaturas elevadas e acomete uma grande variedade de alimentos como o milho, arroz, cevada, trigo, amendoim, nozes e até mesmo o leite animal, pela ocorrência da aflatoxina M1 (AFM1) (WILSON *et al.*, 2002; BOEVRE *et al.*, 2012; ALSHANNAQ, YU, 2017).

O grupo das aflatoxinas compreende diferentes estruturas químicas. As moléculas das aflatoxinas constituem-se de um anel ciclopentanona ou lactona condensado à uma molécula de bifurano cumarina. A AFB1 possui um anel ciclopentanona e uma ligação dupla entre os carbonos C8 e C9 em apenas um dos anéis furano e por isso, se diferencia estruturalmente das demais (NORDIN, 1995). Ela é reconhecida por ser a mais tóxica e mais recorrente em casos de contaminação de alimentos entre o grupo das aflatoxinas.

Os efeitos mais relacionados à exposição às aflatoxinas são a carcinogenicidade, teratogenicidade, hepatotoxicidade, mutagenicidade e imunossupressão. O principal órgão afetado pela ação das aflatoxinas no organismo é o fígado (BENNETT, KLICH, 2003). Isso se justifica pelo fato de as aflatoxinas serem metabolizadas no fígado pelas enzimas do citocromo P450. No caso da AFB1, ocorre a biotransformação em AFB1-8,9-epóxido e este composto se liga covalentemente ao DNA, formando adutos (ALSHANNAQ, YU, 2017).

4.3.2.4 Ocratoxina A (OTA)

Entre as micotoxinas que compõem o grupo das ocratoxinas, a OTA é a que apresenta maior relevância, especialmente por manifestar maior toxicidade. A estrutura molecular da OTA consiste em uma β -fenilalanina que se liga a uma isocumarina por meio de ligação amida. Tal estrutura exhibe semelhança com o aminoácido essencial fenilalanina e interfere na atividade da fenilalanina hidroxilase nos rins e no fígado, prejudicando a síntese proteica. Além disso, ela é capaz de inibir a síntese de RNA e DNA (ŽANIC-GRUBISC *et al.*, 2000; EFSA, 2006). A presença de uma molécula de cloro em sua estrutura é responsável por potencializar seu caráter tóxico (MURPHY *et al.*, 2006).

A OTA expressa nefrotoxicidade e hepatotoxicidade aguda. Contudo, ela também é considerada genotóxica, neurotóxica, teratogênica e embriotóxica em humanos e animais (EFSA, 2006). No que diz respeito à eliminação desta micotoxina, a mesma apresenta grande estabilidade em ambientes ácidos e pode tolerar processamentos térmicos realizados em altas temperaturas (BENNETT, KLICH, 2003).

4.3.3 Ocorrências de Micotoxinas em trigo em diversos países no mundo

As micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* representam as principais ocorrências relacionadas ao trigo em termos de relevância dos níveis encontrados e potencial tóxico para saúde humana e animal. Os níveis de contaminação em trigo apresentam grande variabilidade em função das condições climáticas enfrentadas nas diferentes regiões de cultivo, safra, variedade de cultivares, entre outros. Apesar disso, o DON tem sido a micotoxina mais relatada como contaminante em trigo e produtos à base de trigo ao redor do mundo, ele encontra-se disseminado nas principais regiões produtoras, geralmente em altos níveis. Na Europa, estima-se que o DON esteja presente em cerca de 50% das amostras analisadas. Tal ocorrência é seguida pela ZEA e outras micotoxinas que integram o grupo dos tricotecenos como NIV, toxinas T-2 e HT-2 (CHELI *et al.*, 2013; VISCONTI, PASCALE, 2010).

A contaminação por AFs, especialmente dos grupos B e G, vem sendo constantemente identificada em níveis elevados no trigo e alimentos relacionados, sobretudo em países que contam com temperaturas elevadas (MARTINS, 2015).

Além das micotoxinas mencionadas, a OTA e as fumonisinas, especialmente a FB1, apresentam grande importância no que diz respeito à ocorrência de micotoxinas em cereais, incluindo o trigo e são comumente citadas na literatura (ZEBIRI *et al.*, 2018; ROOHI *et al.*, 2012).

A ocorrência simultânea de micotoxinas também é frequente em cereais e produtos relacionados, sendo relatada em diversas regiões do mundo. O fato decorre da possibilidade de um alimento estar contaminado por vários fungos ao mesmo tempo, tais fungos, em sua maioria, são capazes de produzir múltiplos metabólitos simultaneamente.

A Tabela 2 expõe uma síntese geral de alguns resultados publicados em estudos que avaliaram a ocorrência de micotoxinas em trigo produzido em diferentes países. Os estudos selecionados contemplaram a avaliação de DON, ZEA, OTA e AFs.

Tabela 2- Ocorrência de micotoxinas em trigo produzido em diversos países.

Micotoxina	Local	Amostras positivas/ Total de amostras	Referência
DON	Sérvia	94/103	Stankovic et al. (2012)
	Brasil	64/65	Del Ponte et al. (2012)
	Áustria	95/166	Rodrigues & Naehrer (2012)
	China	615/672	Liu et al. (2016)
	China	27/30	Zhang et al. (2015)
	Brasil	55/100	Duffeck et al. (2017)
	Itália	28/47	Alkadri et al. (2014)
ZEA	Romênia	38/52	Alexa et al. (2013)
	Brasil	39/100	Duffeck et al. (2017)
	Brasil	48/150	Tralamazza et al. (2016)
	Malásia	6/20	Soleimany et al. (2012)
	Croácia	35/51	Pleadin et al.(2013)
OTA	Índia	29/50	Kumar et al. (2012)
	Síria	12/40	Alkadri et al. (2014)
	Romênia	33/52	Alexa et al. (2013)
	Malásia	40/100	Soleimany et al. (2012)
	Lituânia	8/8	Mankevičienė et al. (2014)
AFs	Catar	7/17	Ikuwari et al. (2022)
AFB ₁	Malásia	15/20	Soleimany et al. (2012)
	Egito	12/36	Hathout et al. (2020)
	Croácia	15/201	Pleadin et al.(2015)

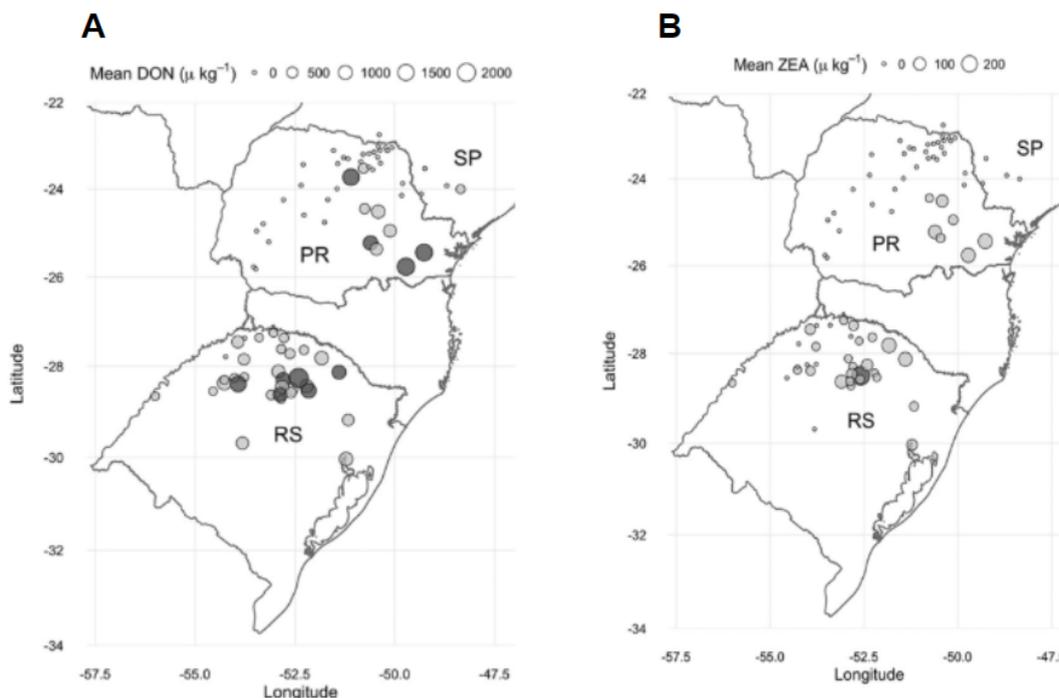
Fonte: Elaborado pelo autor.

No Brasil, Duffeck *et al.* (2017) estimou os níveis de DON, ZEA e OTA a partir da análise de 100 amostras de trigo coletadas em três estados brasileiros (Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo). Dois desses estados estão localizados na região sul, que concentra os maiores números de produção nacional, configurando uma

análise importante sobre o cenário brasileiro frente à contaminação por micotoxinas. Constatou-se que cerca de 55% das amostras estavam contaminadas por DON e 39% das amostras por ZEA, em níveis médios de 795,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 79,78 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Enquanto a OTA não foi detectada nas amostras. Os níveis de ambas as micotoxinas foram considerados seguros para consumo humano, uma vez que a legislação brasileira prevê limites de DON e ZEA em grãos de trigo para processamento de até 2000 e 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (BRASIL, 2022).

Abaixo estão retratadas as distribuições dos níveis de DON (Figura 2A) e ZEA (Figura 2B) analisados por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplado à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) em 78 municípios dos estados citados. Os círculos representam a localização geográfica dos municípios e o tamanho dos mesmos é proporcional aos níveis médios da micotoxina encontrada no local.

Figura 2 - Distribuição dos níveis de (A) Desoxinivalenol e (B) Zearalenona em amostras de trigo de 78 municípios brasileiros.



Fonte: DUFFECK *et al.* (2017).

4.3.4 Legislação e limites de tolerância de micotoxinas em trigo

O comércio internacional de commodities agrícolas, impulsionado pelo avanço da globalização, amplia a entrada de micotoxinas na cadeia alimentar e intensifica a necessidade de discussão sobre a harmonização legislativa (BRYDEN, 2012). Nesse sentido, muitos países têm buscado consolidar regulamentações com intuito de garantir controle sobre contaminação de micotoxinas na alimentação humana e animal. Em nível internacional, alguns órgãos são responsáveis por avaliar os riscos relacionados à contaminação e consequente exposição a estes compostos, são eles o Comitê Conjunto da FAO/WHO sobre Aditivos Alimentares (JECFA, *Joint Expert Committee on Food Additives*), a Organização para Agricultura e Alimentação (FAO, Food and Agriculture Organization) e o conselho científico da Organização Mundial da Saúde (WHO, World Health Organization), ambos vinculados à Organização das Nações Unidas (ONU).

