

Menithen Beber Rodrigues

**EFEITO DO GÁS OZÔNIO NA QUALIDADE  
MICOTOXICOLÓGICA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM CASCA  
DURANTE A ARMAZENAGEM**

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-graduação da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Ciência dos Alimentos  
Orientador: Prof. Dr. Vildes Maria  
Scussel

Florianópolis  
2013

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

Beber-Rodrigues, Menithen

Efeito do gás ozônio na qualidade micotoxicológica de  
arroz (*Oryza sativa* L.) em casca durante a armazenagem /  
Menithen Beber-Rodrigues ; orientadora, Vildes Maria  
Scussel - Florianópolis, SC, 2013.

123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de  
PósGraduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Qualidade micotoxicológica.  
3. Arroz em casca. 4. Tempo de espera. 5. Ozônio. I.  
Scussel, Vildes Maria . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. III. Título.

**SÉRGIO IRÁ ADICIONAR FOLHA DE ASSINATURAS**



À minha família e esposo, dedico.



## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor e apoio incondicionais e pela liberdade que sempre me concederam em escolher meus caminhos.

Ao meu esposo, pelo carinho, amor e companheirismo, pela compreensão e motivação nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade da realização do mestrado e do crescimento intelectual.

À professora Dra. Vildes Maria Scussel, pela oportunidade concedida, pela orientação e aprendizado.

À Cooperativa Juriti, que viabilizou, acompanhou e sempre esteve disposta a ajudar na realização deste trabalho.

Aos colegas que fazem ou já fizeram parte do Laboratório de Micotoxinas, pelos momentos de descontração e por todas as contribuições no desenvolvimento da pesquisa.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos que sempre se dispuseram em ajudar, disponibilizaram equipamentos, trouxeram ideias, ensinamentos, informações e bom-humor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio bolsa.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.





## RESUMO

Em uma primeira etapa do trabalho foi avaliada a qualidade e segurança de quatro cultivares (Epagri 109 / SCS 114 Andosan / Tio Taka 113 / Epagri 115 CL) de arroz (*Oryza sativa* L.) recém-colhido cultivado sob sistema de irrigação na cidade de Massaranduba, Norte de Santa Catarina. Os parâmetros de qualidade avaliados foram micobiota, micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A – OTA e zearalenona - ZON), distribuição de água (conteúdo de umidade e atividade de água -  $a_w$ ) além de condições ambientais (umidade relativa – UR e temperatura) e a relação com o tempo entre a colheita e a recepção na indústria. As cultivares apresentaram tempo médio de espera de 8,6 horas (mín. 0,3 e máx. 24,9 h), carga total de fungos de  $8,6 \times 10^4$  ufc / mL (mín.  $1,8 \times 10^3$  e máx.  $9,4 \times 10^5$  ufc / mL), com distribuição de umidade bastante elevada – conteúdo de umidade de 18,97 % (mín. 14,9 e máx. 24,5 %) e  $a_w$  0,92 (mín. 0,78 e máx. 0,99.) - sob as condições ambientais médias de 87,3 % (mín. 80,0 e máx. 96,8%) e 25,4°C (mín. 22,5 e máx. 27,5°C) de UR e temperatura, respectivamente. As condições sob as quais as amostras foram submetidas permitiu o crescimento de fungos, porém não foi detectada a presença de micotoxinas. Ainda, não foi encontrada uma correlação do tempo entre carga e descarga dos grãos com a distribuição de umidade (conteúdo de umidade e  $a_w$ ) e com a carga total de fungos. Todos os resultados, bem como a distribuição dos gêneros de fungos nas cultivares e a importância do monitoramento da qualidade micotoxicológica do arroz foram discutidos. Uma segunda etapa do trabalho relatou o efeito do gás ozônio ( $O_3$ ) sobre a micobiota e distribuição de água (conteúdo de umidade e  $a_w$ ) em arroz seco armazenado a fim de aprimorar a segurança durante o armazenamento deste cereal. A partir de aplicações de três diferentes concentrações de  $O_3$  (10, 20 e 40 mg / L) durante 1,6 minutos de corrente de gás ozonizado mais 30 minutos de repouso, a maior variação observada foi na carga total de fungos, que alcançou uma redução de 3-log (de  $10^5$  para  $10^2$  ufc / mL) para os tratamentos com concentração de 20 e 40 mg / L de gás  $O_3$ . Após o tratamento com o gás, o conteúdo de umidade e  $a_w$  apresentaram uma ligeira redução (média do conteúdo de umidade baixou de 12,03 para 11,61% e média da  $a_w$  baixou de 0,67 para 0,63) nestas variáveis, o que era esperado devido o curto tempo de exposição ao gás  $O_3$ . Apesar da extensa redução da carga total de fungos, foi verificado que os gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras demonstram resistência às concentrações de gás  $O_3$  aplicado, de modo que os gêneros de fungos mais sensíveis foram