A legislação considerada a mais rigorosa para micotoxinas em alimentos é seguida pela União Europeia desde 2006. A mesma estabelece que o limite máximo de DON em cereais é de 1250 µg/kg, enquanto para ZEA é de 100 µg/kg para grãos de cereais destinados ao consumo humano e animal. As aflatoxinas e OTA possuem limite máximo tolerável em cereais e produtos derivados de 4 µg/kg e 3 µg/kg, respectivamente (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

Os Estados Unidos contam com um limite máximo tolerado (LMT) de DON em grãos de trigo destinados ao consumo humano é de 1.000 µg/kg, enquanto no Canadá o LMT de DON é de 2.000 µg/kg (FDA, 2011; CANADÁ, 2020).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece limites máximos tolerados (LMT) para a presença de micotoxinas em alimentos a nível nacional por meio da Instrução Normativa nº 160 de 1 de julho de 2022. A fim de proteger a saúde dos consumidores, os limites estabelecidos pela ANVISA têm se tornado cada vez mais restritivos ao longo dos anos. A Tabela 3 apresenta as reduções gradativas dos LMTs estabelecidos para alimentos à base de trigo destinados ao consumo humano até o ano de 2022. O LMT estabelecido para DON em trigo não processado é de 2.000 µg/kg e para a ZEA é de 400 µg/kg. No caso da OTA e aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), esses limites são estabelecidos para a classe que compreende cereais para processamento e cereais e produtos de cereais, apresentando os valores de 20 µg/kg e 5 µg/kg respectivamente (BRASIL, 2022).

Tabela 3 - Limites máximos tolerados para alimentos à base de trigo.

Micotoxinas	Alimentos	LMT	LMT	LMT	LMT	LMT
		(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)
		2011	2012	2017	2019	2022
Desoxinivalenol (DON)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	200	200	200	200	200
	Trigo em grãos para posterior processamento	-	-	3000	3000	2000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral e farelo de trigo	-	2000	1250	1000	1250
	Produtos derivados de trigo: farinha, massa, crackers, biscoitos e pão	-	1750	1000	750	1000
Zearalenona (ZEA)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	20	20	20	20	20
	Trigo em grãos para posterior processamento	-	-	400	400	400
	Trigo integral, farinha de trigo integral e farelo de trigo	-	400	200	200	200
	Produtos derivados de trigo: farinha, massa, crackers, biscoitos e pão	-	200	100	100	100
Ocratoxina A (OTA)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	2	2	2	2	2
	Cereais e produtos derivados de cereais	10	10	10	10	10
	Cereais para posterior processamento	-	-	20	20	20
Aflatoxinas (AFLA) B1, B2, G1, G2	Cereais e produtos de cereais	5	5	5	5	5
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	1	1	1	1	1

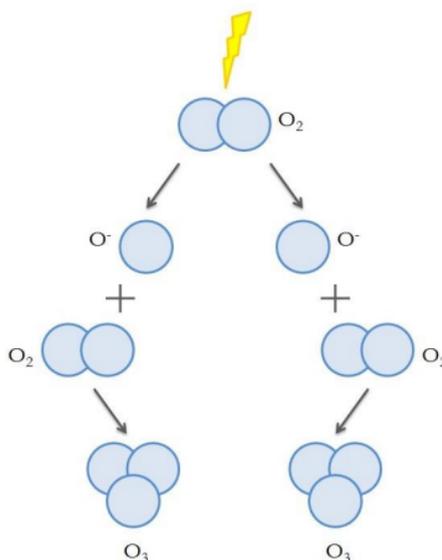
Fonte: ANVISA

4.4 O USO DO OZÔNIO EM ALIMENTOS

4.4.1 Ozônio

O ozônio (O_3) tem estrutura composta por três átomos de oxigênio, formada pela dissociação de moléculas de O_2 que produz radicais livres altamente reativos. Tais radicais interagem com as demais moléculas de oxigênio presentes e dão origem ao O_3 (Figura 3) (ALMEIDA *et al.*, 2004). A palavra “ozônio” é derivada do grego “ozein” que significa “aquilo que cheira”, ressaltando seu odor forte e característico, que pode ser percebido pelo olfato humano em concentrações que variam entre 0,002 e 0,004 ppm (KHADRE *et al.*, 2001; LAPOLLI *et al.*, 2003).

Figura 3 - Formação da molécula de ozônio.



Fonte: ALEXANDRE, 2018.

A substância é encontrada em estado líquido na temperatura de $-111,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sólido em $-192,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MAHAPATRA; MUTHUKUMARAPPAN; JULSON, 2005). Em temperatura ambiente o ozônio se mantém na forma de um gás instável que se degrada rapidamente, embora possua um tempo de meia-vida mais longo no estado

gasoso do que em solução aquosa. A solubilidade do ozônio em água é afetada diretamente pela temperatura, diminuindo conforme ocorre um aumento na temperatura (HILL, RICE, 1982). As propriedades físicas apresentadas na Tabela 4 validam a poderosa ação oxidante e o potencial de desinfecção do ozônio, que é capaz de destruir ligações duplas em compostos orgânicos e gerar produtos simples de baixo peso molecular (CHANDRAVARNAN; AGYEI; ALI, 2022).

Tabela 4 - Propriedades físicas do ozônio.

Propriedades Físicas	Valores
Ponto de ebulição	-111.9 °C
Densidade	2.14 kg/m ³
Entalpia de formação	144.7 kJ/mol
Ponto de fusão	-192.7°C
Peso molecular	47.9982 g/mol
Solubilidade em água	3 ppm (a 20°C)

Fonte: MAHAPATRA; MUTHUKUMARAPPAN; JULSON, 2005.

O uso de ozônio tem sido fortemente difundido para fins de descontaminação de alimentos como frutas e vegetais frescos, sucos, cereais e farinhas. A aplicação para sanitização e desinfecção de equipamentos utilizados nos processamento de alimentos, superfícies e materiais de embalagem também é considerada efetiva e segura (FREITAS-SILVA, VENANCIO, 2010).

Em relação a outros agentes oxidantes, o uso do ozônio apresenta a vantagem de ser reconhecido como uma “tecnologia ambientalmente amigável” no que diz respeito à sua produção e aplicação, uma vez que ele se dissocia no oxigênio e não deixa resíduos no alimento. Contudo, a característica de rápida dissociação está associada a grande instabilidade atribuída ao ozônio em estado gasoso (HOIGNÉ, 1998). Ainda na década de noventa, o composto foi reconhecido pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, US Food and Drug Administration) como uma substância segura (GRAS, do inglês: Generally Recognized as Safe) (FDA, 2001).

Na natureza, o ozônio é formado em níveis baixos na camada da estratosfera pela ação da radiação ultravioleta oriunda dos raios solares no oxigênio. Outra parcela pequena é gerada na troposfera, proveniente das reações fotoquímicas que

ocorrem entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio decorrentes da ação humana, vulcânica ou pelas florestas (KIM *et al.*, 1999).

4.4.2 Mecanismos químicos da ozonização

O processo de ozonização, responsável pela oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos depende de diversos fatores para que ocorra de forma eficaz. Dentre eles podem ser citados o tempo de exposição ao ozônio, a concentração, forma de aplicação, teor de umidade do alimento, entre outros (LI *et al.*, 2012).

As reações que envolvem a ozonização são variadas e podem ocorrer simultaneamente por dois mecanismos distintos. O processo pode se dar por reação indireta, em que a decomposição ocorre via reação em cadeia que resulta na produção de radicais livres hidroxila, ou por reação direta, através de reações seletivas com as substâncias presentes na matriz.

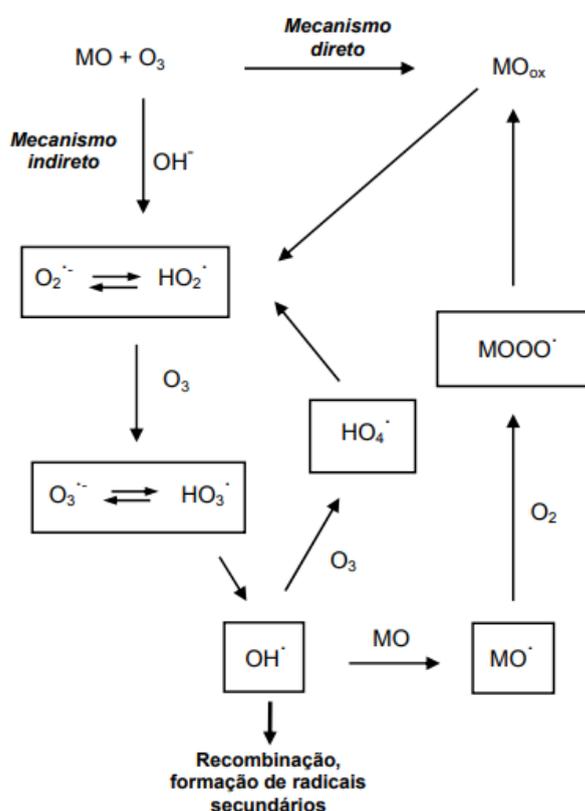
Na reação direta, o ozônio molecular pode atuar como um agente eletrofílico, nucleofílico ou como um dipolo em razão de sua estrutura molecular. Geralmente, o ozônio promove um ataque eletrofílico aos compostos com ligações duplas C=C, grupos funcionais específicos (OH, CH e OCH₃) e aqueles que contêm átomos com densidade de carga negativa (N, P, O e S) (CHIATTONE *et al.*, 2008; O'DONNELL *et al.*, 2012). A reação de oxidação que ocorre de forma direta é seletiva e, por isso, apresenta cinética mais lenta, com valores de variam entre 10⁻¹ e 10³ L mol⁻¹ s⁻¹ (GOTTSCHALK *et al.*, 2010). Os compostos aromáticos com grupos substituintes desativantes, como o cloro, apresentam reações de ozonólise mais lentas quando comparados aos ativantes, como é o caso das hidroxilas, enaltecendo as diferenças decorrentes das espécies envolvidas. Além disso, compostos orgânicos encontrados na forma dissociada tendem a reagir mais rapidamente com o ozônio do que formas neutras (MCMURRY, 2005; MAHMOUD, FREIRE, 2006).

A via de reação indireta do ozônio em meio aquoso resulta na desintegração da molécula de ozônio em radicais hidroxila (OH) com alto potencial de oxidação em razão da presença de elétrons desemparelhados na estrutura. O principal impulsionador da decomposição da molécula de ozônio é o ânion hidroxila (OH⁻), uma vez que a reação entre o O₃ e OH⁻ incita a ocorrência de uma série de outras

reações radicalares. Um processo de oxidação do ozônio que se dá através de reações indiretas pode ser muito complexo e levar à formação de várias espécies primárias altamente reativas (MAO, SMITH, 1995; GOTTSCHALK *et al.*, 2010).

O radical hidroxila reage utilizando três mecanismos: por meio da abstração de hidrogênio, transferência de elétrons e adição de radicais. A desinfecção ocorre essencialmente via ozônio molecular, enquanto a oxidação pode ocorrer também via radicais hidroxila (ALMEIDA *et al.*, 2004). A Figura 4 ilustra de forma simplificada os mecanismos de reação direto e indireto do ozônio com a matéria orgânica.

Figura 4 - Mecanismos de reação direto e indireto do ozônio com a matéria orgânica em meio aquoso (MO = matéria orgânica; MO_{ox} = matéria orgânica oxidada).



Fonte: GOTTSCHALK *et al.*, 2010.