*Acremonium* e *Alternaria*. Desta forma, o tratamento com O<sub>3</sub> mostrou ser uma alternativa eficaz segura ao meio ambiente para reduzir a contaminação fúngica de arroz armazenado e manter sua segurança micológica durante esta etapa da pós-colheita.

**Palavras-chave:** Fungos. Micotoxinas. Tempo de espera. Atmosfera modificada. Ozônio. Arroz recém-colhido e armazenado.

## ABSTRACT

In a first step of this study, the quality and safety of four freshly harvested paddy rice (*Oryza sativa* L.) cultivars (Epagri 109 / SCS 114 Andosan / Tio Taka 113 / Epagri 115 CL) grown under irrigation system in the North of Santa Catarina State, Brazil. The quality parameters evaluated were mycoflora, mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A - OTA and zearalenone - ZON), water distribution (moisture content - mc; water activity -  $a_w$ ) apart from environmental conditions (relative humidity - RH; temperature) and the relation between harvest and the industry reception timing. All cultivars presented an average waiting time of 8.6 hours (min. 0.3 and max. 24.9 h), a total fungi load of  $8.6 \times 10^4$  cfu / mL (min.  $1.8 \times 10^3$  and max.  $9.4 \times 10^5$  cfu / mL) with a rather high humidity conditions - mc of 18.97 % (min. 14.9 and max. 24.5 %) and  $a_w$  of 0.92 (min. 0.78 and max. 0.99) - under the average environmental conditions of 87.3 % (min. 80.0 and min. 96.8 %) and 25.4°C (min. 22.5 and 27.5 °C) for RH and temperature, respectively. The conditions under which the samples were submitted allowed fungi growth, but no mycotoxins were detected. Moreover, it was not found a correlation of the grain loading and unloading time with the water distribution (mc,  $a_w$ ) and the total fungi load. All results, as well as the fungi genera distribution among the cultivars and the importance of monitoring the rice mycotoxicological quality and safety have been discussed. A second step of the study reported the ozone ( $O_3$ ) gas effect on stored dried paddy rice mycoflora and humidity (mc and  $a_w$ ) in order to improve the storage safety of this cereal. From the three different  $O_3$  concentrations (10, 20 and 40 mg/L) applied during 1.6 minutes of ozoned gas stream plus 30 minutes of resting, the highest change was observed on the total fungi load reaching a 3-log reduction (from initial  $10^5$  down to  $10^2$  cfu/mL) at the 20 and 40 mg/L  $O_3$  gas treatment. After  $O_3$  treatment, mc and  $a_w$  presented a slight reduction (mc: average from 12.03 to 11.61 % and  $a_w$ : average from 0.67 to 0.63) in those variables, which was expected due to the short exposure time to the  $O_3$  stream. Despite the extensive total fungi reduction, it was observed that *Aureobasidium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera as well as yeasts showed resistance to the  $O_3$  gas concentration applied, so that the most sensitive fungi genera were *Acremonium* and *Alternaria*. Thereby,  $O_3$  treatment showed to be an effective and safe to the environment alternative in order to reduce paddy stored rice fungal contamination and keep safety during this stage of postharvest.