4.4.3 Mecanismo de redução de microrganismos e micotoxinas através da ozonização

Em alimentos, o ozônio pode ser aplicado na forma de gás ou em meio aquoso. No armazenamento de grãos, o uso do gás é tratado como um método

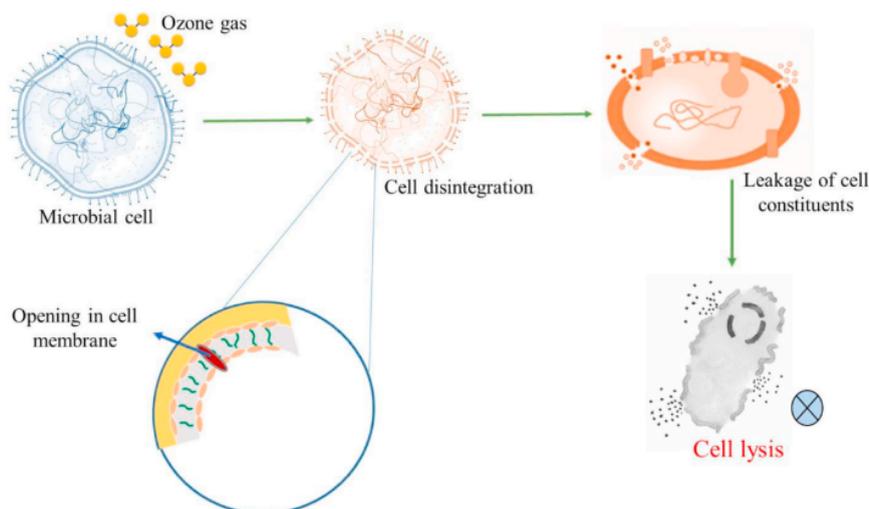
eficaz para desinfestação de insetos e pragas, controle de contaminação por fungos e micotoxinas (WANG *et al.*, 2016). Além disso, a injeção do gás permite que o ambiente se mantenha esterilizado, mesmo com oscilações de temperatura e umidade, não interferindo na qualidade dos grãos (CHIATTONE *et al.*, 2008). A produção de água ozonizada é destinada principalmente para uso em processos de higienização de frutas e hortaliças, bem como, em alguns cereais que necessitam de acondicionamento em alta umidade antes do processo de moagem (IBANOĞLU, 2001; COELHO *et al.*, 2015).

O ozônio é conhecido por sua atuação contra diversos microrganismos em cereais e produtos à base de cereais em função de suas propriedades antimicrobianas. Entre as microrganismos inativados podem ser citadas bactérias como coliformes e *Staphylococcus* e alguns gêneros de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Rhizopus* (DE ALENCAR *et al.*, 2012; SAVI, PIACENTINI; SCUSSEL, 2014).

Dois mecanismos principais estão envolvidos na inativação de microrganismos pelo ozônio. O primeiro trata-se da oxidação de grupos sulfidril e grupos de aminoácidos próprios das proteínas, peptídeos e enzimas presentes nos microrganismos e transformação em peptídeos menores. O segundo, envolve a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados em peróxidos ácidos (VICTORIN, 1992). A inativação envolve a ação do do ozônio frente a diversos constituintes da membrana e parede celular, bem como do conteúdo celular, a exemplo de algumas enzimas e ácidos nucleicos. A atividade do ozônio na membrana celular ocorre através da oxidação de glicolipídeos, glicoproteínas e enzimas, alterando a permeabilidade e conseqüentemente, facilitando a desintegração e a ocorrência da lise celular. Ao atuar no material nuclear dos microrganismos, o ozônio também é capaz de alterar as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos e provocar a destruição do DNA celular (SILVA, *et al.*, 2011; SCOTT, 1975). A Figura 5 ilustra um esquema simplificado da inativação microbiana por meio da ozonização.

Figura 5 - Esquema representativo da inativação de microrganismos através da ozonização.

Figura 5 - Esquema representativo da inativação de microrganismos através da ozonização.



Fonte: SIVARANJANI *et al.*, 2021.

Os estudos que analisaram o comportamento do composto frente aos esporos, sugerem que o ozônio inativa os esporos por meio da degradação dos componentes externos, que representam cerca de 50% do volume total da estrutura (KHADRE *et al.* 2001). Além disso, constatou-se que o ozônio não elimina os esporos através de danos no DNA, mas sim através intervenção na capacidade germinativa dos esporos (YOUNG, SETLOW, 2004).

No que diz respeito ao mecanismo de degradação de micotoxinas, ele baseia-se na reação do ozônio com os produtos das micotoxinas presentes na matriz, assumindo a formação posterior de produtos de baixo peso molecular e toxicidade reduzida (SIVARANJANI *et al.*, 2021). No caso das aflatoxinas AFB1 e AFG1, por exemplo, o O₃ reage através da ligação dupla C8-C9 do terminal dos anéis de furano por meio de ataque eletrofílico, gerando produtos intermediários. As moléculas de micotoxinas usualmente são convertidas em ácidos orgânicos, aldeídos e cetonas (MCKENZIE *et al.*, 1997). A sensibilidade das micotoxinas em relação ao uso do ozônio é variável, dependendo diretamente da estrutura e arranjo das moléculas. Algumas micotoxinas como a AFB2 e AFG2 não possuem dupla ligação no terminal do anel furano, tornando-as menos reativas e mais resistentes à ozonização (TROMBETE *et al.*, 2017; PORTO *et al.*, 2019).

O desencadeamento da decomposição de micotoxinas depende do teor de umidade do grão, da concentração de ozônio e do tempo de exposição. De acordo

com Qi *et al.* (2016), o aumento no teor de umidade da massa de grãos induz uma maior eficácia no tratamento, uma vez que a presença de umidade provoca a maior geração de íons reativos. Contudo, tal relação não pode ser generalizada, levando em consideração as particularidades e variações nas propriedades de superfície da matriz tratada (SIVARANJANI *et al.*, 2021). A temperatura também é considerada um fator relevante, visto que o tempo de meia-vida do ozônio é reduzido em altas temperaturas, o que ocasiona uma decomposição acelerada do composto na presença de oxigênio (MILLER *et al.*, 2013).

4.4.4 Legislação no Brasil e no mundo para uso de Ozônio em alimentos

A reivindicação por novas formas de processamento e conservação de alimentos, que produzam baixo impacto ambiental e promovam a preservação da saúde dos consumidores é uma realidade. A regulamentação de tais práticas por meio de legislações específicas é um mecanismo importante para incentivar a implementação de tecnologias nas indústrias de forma segura.

Comercialmente, o ozônio tem sido usado desde 1906 para o tratamento de água potável na França, mais precisamente na cidade de Nice (HILL, RICE, 1982). Contudo, a progressão do ponto de vista regulatório apresenta um histórico recente, especialmente para uso em alimentos.

Os Estados Unidos regulamentaram o uso de ozônio em alimentos como agente antimicrobiano no ano de 2001 por meio de emenda ao Regulamento de Aditivos Alimentares da FDA (Título 21 do Código de Regulamentos Federais, parte 173) (FDA, 2001). Autorizou-se a aplicação do ozônio na forma de gás ou dissolvido em água, indicando que seu uso pode fornecer pelo menos duas reduções logarítmicas nos níveis microbianos. A legislação não se refere aos limites máximos de ozônio permitidos, uma vez que o composto não deixa resíduos. Da mesma forma, o Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar (FSIS, *Food Safety and Inspection Service*), agência que pertence ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos declarou aceitável o uso do ozônio em produtos cárneos e avícolas através da Diretiva FSIS 7120.1 de 17 de fevereiro de 2002 (USDA, 2002).

A partir destas decisões o potencial e a funcionalidade do ozônio começaram a ser explorados pelas indústrias de processamento de alimentos nos EUA

(HAMPSON, 2001). Atualmente o ozônio tem sido empregado no país para fins de descontaminação de superfícies, materiais de embalagem, áreas de armazenamento de alimentos, desinfecção de águas, aumento de vida útil de produtos frescos, entre outros (MAHAPATRA *et al.*, 2005).

No que diz respeito a regulamentação de equipamentos, os fabricantes de máquinas geradoras de ozônio são obrigados a registrar os geradores junto ao US Environmental Protection Agency (EPA), recebendo um selo de registro que deve ser anexado a cada equipamento (O'DONNELL, 2012).

As legislações americanas servem de referência para diversos países, como é o caso do Canadá. O país permite que o ozônio seja usado na fabricação de vinhos e sidra na função de agente de maturação, bem como para tratamento e sanitização de água mineral ou de nascente, desde que respeite algumas condições como a que requer que o gerador não introduza ozônio no ar em um nível superior a 0,05 ppm (CANADA, 2007). A *Health Canada* permite o uso de água fracamente ozonizada para processamento de frutas e legumes frescos, desde que os níveis não ultrapassem o limite de 2 ppm. Além disso, as normas que regem os aditivos alimentares exigem que o ozônio adicionado seja relacionado na lista de ingredientes e no caso de água engarrafada, conste uma declaração na parte frontal do rótulo do produto indicando a aplicação (CANADA, 2022).

Na Austrália e Nova Zelândia não há restrições ao uso de ozônio desde que sejam seguidas as Boas Práticas de Fabricação. No Japão, o ozônio foi aprovado no processamento de alimentos ainda na década de 1990. Hoje, mais de 100.000 plantas de tratamento de alimentos usando ozônio estão instaladas no país (NAITO, TAKAHARA, 2006).

A União Europeia não conta com uma legislação específica para o uso de ozônio. Entretanto, as diretrizes impostas pela Diretiva 2000/13, que indica a necessidade da informação de tratamentos sofridos pelo produto no rótulo e o Regulamento de Novos Alimentos 258/97, que estabelece regras sobre a autorização de pré-comercialização para “novos alimentos” se aplicam ao uso do ozônio.

Ao redor do mundo, o desdobramento de ações regulatórias para o uso direto de ozônio no processamento de alimentos ainda está em progresso. Na maioria dos países, as empresas processadoras que almejam o uso da tecnologia de ozonização

devem consultar as agências reguladoras para apurar a presença de restrições regulatórias para o fim desejado.

No Brasil a aplicação direta do ozônio em alimentos está permitida para o tratamento de água por meio da Portaria n° 888, de 4 maio de 2021, que dispõe sobre controle e a potabilidade da água para consumo humano e também, para a desinfecção de produtos orgânicos mediante a IN 18, de 28 de maio de 2009. Para o tratamento da água, são estabelecidos parâmetros de concentração de ozônio e tempo de contato de 0,34 mg min/L para temperatura média de água igual a 15°C, a variar conforme a temperatura adotada. Enquanto para desinfecção de produtos orgânicos, não há limitação de uso (BRASIL, 2021; MAPA, 2009). As demais extensões devem ser requeridas junto à ANVISA.

Considerando todos os casos em que não há concentração limite para aplicação de ozônio em alimentos, conta-se com diretrizes estabelecidas pela 37ª Conferência Governamental Americana de Higienistas Industriais (ACGIH) que definiu o limite de 0,2 mg de O₃/m³ para uma exposição de 8h de trabalho/dia e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que recomenda 0,1 mg/m³ para um regime de 8h de trabalho/dia (FDA, 2014; WHO, 2006; TROMBETE, 2016).

4.5 O USO DO OZÔNIO PARA CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM TRIGO

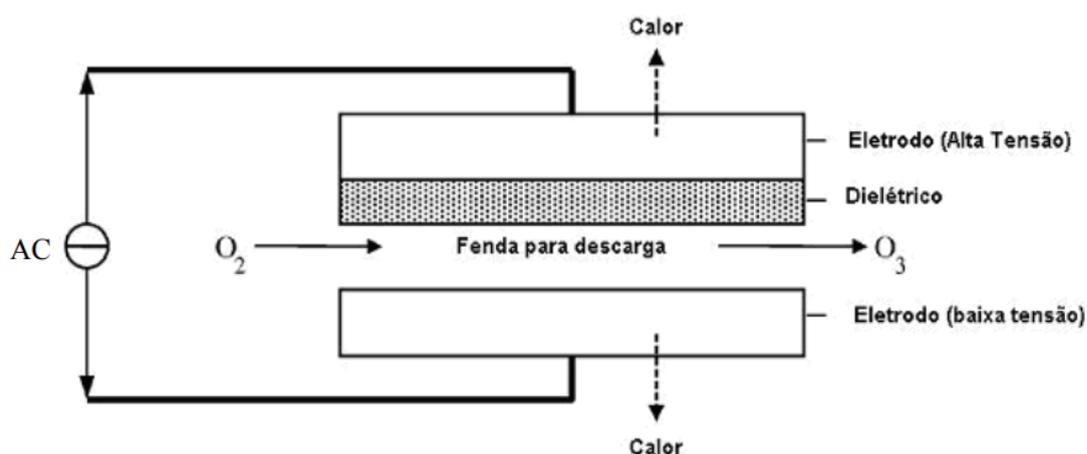
4.5.1 Produção industrial de Ozônio

A alta instabilidade e rápida dissociação do ozônio sugere que a geração e aplicação do composto seja realizada no mesmo local, estabelecendo a necessidade de uso imediato logo após a produção (RICE, NETZER, 1982). Na indústria alimentícia a geração do ozônio ocorre essencialmente por dois métodos. Um deles consiste na passagem de um gás com presença de moléculas de oxigênio através de uma fonte de radiação ultravioleta (UV), sendo conhecido por método fotoquímico. Enquanto no segundo método, as moléculas de oxigênio são submetidas a um campo elétrico de alta energia, dando origem à chamada descarga de corona (O'DONNELL *et al.*, 2012).

Embora sejam menos convencionais, outros métodos vêm sendo desenvolvidos para a produção de ozônio, entre eles é possível citar a eletrólise, radioquímica e a reação de fósforo elementar com água. Contudo, esses processos ainda não consolidaram todas as premissas necessárias para se tornarem economicamente viáveis no que tange a implementação no mercado processador de alimentos.

Para a maioria das aplicações do ozônio no processamento de alimentos, seja em pequena, média ou grande escala, a geração do composto ocorre através da descarga de corona (CARLINS *et al.*, 1982). A produção do ozônio via efeito corona pode envolver variadas tecnologias, mas todas apresentam princípios de operação semelhantes. A operação dos ozonizadores se baseia na passagem de um gás seco, livre de contaminantes, que contém oxigênio, através de um campo elétrico de alta energia estabelecido entre dois eletrodos. O ozonizador do tipo corona é geometricamente comparável a um capacitor, em que um eletrodo da estrutura serve como aterramento e o outro atua como meio dielétrico (portador de corrente) (Figura 6).

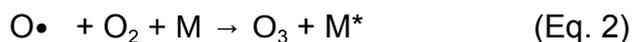
Figura 6- Princípio de geração de ozônio pelo método de descarga eletroquímica (efeito corona).



Fonte: CASTRO, 2010.

A aplicação de uma grande diferença de potencial provoca a passagem de elétrons entre os dois eletrodos e a energia é parcialmente absorvida pelas moléculas de oxigênio. As moléculas de oxigênio são forçadas a se separar, formando radicais de oxigênio atômico que podem se combinar com moléculas

intactas de oxigênio para produzir ozônio molecular O_3 (LANGLAIS *et al.*, 1991). A seguinte relação é capaz de representar de forma simplificada a produção de ozônio por meio de descarga de corona:



em que M simboliza uma molécula de gás inerte, que age para retirar o excesso de energia absorvido pelo ozônio logo após o encontro bimolecular. O processo se desencadeia quando elétrons livres de alta energia dissociam a molécula de oxigênio através de colisão e posteriormente, o ozônio se forma através de uma colisão em que o gás inerte absorve o excesso de energia gerado (BENSON, 1959; CASTRO, 2010).

A produção de ozônio através do método fotoquímico se baseia no mecanismo de dissociação de moléculas de oxigênio em seu estado fundamental (O_2) através da absorção de radiação eletromagnética pelos dois átomos de oxigênio. Em seguida, ocorre a reação entre o átomo dissociado de oxigênio e moléculas de oxigênio, originando as moléculas de ozônio (O_3) (GROTH, PHYS, 1937). A formação do ozônio nesse caso pode ser representada pelas seguintes reações:



em que $h\nu$ é a energia do fóton.

O espectro eletromagnético representa uma escala que mede as radiações emitidas em função do comprimento das ondas eletromagnéticas (λ). A luz UV apresenta comprimentos de onda menores do que os encontrados na faixa de luz visível, por isso, é considerada imperceptível aos olhos humanos. Para o processo de produção referido anteriormente, a energia envolvida corresponde a um

comprimento de onda de 185 nm, em que cada fóton absorvido produz dois radicais de oxigênio. É importante salientar que a aplicação de comprimentos de onda superiores são capazes de produzir outros resultados. O comprimento de 254 nm, por exemplo, apresenta capacidade de promover mudanças no DNA de microrganismos e impedir a reprodução dos mesmos (VORONOV, 2008).

As lâmpadas UV de mercúrio de baixa pressão são usadas tanto para a inativação direta de microrganismos e contaminantes quanto para a produção de ozônio. Entretanto, em comprimentos de onda ideais para inativação de microrganismos (254 nm), o efeito frente a produção de ozônio pode ser contrário, ocasionando a destruição das moléculas de O₃. Ainda assim, é muito comum que ocorra a produção de comprimentos de onda grandes o suficiente para promoção da fotólise do ozônio em paralelo a sua formação (GROTH, PHYS, 1937).

De acordo com O'Donnell *et al.* (2012), um sistema de ozonização completo consiste na presença das seguintes subunidades:

- concentrador de oxigênio ou tratamento de ar;
- gerador de ozônio;
- controlador de ozônio dissolvido com medidores de vácuo, pressão e vazão;
- injetor de ozônio/água, tanque de contato e saída de gás;
- bomba de reforço e linhas para entrada de água e saída de água contendo ozônio;
- quebra de vácuo para prevenção de refluxo.

A qualidade do gás que alimenta um gerador de ozônio pode ser um aspecto crítico, especialmente se a produção ocorrer através de descarga de corona. O ar atmosférico contém nitrogênio, vapor d' água, gases de hidrocarbonetos (provenientes da queima de combustíveis fósseis) e alguns contaminantes. Uma vez que o ozônio entra em contato com tais compostos, ele é capaz de reagir rapidamente, ocasionando a incrustação de superfícies dielétricas, diminuição do desempenho e consequente aumento da necessidade de manutenção do equipamento (O'DONNELL *et al.*, 2012).

Ao fim da produção, o ozônio pode ser aplicado ainda na fase gasosa diretamente no alimento a ser tratado, ou pode ser borbulhado em água, originando a água ozonizada. Ao ser borbulhado, o ozônio se dissolve parcialmente e forma radicais hidroxil (-OH) que são capazes de oxidar contaminantes com maior eficácia

do que ozônio em estado gasoso. Nessa situação, a principal variável de controle é a solubilidade parcial de ozônio em água, sendo ela influenciada por diversos parâmetros como temperatura, pH, força iônica, presença de substâncias facilmente oxidadas pelo ozônio e a auto decomposição do ozônio nas fases líquida e gasosa (TAKAHASHI *et al.*, 2007).

4.5.2 Efeito observado no controle de fungos e micotoxinas pela aplicação do ozônio em grãos de trigo

O desenvolvimento fúngico em grãos está relacionado a diversos fatores, que incluem condições climáticas, adoção de determinadas práticas de manejo, resistência da planta a ação de patógenos, tempo de inoculação e condições de armazenamento (EDWARDS, 2004). É constatado que no período pós-colheita, a secagem dos grãos e a manutenção de teores de umidade próximos a 14% são artifícios que ajudam na redução do crescimento de fungos e conseqüentemente, na produção de micotoxinas (MAGAN, ALDRED, 2007).

O ozônio contribui para o processo de secagem e sua adequada aplicação pode reduzir o tempo de secagem dos grãos em até 25%. A dispersão de ozônio através do processo de secagem pode não só inibir o desenvolvimento de fungos, como alterar a sua composição (TARUSHKIN *et al.*, 2001; RAILA *et al.*, 2006).

Segundo Raila *et al.* (2006), o êxito na desinfecção de grãos por meio da ozonização está interligado à concentração de ozônio aplicada, duração da exposição, altura do monte de grãos, teor de umidade e concentração de ozônio na saída. Ainda assim, outros fatores que devem ser levados em consideração são a intensidade de dispersão do ozônio e absorção pelos grãos, que dependem diretamente das propriedades dos produtos tratados (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999).

Mendez *et al.* (2003) indicou que a taxa de penetração de ozônio, quando aplicada a uma massa de grãos, não é constante. Quanto maior for a dispersão de fungos, mais lentamente o ozônio penetra nos grãos. A massa geralmente começa a ser ventilada pelas camadas inferiores, fazendo com que o conteúdo de umidade e a presença de microrganismos diminuam, e dessa forma, a absorção do ozônio pelas camadas superiores se inicie. A absorção é maior nas camadas superiores da

massa de grãos, é influenciada também pela velocidade de ar fornecido e temperatura observada (ZVICEVICIUS *et al.*, 2005).

A destruição de fungos presentes na superfície do grão pelo ozônio é mais eficaz em presença de teores de umidade superiores à 14%, uma vez que maiores teores de umidade induzem maior atividade de água no grão. A presença de água livre pode potencialmente aumentar a decomposição do ozônio e acarretar na formação de radicais oxidantes aptos a reagir rapidamente com compostos orgânicos, tais como aminoácidos presentes nas proteínas, enzimas e peptídeos do microrganismo e também com as micotoxinas produzidas (KHADRE *et al.*, 2001).

Nesse caso, condições de alta umidade e calor, prejudiciais aos grãos por favorecerem o desenvolvimento de microrganismos, acabam aumentando o efeito fungicida do ozônio. Wu *et al.* (2006) investigaram a eficácia do ozônio gasoso na inativação de esporos fúngicos associados ao trigo sob diversas condições de operação. A aplicação de ozônio em condições de 330 ppm durante 5 minutos foi suficiente para inativar 96,9% dos esporos em grãos de trigo com teor de umidade de aproximadamente 22%. A Tabela 5 compara os resultados apresentados por Wu *et al.* (2006) para redução de esporos sob diferentes condições de umidade e temperatura.

Tabela 5 - Percentual de sobrevivência de esporos em razão da umidade e temperatura em grãos de trigo.