**Keywords:** fungi. Mycotoxins. Waiting time. Modified atmosphere. Ozone. Freshly harvested and stored rice.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Imagens de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.): (a) plantação, (b) vegetal, (c) grão em casca, (d) grão descascado integral, (e) grão descascado polido (branco) e (f) grão parboilizado (industrializado) .....	30
Figura 2 - Fluxograma das operações de beneficiamento de arroz ...	34
Figura 3 - Produtividade da cultura de arroz no Brasil, em kg/ha. Safras 1976-77 a 2005/06 .....	37
Figura 4 - Representação das áreas semeadas e produtividade de arroz em Santa Catarina no período de 2009 a 2010 .....	38
Figura 5 - Fatores que interferem na ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar .....	45
Figura 6 - Estrutura química da zearalenona .....	53
Figura 7 - Estrutura química de aflatoxinas B (AFB <sub>1</sub> e AFB <sub>2</sub> ) à esquerda e de aflatoxinas G (AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub> ) à direita .....	55
Figura 8 - Estrutura química da (a) ocratoxina A e (b) fenilalanina e ocratoxina $\alpha$ .....	56
Figura 9 - Armazenagem em silos metálicos .....	60
Figura 10 - Representação de correntes convectivas e transferências de calor e água no interior dos silos: (a) temperatura externa menor e condensação no terço superior, (b) temperatura externa maior e condensação no terço inferior .....	62
Figura 11 - Estruturas de ressonância da molécula de ozônio .....	66
Figura 12 - Diagrama esquemático da geração de ozônio pelo método de descarga corona .....	67
Figura 13 - Reação direta do ozônio com a matéria orgânica: (a) mecanismo de Criegee e (b) exemplo do ataque eletrofílico do ozônio a um composto aromático .....	69

### ARTIGO: MICOBIOTA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE QUATRO CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM CASCA RECÉM-COLHIDO E A RELAÇÃO COM O TEMPO ENTRE COLHEITA E RECEPÇÃO NA INDÚSTRIA

Figura 1 - Mapa da localização geográfica da cidade de Massaranduba, a qual forneceu as amostras de arroz recém-colhido para o presente estudo .....	88
--	----

Figura 2 - Histogramas de Shapiro-Wilk dos resultados de (a) conteúdo de umidade, (b) atividade água, (c) carga total de fungos e (d) tempo de espera de todas as amostras das quatro cultivares de arroz recém-colhido coletadas de fevereiro a março de 2012.....	93
Figura 3 - Representação gráfica da média das condições ambientais (umidade relativa e temperatura) em cada dia de coleta de arroz em casca recém-colhido entre fevereiro e março de 2012 .....	94

**ARTIGO: EFEITO DO GÁS OZÔNIO NA PROLIFERAÇÃO FÚNGICA E NA DEGRADAÇÃO DE MICOTOXINAS EM ARROZ (Oryza sativa L.) EM CASCA TRATADO**

Figura 1 - Representação esquemática do tratamento de gás ozônio no arroz em casca (*) método iodométrico para quantificar a concentração de ozônio .....	108
Figura 2 - Representação esquemática do preparo de amostras, tratamentos de ozônio e análises realizadas no arroz em casca armazenado estudado.....	110
Figura 3 - Resultados gráficos do arroz em casca tratado com ozônio quanto a fungos e distribuição de umidade: (a.1) carga total de fungos, (a.2) conteúdo de umidade, (a.3) atividade água para cada concentração de ozônio (10, 20 e 40 mg/L para os Grupos 1, 2 e 3, respectivamente) aplicada.....	112