Condições de ozonização (Temperatura, umidade do grão)		% de sobrevivência de esporos	
		T	T +30
20 ° C	16,10%	30,1	26,5
20 ° C	19,30%	9,2	5,2
20 ° C	21,90%	3,1	0
10 ° C	16,10%	38,9	n.d
40 ° C	16,10%	9,7	n.d

n.d - não determinado

Fonte: WU *et al.*, 2006.

A Tabela 6 apresenta uma compilação de estudos realizados sobre a redução de fungos toxigênicos em trigo a partir do uso do ozônio em diferentes condições de tratamento:

Tabela 6- Efeitos do tratamento com ozônio sobre os níveis de fungos em trigo.

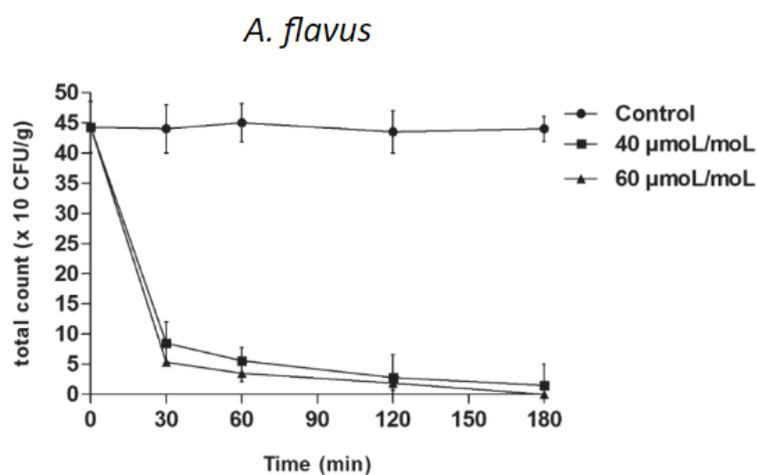
Fungo	Condições	Nível de Redução	Referência
<i>Fusarium graminearum</i>	60 $\mu\text{mol/mol}$ por 30 min	91,8% de esporos viáveis	Savi et al. (2014)
<i>Aspergillus flavus</i>	40 mg/L por 20 min	95.6%	Savi, Piacentini e Scussel (2014)
	60 $\mu\text{mol/mol}$ por 180 min	100%	
	60 $\mu\text{mol/mol}$ por 30 min	87.8%	
<i>Penicillium citrinum</i>	60 $\mu\text{mol/mol}$ por 30 min	73.4%	Savi, Piacentini e Scussel (2014)
	60 $\mu\text{mol/mol}$ por 180 min	100%	
<i>Aspergillus</i> spp.	60 mg/L por 300 min	100%	Trombete et al. (2017)
<i>Fusarium</i> spp.	60 mg/L por 300 min	100%	Trombete et al. (2017)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Savi, Piacentini e Scussel (2014) avaliaram o tempo de exposição e as condições de tratamento para reduzir a contagem de *A. flavus* em grãos de trigo. O estudo relatou que o crescimento do fungo foi significativamente reduzido após 30 minutos de exposição ao O_3 em concentrações de 40 e 60 $\mu\text{mol/mol}$. Em relação ao grupo controle (44×10^1 UFC/g), ocorreu inibição de esporos em níveis de 80,7 e 87,8% pelo uso de ozônio nas concentrações de 40 e 60 $\mu\text{mol/mol}$ reduzindo a contaminação para $8,5 \times 10^1$ e $5,35 \times 10^1$ UFC/g, respectivamente. Contudo, após 180 minutos apenas a exposição ao O_3 a 60 $\mu\text{mol/mol}$ inibiu totalmente o crescimento de *A. flavus* (Figura 7). O fungo apresentou um comportamento resistente ao tratamento mas os resultados demonstraram que a exposição ao O_3 reduziu a germinação de conídios, causou a morte de hifas e alterações morfológicas paralelas.

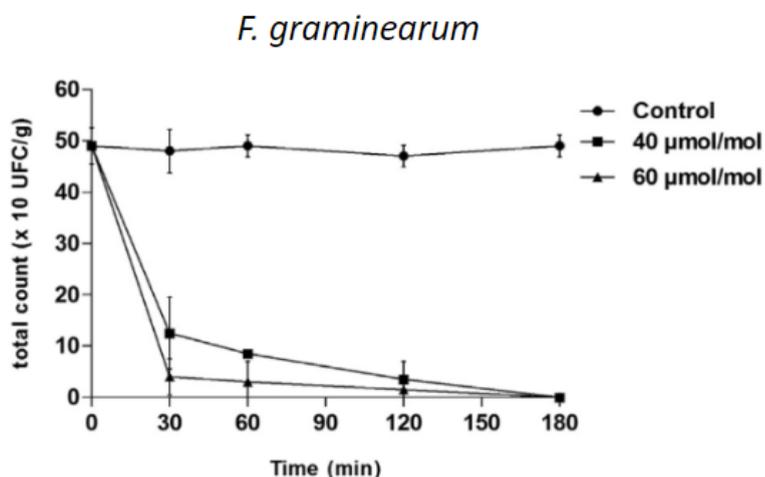
Savi *et al.* (2014) relataram a redução significativa de *F. graminearum* em grãos de trigo após 30 minutos de exposição ao O₃ em concentrações de 40 e 60 µmol/mol. Os níveis de redução de esporos viáveis chegaram a 74,5% e 91,8% pela aplicação do tratamento nas respectivas concentrações, chegando a 12,5×10¹ e 4×10¹ UFC/g. Após 180 minutos de exposição ao O₃ não foi relatado crescimento de *F. graminearum* nas placas de teste em ambas concentrações (Figura 8).

Figura 7- Efeito do gás ozônio no crescimento de *A. flavus* em diferentes concentrações e tempos de exposição (40 e 60 umol/mol; 30–180 min).



Fonte: SAVI; PIACENTINI; SCUSSEL, 2014.

Figura 8- Efeito do gás ozônio no crescimento de *F. graminearum* em diferentes concentrações e tempos de exposição (40 e 60 umol/mol; 30–180 min).



Fonte: SAVI *et al.*, 2014.

Trombete *et al.* (2017) avaliaram a redução da contagem total de *Fusarium spp.* e *Aspergillus spp.* em grãos de trigo por meio da ozonização. O experimento foi realizado a partir de um design fatorial 2^3 , com combinações de três variáveis independentes: concentração de ozônio, tempo de exposição e massa de grãos. As maiores reduções ocorreram em condições de tratamento que despenderam alta concentração de O_3 , longo tempo de exposição e baixa massa de grãos. A maior redução foi verificada após a aplicação de 60 mg/L de O_3 por 300 minutos, gerando decréscimos de 3,0 e 3,1 log nas contagens de *Fusarium spp.* e *Aspergillus spp.*, respectivamente.

A redução das concentrações de micotoxinas em trigo tem sido avaliada tanto em amostras naturalmente contaminadas (LI; GUAN; BIAN, 2014; WANG *et al.*, 2016) quanto naquelas contaminadas artificialmente por meio de padrões de micotoxinas (SAVI *et al.*, 2014; TROMBETE *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2016). É importante ressaltar as diferenças que existem entre ambas, uma vez que as amostras naturalmente contaminadas refletem as condições reais de distribuição das micotoxinas na produção de grãos. A contaminação artificial ocorre através do contato do grão com solução que contém padrão da micotoxina ou pela inoculação dos esporos de fungos toxigênicos, concentrando as toxinas majoritariamente nas camadas externas. A ocorrência natural de fungos e micotoxinas ocorre nas camadas mais externas, em concentrações bem superiores, e também se distribuem ao longo do conteúdo do grão (LEE *et al.*, 1987).

A Tabela 7 apresenta um compilado de resultados relatados por estudos que abordam a redução de micotoxinas em trigo.

Tabela 7- Efeitos do tratamento com ozônio sobre os níveis de micotoxinas em trigo.

Micotoxina	Condições	Nível de Redução	Referência
DON	60 μ mol/mol por 180 min	100%	Savi et al. (2014)
	75 mg/L por 90 min	53,48%	Wang et al. (2016)
	100 mg/L por 60 min	78,66%	Wang et al. (2016)

	60 mg/L por 300 min	64,30%	Trombete et al. (2017)
	60 mg/L por 12 h	57,30%	Li, Guan e Bian (2014)
	80 mg/L por 10 min	74,86%	Sun et al. (2016)
AFB1	20 mg/L por 20 min	86,70%	El-Desouky et al. (2012)
	40 mg/L por 20 min	96,66%	El-Desouky et al. (2012)
	60 µmol/mol por 180 min	94,60%	Savi, Piacentini e Scussel (2014)
	60 mg/L por 300 min	63,20%	Trombete et al. (2017)
AFG1	60 mg/L por 300 min	54,40%	Trombete et al. (2017)
	60 µmol/mol por 180 min	80,00%	Savi, Piacentini e Scussel (2014)
AFB2	60 mg/L por 300 min	34,00%	Trombete et al. (2017)
	60 µmol/mol por 180 min	84,50%	Savi, Piacentini e Scussel (2014)
AFG2	60 µmol/mol por 180 min	81,00%	Savi, Piacentini e Scussel (2014)
	60 mg/L por 300 min	40,30%	Trombete et al. (2017)
AFs (Aflatoxinas totais)	60 mg/L por 300 min	48,00%	Trombete et al. (2017)

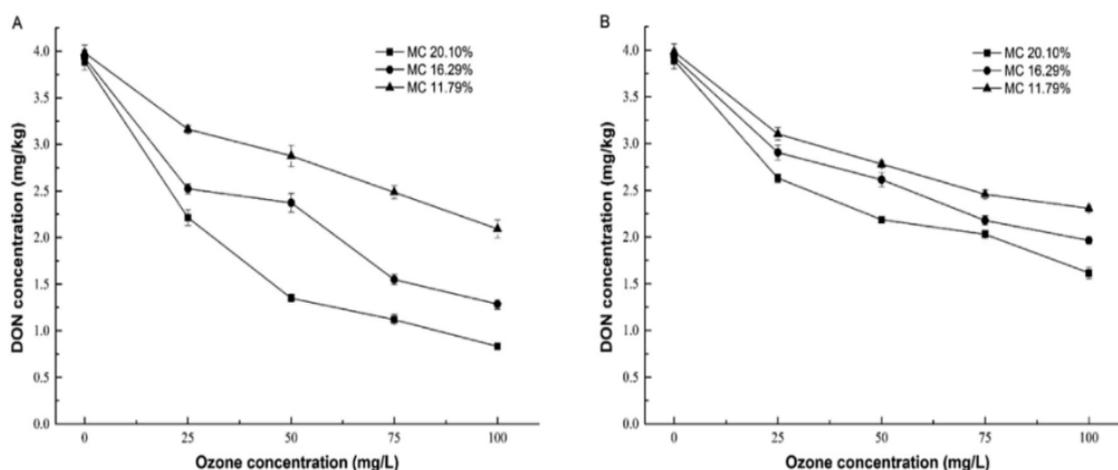
Fonte: Elaborado pelo autor.

Wang *et al.* (2016) avaliaram a redução de DON em grãos de trigo e farinha de trigo integral contendo diferentes teores de umidade por meio da aplicação de ozônio. O teor primário de DON no trigo avaliado foi de 3,98, 3,93 e 3,89 mg/kg com teores de umidade de 11,79%, 16,29% e 20,10%, respectivamente. Amostras de trigo com os maiores teores de umidade apresentaram as maiores reduções de DON, demonstrando ser um fator crítico para a degradação da micotoxina. Nessa situação, o aumento de umidade para 20,10% ocasionou uma queda na concentração de DON para 2,27 mg/kg, representando uma redução de 58,35% no conteúdo de DON. De forma análoga, a menor reação entre o ozônio aplicado e a farinha de trigo integral ocorreu na presença do menor conteúdo de umidade

(11,79%). Sob as mesmas condições de tratamento, a redução da micotoxina em grãos de trigo foi inferior quando comparada a farinha de trigo integral.

Inicialmente acreditava-se que a má distribuição da umidade nas amostras poderia resultar na coagulação da farinha, limitando a ação do ozônio. Contudo, constatou-se que a moagem pode liberar DON aderido no interior dos grãos, ocasionando maior exposição da micotoxina. Além disso, a porosidade dos grânulos e o efeito sinérgico entre a exposição das micotoxinas pela moagem e a aplicação do ozônio poderiam favorecer a redução de DON. O comportamento do ozônio frente a diferentes teores de umidade em grãos de trigo e farinha de trigo está representado pelas figuras 9A e B, respectivamente.

Figura 9 - Efeito do tratamento com ozônio sobre os níveis de DON em (A) grãos de trigo e (B) farinha de trigo com diferentes teores de umidade.

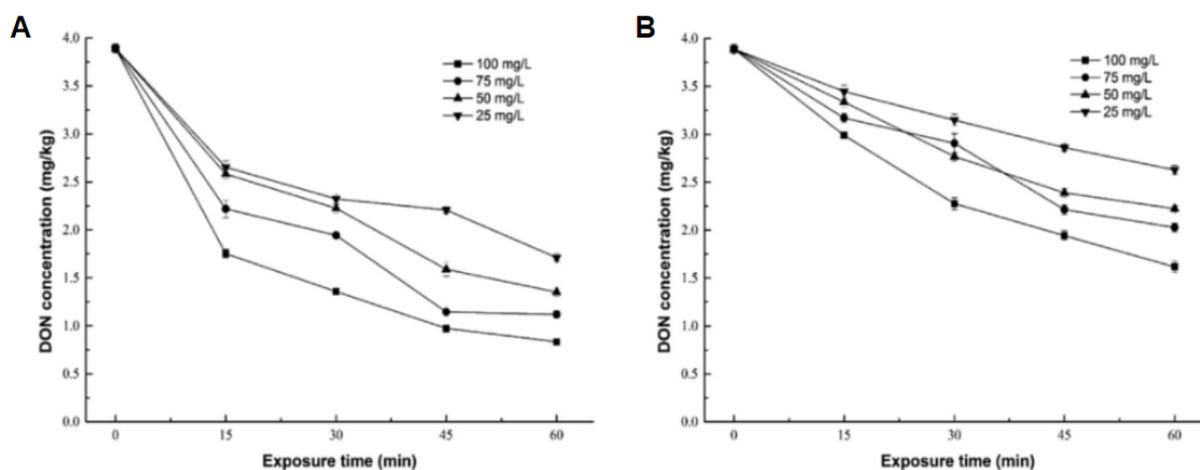


Fonte: WANG *et al.*, 2016.

Wang *et al.* (2016) também avaliaram o efeito do tempo de exposição ao tratamento com ozônio. Uma exposição ao ozônio em concentração de 100 mg/L por 60 minutos proporcionou uma taxa de degradação de DON de 78,66% em farinha de trigo integral, a maior redução entre todas as condições avaliadas. Enquanto a exposição ao ozônio por 45 minutos reduziu em aproximadamente 75% os níveis iniciais de DON, gerando uma estreita diferença. No caso dos grãos de trigo sob exposição a 100 mg/L de ozônio durante 60 minutos, a redução foi de cerca de 58,3%, indicando que a DON é mais facilmente degradada em farinha de trigo integral do que em grãos de trigo. Esse fato pode ser atribuído a diferenças entre

propriedades das matrizes e a taxa de fluxo de oxigênio. A figura 10 expõe as diferenças relatadas pela exposição ao ozônio durante diferentes tempos.

Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição sobre os níveis de DON em (A) grãos de trigo e (B) farinha de trigo.



Fonte: WANG *et al.*, 2016.

Savi, Piacentini e Scussel (2014) constataram que o tratamento com 60 $\mu\text{mol/mol}$ por 180 minutos foi capaz de reduzir os níveis de AFLs de maneira significativa. Em comparação com o grupo controle, AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 apresentaram reduções nos níveis de contaminação de 94,6, 84,5, 80,0 e 81,0%, respectivamente. Em concentração de O_3 inferior (40 $\mu\text{mol/mol}$) durante o mesmo tempo de exposição, apenas AFB1 e AFB2 reduziram significativamente, partindo de 94,6 e 84,5 $\mu\text{g/kg}$ para 43,78 e 68,79 $\mu\text{g/kg}$, apresentando reduções de 88,6 e 74,8%, nesta ordem. Entre as AFLs, AFB1 e AFB2 apresentaram os melhores resultados em relação ao tratamento nas duas concentrações (40 e 60 $\mu\text{mol/mol}$), apresentando reduções importantes mesmo após 30 minutos de exposição. Relatou-se que a aplicação do O_3 em ambas as concentrações não provocou alterações em diversos atributos relacionados a qualidade dos grãos de trigo, com a oxidação isolada do amido, peroxidação lipídica, perfil de proteína total e germinação de sementes.

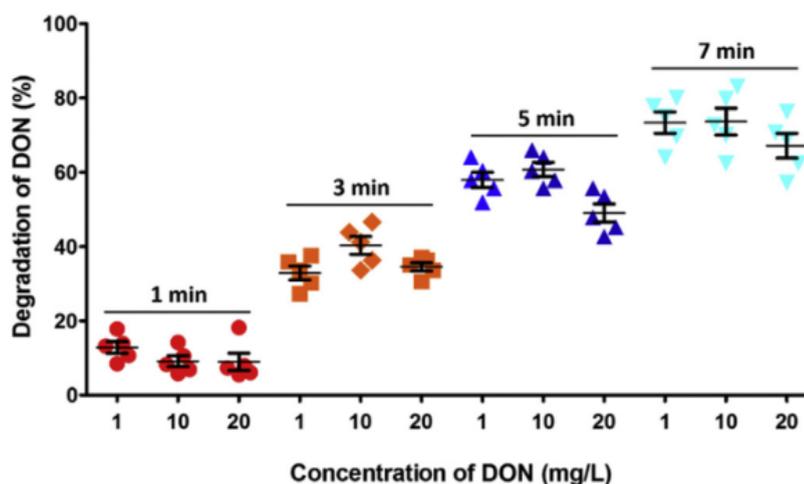
Para Trombete *et al.* (2017), as reduções mais expressivas de DON e aflatoxinas totais em trigo ocorreram em tratamentos que despenderam as maiores concentrações de O_3 , em geral cerca de 60 mg/L de O_3 . Foram testadas as

concentrações de 10, 35 e 60 mg/L em tempos de exposição de 120, 210 e 300 minutos. As quedas chegaram a 64,3% e 48,0% para DON e AFs, respectivamente, pela exposição a 60 mg/L de ozônio por 300 minutos. Entre as quatro aflatoxinas contempladas pelo estudo (AFG1, AFB1, AFG2 e AFB2), a AFB2 foi a menos influenciada pela ozonização em todas as condições de tratamento, sua melhor resposta de redução correspondeu a 34%, em condição intensa de 60 mg/L de O₃ por 300 minutos. Relatou-se que as variáveis que mais influenciaram nas reduções dos níveis de micotoxinas foram a concentração de O₃, seguida pelo tempo de exposição. A variável massa de grãos teve uma influência negativa nas reduções, especialmente em AFs sob uma baixa concentração de O₃ (10 mg/L) e curto tempo de exposição (120 min), contudo, tal influência não foi estatisticamente significativa. Steponavičius *et al.* (2012) já haviam descrito sobre a importância da variável massa de grãos para ozonização, confirmando que a concentração de O₃ diminui com o aumento da altura do monte de grãos, de acordo com uma relação exponencial e justificando a influência negativa na redução de micotoxinas.

De acordo com Savi *et al.* (2014), a ação de O₃ frente a redução dos níveis de DON em grãos de trigo demonstrou-se eficiente pela aplicação de 60 µmol/mol por 180 minutos. A contaminação por DON foi reduzida até o limite de detecção e avaliada em duas partes diferentes do grão, o pericarpo e o endosperma. O tratamento não produziu alterações nas características físicas e bioquímicas dos grãos de trigo integral.

Sun *et al.* (2016) analisou a taxa de degradação de DON, sua detoxificação e aparecimento de subprodutos pelo uso de ozônio aquoso saturado em grãos contaminados, entre eles os grãos de trigo. Ozônio em uma concentração de 80 mg/L foi aplicado aos grãos enquanto as concentrações dos padrões de DON variaram entre 1,0 mg/L e 20 mg/L. A reação com ozônio causou a rápida degradação da micotoxina, que inicialmente ocorreu de forma mais acelerada em situação de baixas concentrações. O trabalho indicou que o tempo de tratamento prolongado ocasiona aumento na taxa de degradação da micotoxina, como pode ser observado no gráfico abaixo, oriundo da aplicação de 80 mg/L de ozônio em diferentes intervalos de tempo (Figura 11).

Figura 11- Efeitos da aplicação de ozônio em concentração de 80 mg/L e diferentes tempos de exposição na degradação do padrão de DON.



Fonte: SUN *et al.*, 2016.

Observou-se que nas mesmas condições de tratamento, quanto menores as razões sólido-líquido, mais rápido ocorreu a degradação da DON no trigo. Do mesmo modo, a degradação aumenta ao passo que ocorre aumento na concentração de ozônio e tempo de exposição. Por meio de aplicação de ozônio a 80 mg/L durante 10 minutos a temperatura ambiente, ocorreu redução de 74,86% no conteúdo de DON presente no trigo, passando de 2,18 mg/kg para 0,55 mg/kg (SUN *et al.*, 2016).

Sun *et al.* (2020) analisaram possíveis produtos de degradação de DON originados pela aplicação de ozônio aquoso em grãos de trigo contaminados artificialmente. Os resultados demonstraram que dois produtos de degradação surgiram em poucos minutos após a aplicação de ozônio sob baixas concentrações (10 mg/L). Após 48 horas os produtos desapareceram completamente. A molécula de DON pode ter sido submetida à abertura do anel de ligação dupla carbono-carbono, tendo a destruição da estrutura do fragmento alavancada pela energia por ozonização.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação de cereais por micotoxinas é uma realidade que ainda apresenta dificuldades de enfrentamento em razão da falta de soluções seguras e diretas para controle nos períodos pré e pós-colheita e, pela crescente demanda por métodos eficientes que atuem sem deixar resíduos químicos nos alimentos. A ozonização surge como uma tecnologia emergente não térmica capaz de agir sobre diferentes matrizes alimentícias, degradando compostos e mitigando efeitos de toxicidade.