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1 - Limites máximos tolerados nacionais de micotoxinas segundo a Resolução RDC n° 07, ANVISA, 2011 .....	46
Quadro 2 - Legislação para micotoxinas em alimentos e rações na América Latina.....	50
Quadro 3 - Aplicação de ozônio (O <sub>3</sub> ) gasoso em diferentes concentrações e tempos de exposição em alimentos reportados na literatura.....	71





## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Composição centesimal de arroz integral, polido e parboilizado (g/100g) .....	32
Tabela 2 - Evolução da produção de arroz nos países do Mercosul, no período de 1999/00 a 2009/10 .....	37
Tabela 3 - Agentes oxidantes de seus respectivos potenciais oxidativos .....	68

### ARTIGO: MICOBIOTA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE QUATRO CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM CASCA RECÉM-COLHIDO E A RELAÇÃO COM O TEMPO ENTRE COLHEITA E RECEPÇÃO NA INDÚSTRIA

Tabela 1 - Resultados do tempo de espera, conteúdo de umidade, atividade água, carga total de fungos e micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona) em cada cultivar de arroz em casca recém-colhido coletados entre fevereiro e março de 2012.....	92
Tabela 2 - Resultados da Correlação Linear de Pearson entre tempo de espera e conteúdo de umidade, atividade água e carga total de fungos de arroz em casca recém-colhido.....	95
Tabela 3 - Distribuição dos gêneros de fungos isolados de arroz em casca recém-colhido .....	96

### ARTIGO: EFEITO DO GÁS OZÔNIO NA PROLIFERAÇÃO FÚNGICA E NA DEGRADAÇÃO DE MICOTOXINAS EM ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM CASCA TRATADO

Tabela 1 - Resultados do arroz em casca tratado com gás ozônio quanto à carga total de fungos e distribuição de água .....	111
Tabela 2 - Proporções da redução da carga total de fungos no arroz em casca após diferentes tratamentos com gás ozônio.....	113
Tabela 3 - Distribuição e proporção dos gêneros de fungos no arroz em casca após diferentes tratamentos com gás ozônio....	114
Tabela 4 - Efeito na distribuição de fungos e leveduras no arroz em casca após diferentes tratamentos com gás ozônio.....	114



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AFB<sub>1</sub> - Aflatoxina B<sub>1</sub>  
AFB<sub>2</sub> - Aflatoxina B<sub>2</sub>  
AFG<sub>1</sub> - Aflatoxina G<sub>1</sub>  
AFG<sub>2</sub> - Aflatoxina G<sub>2</sub>  
AFLs - Aflatoxinas  
ANOVA - Análise de variância  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
DON - Deoxinivalenol  
EUSCF - European Union of Scientific Committee on Food  
IARC - International Association on Research of Cancer  
FAO - Food and Agricultural Organisation  
FDA - Food and Drug Administration  
GRAS - Generally Reconized as Safe  
LMT - Limite Máximo Tolerável  
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
Mercosul - Mercado Comum do Sul  
Nm - Nanômetros  
OTA - Ocratoxina A  
PIB - Produto Interno Bruto  
TIR - Taxa Interna de Retorno  
UR - Umidade relativa  
UV - Ultravioleta  
VPL - Valor Presente Líquido  
ZON - Zearalenona



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>255</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>Erro!</b>
	Indicador não definido.9	
2.1	<b>ARROZ</b>	
	.....	<b>Erro</b>
	<b>! Indicador não definido.9</b>	
2.1.1	<b>Características botânicas</b> .....	<b>Erro!</b>
	Indicador não definido.9	
2.1.2	<b>Composição nutricional</b>	
	.....	<b>31Er</b>
	ro! Indicador não definido.	
2.1.3	<b>Cadeia produtiva</b>	
	.....	<b>32Er</b>
	ro! Indicador não definido.	
2.1.4	<b>Qualidade do arroz</b> .....	<b>35</b>
2.1.5	<b>Produção e mercado</b> .....	<b>36</b>
2.2	<b>FUNGOS E MICOTOXINAS</b> .....	<b>39</b>
2.2.1	<b>Fungos</b> .....	<b>40</b>
2.2.2	<b>Micotoxinas</b> .....	<b>41</b>
2.2.3	<b>Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e micotoxinas</b> .....	<b>43</b>
2.2.4	<b>Legislação</b> .....	<b>45</b>
2.3	<b>CONTAMINAÇÃO DO ARROZ POR FUNGOS E MICOTOXINAS</b> .....	<b>51</b>
2.3.1	<b>Ocorrência de fungos e micotoxinas em arroz</b> .....	<b>51</b>
2.3.2	<b>Zearalenona</b> .....	<b>53</b>
2.3.3	<b>Aflatoxinas</b> .....	<b>54</b>
2.3.4	<b>Ocratoxina A</b> .....	<b>56</b>
2.4	<b>ARMAZENAGEM COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO DA QUALIDADE</b>	
	.....	<b>Erro</b>
	<b>! Indicador não definido.</b>	
2.4.1	<b>Tipos de armazenagem</b> .....	<b>Erro!</b>
	Indicador não definido.	
2.4.2	<b>Controle das condições de armazenagem</b> .....	<b>60</b>
2.4.3	<b>Problemas na armazenagem</b> .....	<b>63</b>
2.5	<b>OZÔNIO</b> .....	<b>65</b>
2.5.1	<b>Características e produção de ozônio</b> .....	<b>66</b>
2.5.2	<b>Poder oxidante e mecanismo de ação sobre fungos e</b>	

	micotoxinas .....	67
2.5.3	Aplicações em alimentos .....	70
2.5.4	Método de quantificação do ozônio .....	72
2.5.5	Viabilidade de aplicação .....	73
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO: MICOBIOTA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE QUATRO CULTIVARES DE ARROZ (Oryza sativa L.) EM CASCA RECÉM- COLHIDO E A RELAÇÃO COM O TEMPO ENTRE COLHEITA E RECEPÇÃO NA INDÚSTRIA.....</b>	<b>85</b>
3.1	RESUMO .....	85
3.2	INTRODUÇÃO .....	86
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	
	.....	<b>Erro</b>
	<b>! Indicador não definido.</b>	
<b>3.3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>Erro!</b>
	Indicador não definido.	
3.3.1.1	Amostra .....	
	.....	<b>88Er</b>
	<b>ro! Indicador não definido.</b>	
3.3.1.2	Padrões, reagentes, meios de cultura e outros materiais.....	88
3.3.1.3	Equipamentos .....	89
<b>3.3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>89</b>
3.3.2.1	Coleta e preparo das amostras .....	89
3.3.2.2	Distribuição de água.....	90
3.3.2.3	Testes micológicos .....	90
3.3.2.4	Análise de multi-toxinas.....	90
3.3.2.5	Obtenção de dados do tempo da colheita até a recepção na indústria e das condições ambientais.....	91
3.3.2.6	Análise estatística .....	91
3.4	RESULTADOS .....	91
3.5	DISCUSSÃO.....	96
3.6	CONCLUSÕES.....	98
3.7	AGRADECIMENTOS .....	99
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>99</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO: EFEITO DO GÁS OZÔNIO NA MICOBIOTA DE ARROZ (Oryza sativa L.) EM CASCA TRATADO.....</b>	<b>103</b>
4.1	RESUMO .....	103
4.2	INTRODUÇÃO .....	104
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	105