Neste trabalho, dados publicados na literatura sobre a ocorrência de fungos toxigênicos e micotoxinas em trigo foram apresentados, bem como, resultados relacionados aos efeitos da aplicação da tecnologia de ozonização sobre a redução desses níveis em grãos de trigo.

O ozônio se mostrou eficiente para fins de descontaminação, alcançando níveis de redução superiores a 90% para fungos e micotoxinas e assegurando concentrações finais abaixo dos limites máximos regulamentados pela legislação brasileira. Entre as variáveis que mais influenciam no êxito do tratamento frente à degradação de micotoxinas e reduções na contagem de fungos, pode ser citada, primeiramente, a concentração de O_3 , seguida pelo tempo de exposição e tamanho da massa de grãos. Quanto maiores as concentrações de ozônio aplicadas aliadas a um longo tempo de contato, maior será a interação do ozônio com a massa de grãos e conseqüentemente, maiores serão as reduções. A massa de grãos é uma variável crítica, uma vez que a concentração de O_3 diminui com o aumento da altura massa. Da mesma forma, constatou-se que teores de umidade de grãos mais elevados favorecem o efeito fungicida do ozônio devido a formação de radicais hidroxil.

Portanto, a ozonização é um método promissor para controle de fungos e micotoxinas em trigo. Contudo, o trabalho não se aprofundou na caracterização de produtos de degradação das micotoxinas formados durante o tratamento. Para abordagem deste tópico e dos possíveis efeitos dos compostos formados sobre a saúde humana e animal são necessários mais estudos que contemplem análises toxicológicas *in vivo* e *in vitro*.

Cabe salientar que a qualidade sensorial final e o conteúdo nutricional dos grãos são afetados em níveis quase insignificantes pela aplicação do ozônio. São percebidas alterações de cor nos grãos e inativação de algumas enzimas, podendo esses efeitos serem reduzidos pela otimização do processo. Entretanto, os custos voltados para implantação de geradores de ozônio são elevados, especialmente no que tange a extensão de instalações de armazenamento de grãos, representando uma barreira para disseminação da tecnologia.

Desse modo, ainda são necessárias melhorias no processo de geração e aplicação do ozônio, a fim de tornar a implementação mais tangível em escala industrial e a aplicação mais segura através da definição de parâmetros de controle específicos.

REFERÊNCIAS

ABITRIGO. **Associação Brasileira da Indústria do Trigo**. Pesquisa de Moagem de Trigo. 2021. Disponível em: <<https://www.abitrigo.com.br/moagem-de-trigo-apresenta-estabilidade-no-brasil-em-2021/>>. Acesso em 5 de julho de 2022.

AGRIOPOULOU, S.; STAMATELOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. **Foods**, v. 9, issue 2, p. 1-50, 2020.

ALEXA, E.; DEHELEAN, C. A.; POIANA, M. A.; RADULOV, I.; CIMPEAN, A. M. The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake. **Chemistry Central Journal**, Romênia, v. 7, n. 99, p. 1-11, junho 2013.

ALEXANDRE, A. P. S. Ozone technology as an alternative for reducing mycotoxin contamination in wheat products. **Tese (Doutorado)** - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Piracicaba, 2018.

ALKADRI, D.; RUBERT, J.; PRODI, A.; PISI, A.; MAÑES, J.; SOLER, C. Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. **Food Chemistry**. v. 157, p. 111-118, 2014.

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

ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14,6 632, 2017.

ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120-126, 2016.

BAYMAN, P., BAKER, J.L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia** v. 162, p. 215–223, 2006.

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

BENSON, S. W. Ozone chemistry and technology. **American Chemical Society**, Califórnia, v. 21, p. 405-409, 1959. (Advances in Chemistry Series, n. 21).

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C. Toxins of filamentous fungi. **Chem. Immunol.**, v.81, p. 167–206. 2002.

BOEVRE, M. *et al.* Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, p. 207–219. 2012.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União: seção 1, n. 37, p. 72, 21 ago. 2011. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html> Acesso em: 10 de setembro de 2022.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 138, de 08 de fevereiro de 2017**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. Diário Oficial da União: seção 1, n. 29, p. 45, 09 fev. 2017. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0138_08_02_2017.pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 19 de 28 de maio de 2009**. Aprova os mecanismos de controle e informação da qualidade orgânica e aprova os formulários oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF, nº.101, 29 maio 2009. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-19-de-28-de-maio-de-2009-mecanismos-de-controle-e-formas-de-organizacao.pdf/view>>. Acesso em: 11 de agosto de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 888, de 04 de maio de 2021**. Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>> Acesso em: 11 de agosto de 2022.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa IN nº 160, de 1º de julho de 2022**. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial da União: seção 1, n. 126, p. 227, 06 jul. 2022. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-160-de-1-de-julho-de-2022-41336708>> Acesso em: 17 de agosto de 2022.

BRYDEN, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 134-158, 2012.

CANADA. Health Canada. **Canadian Standards (Maximum Levels) for various chemical Contaminants in Foods**, 2020. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/maximum-levels-chemical-contaminants-foods.html>>. Acesso em: 17 de agosto de 2022.

CANADA. Health Canada. **Food and Drug Regulations (C.R.C., c. 870)**, Division 16 - Food Additives. 2022. Disponível em:

<https://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,_c._870.pdf>. Acesso em: 17 de agosto de 2022.

CANADA. Health Canada. **Proposed Regulations for Intentional Ozone Generators**, 2007. Disponível em:

<<http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/legislation/consultation/ozone-eng.php>>. Acesso em: 17 de agosto de 2022.

CARLINS, J. J.; CLARK, R. G. Ozone generation by corona discharge IN: **Handbook of ozone technology and applications**. Ann Arbor Science, Michigan, v. 1, p. 41-75, 1982.

CASTRO, F. D. Degradação do Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D) com ozônio eletrogerado, **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2010.

CHANDRAVARNAN, P.; AGYEI, D.; ALI, A. Green and sustainable technologies for the decontamination of fungi and mycotoxins in rice: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 124, p. 278-295, 2022.

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

CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p. 341-349, 2008.

COELHO, C. C. S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.4, p.369-375, 2015.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **A cultura do trigo**. Brasília: Conab, 2017. Disponível em:

<https://www.conab.gov.br/uploads/arquivos/17_04_25_11_40_00_a_cultura_do_trigo_versao_digital_final.pdf>. Acesso em: 14 de junho de 2022.

DE ALENCAR, E. *et al.* 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, 2011.

DEL PONTE, E. M. *et al.* GIBERELA DO TRIGO: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E MODELOS DE PREVISÃO. **Fitopatol. bras.** 29(6), 2004.

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

DUFFECK, M. R.; TIBOLA, C. S.; GUARIENTI, E. M.; DEL PONTE, E. M. Survey of mycotoxins in Southern Brazilian wheat and evaluation of immunoassay methods. **Scientia Agrícola**, v. 74, n. 4, p. 343-348, 2017.

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

EFSA. Mycotoxins. **European Food Safety Authority Journal**. 2012.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. **European Food Safety Authority Journal**, v. 4, issue 6, p. 1-56, 2006.

EL-DESOUKY, T. A.; SHAROBA, A. M. A.; EL-DESOUKY, A. I.; EL-MANSY, H. A.; NAGUIB, K. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B1 and *aspergillus flavus* fungal. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 2, p. 128, 2012.

ESKOLA, M. *et al.* Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, p. 2773-2789, 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) 401/2006. **Official Journal of the European Union**, L 70, n. 12, 2006.

FAO. 2021. World Food and Agriculture Statistical Yearbook 2021. Rome. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb4477en/cb4477en.pdf>> Acesso em: 18 de junho de 2022.

FDA. **Mycotoxin Regulatory Guidance**. A guide for grain elevators, feed manufacturers, grain processors and exporters. 2011. Disponível em: <<https://www.aflatoxinpartnership.org/wp-content/uploads/2021/05/NGFAComplianceGuide-FDARegulatoryGuidanceforMycotoxins8-2011.pdf>>. Acesso em: 21 de julho de 2022.

FDA. **Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption**. Federal Register, v.66, n.123, p.33829-33830, 2001. Disponível em: <<https://www.federalregister.gov/documents/2001/06/26/01-15963/secondary-direct-food-additives-permitted-in-food-for-human-consumption>>. Acesso em: 21 de julho de 2022.

FDA. Food and Drug Administration. Sec. Title 21. 801.415. Maximum acceptable level of ozone. Code of Federal Regulations, 8, 2014. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=801.415>>. Acesso em: 8 de agosto de 2022.

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

FDA. **Hazard analysis and critical point (HACCP)**: procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule, Federal Register, v. 66, p. 6137–6202, 2001. Disponível em: <<https://www.federalregister.gov/documents/2001/01/19/01-1291/hazard-analysis-an>

d-critical-control-point-haccp-procedures-for-the-safe-and-sanitary-processing-and>. Acesso em: 8 de agosto de 2022.

FUNG, F.; CLARK, R. F. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. **J Toxicol Clin Toxicol**, 42, n. 2, p. 217-234, 2004.

HATHOUT, A. S., ABEL-FATTAH, S. M., ABOU-SREE, Y. H., FOUZY, A. S. M. . Incidence and exposure assessment of aflatoxins and ochratoxin A in Egyptian wheat. **Toxicology Reports**, 2020.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, A. J.; SAUPE, A.; Ozonation of water and waste water, **Wiley-Vch**: Weinheim, 2010.

GROTH, W.; PHYS, Z. **Chemosphere**, v. 37, p.307,1937.

HAMPSON, B.C. **Emerging technology**: ozone. Presented at the IFT Annual Meeting, New Orleans, LA, 2001.

HILL, A. G.; RICE, R. G. Historical background, properties and applications, in Rice, R. G. and Netzer, A. (eds) **Handbook of Ozone Technology and Applications**, Vol. 1, Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, p. 1-37, (1982)

HOIGNÉ, J. Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. In: Hrubec, J. (Ed.), **Quality and Treatment of Drinking Water II**. Springer-Verlag, Berlin, p. 83–141, 1998.

HUSSEIN, H. S.; Brasel, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animal. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-127. 2020. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2020/06/QA_Monographs_Volume-127.pdf>. Acesso em: 18 de julho de 2022.

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

LKUWARI, A., HASSAN, Z. U., ZEIDAN, R., AL-THANI, R., JAOUA, S. Occurrence of Mycotoxins and Toxigenic Fungi in Cereals and Application of Yeast Volatiles for Their Biological Control. **Toxins**. v.14, n. 404. 2022.

KAUSHIK, G. Effect of processing on mycotoxin content in grains. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 55, p. 1672–1683, 2015.

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

KIM, J.-G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, 1999.

KOWALSKA, K.; HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA, D.E.; PIASTOWSKA-CIESIELSKA, A.W. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.48, p. 141–149, 2016.

KUMAR, R.; ANSARI, K. M.; SAXENA, N.; DWIVEDI, P. D.; JAIN, S. D.; DAS, M. Detection of ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. **Food Control.** v. 26, p. 63-67, 2012.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D.A.;BRINK, D.R. **Ozone in Water Treatment: Application and Engineering**, Denver, CO: Am. Water Works Assoc. Research Foundation, 1991.