<b>4.3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>105</b>
4.3.1.1	Amostra .....	106
4.3.1.2	Reagentes e meios de cultura .....	106
4.3.1.3	Equipamentos e aparelhos .....	106
4.3.1.4	Outros materiais .....	106
<b>4.3.2</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>107</b>
4.3.2.1	Preparo dos silos-piloto e amostras para aplicação de O <sub>3</sub> ..	107
4.3.2.2	Tratamento com O <sub>3</sub> .....	107
4.3.2.3	Análises .....	108
4.3.2.3.1	<i>Testes micológicos.....</i>	<i>108</i>
4.3.2.3.2	<i>Distribuição de água.....</i>	<i>109</i>
4.3.2.3.3	<i>Estatística.....</i>	<i>109</i>
4.4	RESULTADOS .....	111
<b>4.4.1</b>	<b>Distribuição de umidade e carga total de fungos.....</b>	<b>113</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Distribuição dos gêneros de fungos <i>versus</i> tratamento com gás O<sub>3</sub> .....</b>	<b>113</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Ocorrência de fungos e leveduras .....</b>	<b>114</b>
4.5	DISCUSSÃO.....	115
4.6	CONCLUSÕES.....	118
4.7	AGRADECIMENTOS.....	118
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>118</b>
5	CONCLUSÕES GERAIS .....	123





## 1 INTRODUÇÃO

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz (*Oryza sativa* L.) desempenha papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social, sendo considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo. Dentro do sistema de produção do arroz, a pós-colheita necessita de atenção especial, pois nesta fase o custo agregado ao produto é o mais alto, devido aos gastos que já foram realizados no decorrer do processo de produção (EMBRAPA, 2005).

O cultivo de arroz é realizado em regiões que apresentam condições ideais para o crescimento de fungos, sendo que a contaminação do cereal por estes microrganismos pode ocorrer via solo, ar, insetos, chuva, equipamentos e práticas agrônômicas; portanto o ataque fúngico pode ocorrer tanto no campo como no armazenamento (MOLINIE et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2006; MAGAN, ALDRED, 2007; DUARTE, PENA, LINO, 2010).

Além das espécies de fungos deteriorantes, os quais são considerados indicadores da qualidade de grãos armazenados, existe outra classe de fungos muito importante por causarem danos à saúde, os denominados fungos micotoxigênicos. Alguns gêneros de fungos de campo e de armazenagem podem produzir estas toxinas, mesmo quando seu desenvolvimento não é acentuado (SCUSSEL, 2002; MAZIERO, BERSOT, 2010).

Ainda que muitos são os anos de pesquisa e da introdução de boas práticas agrícolas na produção de alimentos e boas práticas de fabricação na cadeia de armazenagem e distribuição de cereais, micotoxinas continuam a ser um problema, sendo que a contaminação mundial de alimentos com estes compostos corresponde a um problema significativo tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, PENA, LINO, 2010; MORENO et al., 2009; NUNES et al., 2003; ZAIN, 2011).

A agroindústria brasileira vem se destacando com o aumento da produção, principalmente de grãos, obtido mediante investimentos em novas tecnologias de plantio e colheita, além

do uso de variedades mais produtivas, o que tem tornado o país um dos maiores produtores de grãos no mundo. Portanto, a conservação de grãos e sua proteção durante o armazenamento constituem uma necessidade social e econômica. Contudo, o armazenamento é a uma área relativamente nova como conhecimento e prática, que tem se caracterizado como gargalo na evolução da cadeia produtiva de grãos, correspondendo a um ponto de elevadas perdas. Estimativas indicam que cerca de 15 % da safra de arroz é perdida anualmente, principalmente durante as operações pós-colheita, porém este valor pode chegar a 50 % em regiões tropicais (MAGAN, ALDRED, 2007; ELIAS et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; DORS, PINTO, BADIALE-FURLONG, 2009).

O interesse no armazenamento seguro de grãos visando a redução de prejuízos qualitativos e quantitativos é expressivo. Devido a preocupações ambientais de empregar aditivos não prejudiciais ao meio ambiente e de reduzir a emissão de resíduos químicos, os novos regulamentos e legislações alimentares vêm limitando o uso de fumigantes pesticidas empregados no manejo de grãos. Assim sendo, surge a necessidade do desenvolvimento de estratégias alternativas ao controle de agentes indesejáveis no armazenamento de grãos. Para tanto, o ozônio tem sido efetivamente usado para controlar o desenvolvimento e proliferação de fungos em grãos e cereais com diversas vantagens sobre os métodos tradicionais (KELLS et al., 2001; TIWARI et al., 2010).