LAPOLLI, F. R. *et al.* **Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização**. Desinfecção de efluentes sanitários. Tradução . Rio de Janeiro: ABES, 2003.

LEE, U.S., JANG, H.S., TANAKA, T., OH, Y.J., CHO, C.M., UENO, Y. Effect milling on decontamination of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in Korean wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 126–129, 1987.

LI, M. M.; GUAN, E. Q.; BIAN, K. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and quality evaluation of ozonised wheat. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 4, p. 544–553, 2014.

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

LIEW, W. P, SABRAN, M. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 1, 2018.

LIU, Y., LU, Y., WANG, L., CHANG, F., YANG, L. Occurrence of deoxynivalenol in wheat, Hebei Province, China. **Food Chemistry**. v. 197, p. 1271–1274, 2016.

LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; BIAN, Y.; CHEN, Z. Effect of ozone treatment on aflatoxin B1 and safety evaluation of ozonized corn. **Food Control**, v.37, p.171–176, 2014.

LUZ, S. R. *et al.* Reduced of mycotoxin levels in parboiled rice by using ozone and its effects on technological and chemical properties, **Food Chemistry**, v. 372, 2022.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International J of Food Microbiology**, v. 119, p. 131–9, 2007.

MAHAPATRA, A. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; JULSON, J. L. Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 447-461, 2005.

MAHMOUD, A.; FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas.. **Química Nova**, v. 30, p. 198-205, 2007.

MANKEVICIENE, A., JABLONSKYTE-RASCE, D., MAIKSTENIENE, S. Occurrence of mycotoxins in spelt and common wheat grain and their products. **Food Additives & Contaminants**. v. 31, p. 132-138, 2014.

MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chem. Toxicol.**, v. 60, p. 218–237, 2013.

MARTINS, L. M. Ocorrência de fungos e aflatoxinas, cinética da degradação de aflatoxinas durante a torração e modelagem probabilística do risco de exposição pelo consumo de amendoim. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2015.

MAO, H.; SMITH, D. Influence of ozone application methods on efficacy of ozone decolorization of pulp mill effluents. **Ozone Science and Engineering** , v. 17, p. 205-236, 1995.

MCKENZIE, K.S. *et al.* Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food Chem. Toxicol**, v. 35, p. 807–820, 1997.

MCKEOWN, N. M. *et al.* Whole grains and health: from theory to practice: highlights of the grains for health foundation's whole grains summit 2012. **Journal of Nutrition**, Washington, DC, v. 143, n. 5, p. 744-758, 2013.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**, 6a ed., Editora Pioneira Thomson Learning: São Paulo, 2005.

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. **J Stored Prod Res**, v. 39, p. 33-44, 2003.

MILLER, F. A., SILVA, C. L., BRANDÃO, T. R. A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2013.

MORETTI, A.; PASCALE, M.; LOGRIECO, A. F. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. **Trends in Food Science & Technology**, v. 84, p. 38–40, 2019.

MURPHY, P. A., HENDRICH, S., LANDGREN, C., BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of food science**. v. 71, p. 51-65, 2006.

NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n.6, p. 425–9, 2006.

NORDIN, N. S. D. Detecção de aflatoxinas e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação animal. **Dissertação de mestrado**, Porto alegre: UFRGS, 1995.

O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. **Ozone in Food Processing**. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012.

PESTKA, J. J., ZHOU, H. R., MOON, Y., CHUNG, Y. J. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicol. Lett.** v. 153, p. 61–73, 2004.

PISTOL, G. C. *et al.* Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of importante pro- and anti-inflammatory mediators and mitogenactivated protein kinase/NF- κ B signalling molecules in pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 11, issue 3, p. 452-464, 2014.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic and Professionnal, London, 1997.

PORTO, Y. D.; TROMBETE, F. M.; FREITAS-SILVA, O.; DE CASTRO, I. M.; DIREITO, G. M.; ASCHERI, J. L. R. Gaseous ozonation to reduce aflatoxins levels and microbial contamination in corn grits. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 220, 2019.

QI, L.; LI, Y.; LUO, X.; WANG, R.; ZHEN , R.; WANG, L.; CHEN, Z. Detoxification of zearalenone and ochratoxin A by ozone and quality evaluation of ozonised corn. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n.11, p. 1700–1710 2016.

RICE, R.G.; NETZER, A. **Handbook of Ozone Technology and Applications**, Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, 1982.

RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 119, p. 3–10, 2007.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, p. 663-675, 2012.

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

SAMSON, R.A.; HONG, S.B.; FRISVAD, J.C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Med. Mycol.** v. 44, p. 133–148, 2006.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; BITTENCOURT, K. O.; SCUSSEL, V. M. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum L.*) quality and germination.

Journal of Stored Products Research, v. 59, p. 245-253, 2014a.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; SCUSSEL, V. M. Ozone treatment efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* growth inhibition and mycotoxin degradation of stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 940–948, 2014b.

SCOTT, D.B.M. The effect of ozone on nucleic acids and their derivatives, in Rice, R.G. (ed.) **Aquatic Applications of Ozone**, Syracuse, NY, USA: International Ozone Association, Pan American Group, p. 1–15, 1975.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso de ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

SMITH, M. C.; MADEC, S.; COTON, E.; HYMERY, N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. **Toxins**, v.8, p.94, 2016.

SOBROVA, P.; ADAM, V.; VASATKOVA, A.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdiscip. Toxicol.** v. 3, p. 94–99, 2010.

SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; ABAS, F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1055-1060, 2012.

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

STANKOVIC, S.; LEVIC, J.; IVANOVIC, D.; KRNJAJA, V.; STANKOVIC, G.; TANCIC S. Fumonisin B1 and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. **Food Control**, v.23, n.1, p.384-388, 2012.

STEPONAVICIUS, D., STEPONAVICIEN E, A., RAILA, A., ZVICEVICIUS, E.; KEMZURAITĖ, A. Investigation on ozone penetration along grain mould height. **J. Food Agric. Environ.** v. 10, p. 742–747, 2012.

SUN, C. *et al.* Saturated aqueous ozone degradation of deoxynivalenol and its application in contaminated grains. **Food Control**, v. 69, p. 185–190, 2016.

SUN, X.; JI, J.; GAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, G.; SUN, C. Fate of deoxynivalenol and degradation products degraded by aqueous ozone in contaminated wheat. **Food Research International**, v. 137, 2020.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 43, p.141–158, 1998

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

TARUSHKIN, V.I.; TKACHEV, R.V.; GORSKIY, I.V.; SHURKIN, R. Y. Obezrazhivanie zerna i semyan ozonom. In: Lescinskaya (Eds): **Povyshenie Effektivnosti Funkcionirovaniya Sistem Elektroenergetiki Sel'skogo Hozyaystva**, p.3-7, 2001.

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

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C. **Micotoxinas no trigo: estratégias de manejo para minimizar a contaminação**. EMBRAPA. Brasília, DF. 2020.

TRALAMAZZA, S. M.; BEMVENUTI, R. H.; ZORZETE, P.; GARCIA, F. S.; CORRÊA, B. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil, **Food Chemistry**, Brasil, v. 196, p. 445–450, 2016.

TROJANOWSKA K: Evaluation of cereal grain quality using mycological methods. In: Chelkowski (Eds): **Cereal Grain Mycotoxins**. Fungi and Quality in Drying and Storage, p. 185-215. Elsevier, Amsterdam 1991.

TROMBETE, F. M. Micotoxinas em grãos de trigo: ocorrência, efeitos da ozonização e determinação de uma forma modificada do desoxinivalenol. 2016. 101 f. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2016. Disponível em: <<https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/1354>> Acesso em: 12 de julho de 2022.

TROMBETE, F. M.; PORTO, Y. D., FREITAS-SILVA, O., PEREIRA, R. V., DIREITO, G. M., SALDANHA, T.; FRAGA, M. E. Efficacy of ozone treatment on mycotoxins and fungal reduction in artificially contaminated soft wheat grains. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.41, n. 3, Article e12927, 2017.

USDA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service – FSIS. FSIS Directive 7120.1. **Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products**. Washington, DC. 2002. Disponível em: <<https://www.oxidationtech.com/downloads/pdf/FSIS-71201.pdf>>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

USDA. United States Department of Agriculture. **Production, Supply and Distribution**. Foreign Agricultural Service. 2021. Disponível em: <<https://data.nal.usda.gov/dataset/production-supply-and-distribution-database>>. Acesso em: 14 de agosto de 2022.

VICTORIN, K. Review of the genotoxicity of ozone, **Mutation Research**, v.277, p.221–38, 1992.

VISCONTI, A.; PASCALE, M. An overview on *Fusarium* mycotoxins in the durum wheat pasta production chain. **Cereal Chemistry**, v. 87, p.21-27, 2010.

VORONOV, A. New generation of low pressure mercury lamps for producing ozone, **Ozone: Science & Engineering**, v. 30, n. 6, p.395–7, 2008.

WANG, L. *et al.* Effect of deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains. **Food Control**, v. 66, p.137–144, 2016.

WANG, L.; SHAO, H.; LUO, X.; WANG, R.; LI, Y.; LI, Y.; LUO, Y.; CHEN, Z. Effect of Ozone Treatment on Deoxynivalenol and Wheat Quality. **PLoS ONE**, v.11, n.1, p.1-13, 2016.

WANNEMACHER, R.W.; BUNNER, D.L.; NEUFELD, H.A. Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals. In **Mycotoxins and Animal Foods**, Eds.; CRC: Boca Raton, FL, USA, pp. 499–552, 1991.

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

WILSON, D.M.; MUBATANHEMA, W.; JURJEVIC, Z. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 504, p.3–17, 2002.

WU, J., DOAN, H. AND CUENCA, M.A. Investigation of gaseous ozone as an anti-fungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1288–93, 2006.

YAZAR, S.; OMURTAG, G.Z. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p. 2062–2090, 2008.

YOUNG, S.B. AND SETLOW, P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone, **J Appl Micro**, v. 96, p.1133–42, 2004.

ŽANIC-GRUBIŠIĆ, T.; ZRINSKI, R.; CEPELAK, I.; PETRIK, J.; RADIC, B.; PEPELJNJAK, S. Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversed by phenylalanine. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 167, p.132–139, 2000.

ZEBIRI, S., MOKRANE, S., VERHEECKE-VAESSEN, C., CHOQUE, E., REGHIOUI, H., SABAOU, N., RIBA, A. Occurrence of ochratoxin A in Algerian wheat and its milling derivatives. **Toxin Reviews**, p. 1–6, 2018.

ZHANG, R., ZHOU, Y., ZHOU, M. A sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of deoxynivalenol in wheat samples. **The Royal Society of Chemistry**, v.7, p. 2196 –2202, 2015.

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

ZVICEVIČIUS, E.; RAILA, A.; NOVOŠINSKAS, H.; KRASAUSKAS, A.; BRAZAUSKIENĖ, I.; PETRAITIENĖ, E. Influence of active ventilation on mycological contamination during grain drying. **Botanica Lithuanica**, v. 7, p.115-122, 2005.