Considerando a importância nutricional, social e econômica do arroz e a importância deste cereal na economia catarinense e brasileira, bem como os problemas micotoxicológicos e as perdas qualitativas e quantitativas que podem ocorrer durante o armazenamento deste produto, este trabalho propõe a avaliação da qualidade micotoxicológica de arroz proveniente da lavoura (recém-colhido) e a aplicação de O<sub>3</sub> gasoso em grãos de armazenamento a fim de avaliar os potenciais benefícios deste tratamento especificamente para o cereal em questão.

A avaliação da qualidade inicial da matéria-prima arroz com casca objetiva conhecer os possíveis perigos micotoxicológicos do arroz cultivado na região do Norte Catarinense, juntamente com o estudo dos efeitos do tratamento com ozônio em grãos armazenados a fim de estabelecer metodologia para a descontaminação fúngica visando aprimorar a qualidade e manejo na cadeia produtiva de arroz, bem como agregar valor ao produto comercial e reduzir os prejuízos decorrentes da contaminação micológica neste cereal.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A importância dos cereais varia entre os aspectos históricos, mitológicos, culturais, religiosos e econômicos que até hoje existem, fator que os torna o mais importante grupo de alimentos produzidos no mundo (DUARTE, PENA, LINO, 2010).

### 2.1 ARROZ

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz (*Oryza sativa* L.) destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social. Este cereal é um dos alimentos mais importantes que alimentam a maior proporção de população do mundo e, ainda, corresponde atualmente a cultura com maior potencial de aumento de produção (EMPRAPA, 2005; SHI et al., 2009; REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2010).

#### 2.1.1 Características botânicas

A planta do arroz pertence à classe *Monocotyledonae*, ordem *Glumiflorae*, família *Poaceae*, subfamília *Pooidae*, tribo *Oryzae*, subtribo *Oryzineae*, gênero *Oryza*. O vegetal apresenta sistema radicular fasciculado, caules redondos e ocos, folhas com limbo foliar plano e inflorescência em forma de panícula. O porte das plantas pode variar de 0,4 a 0,7 m de altura, de acordo com cada cultivar (EPAGRI, 2002).

O gênero *Oryza*, qual pertence a planta do arroz, possui vinte e cinco espécies, desde perenes a anuais, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Europa, Austrália e Américas do Sul, Central e do Norte. Em todo o mundo, 12 espécies *Oryza* são conhecidas, porém, somente duas são cultivadas, *Oryza sativa* L. e *Oryza glaberrima* Steud, sendo esta

última estabelecida na região norte da África e que vem sendo gradativamente substituída pela primeira (EPAGRI, 2002; REITER et al., 2010).

Na Figura 1 é possível verificar diferentes imagens de arroz *Oryza sativa* L.: (a) plantação do cereal, (b) vegetal observado de perto, (c) grão de arroz em casca, (d) grão de arroz descascado integral (com farelo), (e) grão de arroz descascado polido (branco) não industrializado e (f) grão de arroz parboilizado (industrializado).

Figura 1 - Imagens de arroz (*Oryza sativa* L.): (a) plantação, (b) vegetal, (c) grão em casca, (d) grão descascado integral, (e) grão descascado polido (branco) e (f) grão parboilizado (industrializado).



No que se refere a origem da *Oryza sativa* L., acredita-se, pelas evidências disponíveis, que a mesma seja oriunda do sudeste asiático, onde são registradas as mais diversas formas de cultivo. Esta espécie, por sua vez, subdivide-se em diversos grupos ou subespécies, sendo as mais importantes a Índica – com grãos longos e finos, a Japônica – com grãos curtos e arredondados e a Javânica – com grãos longos e espessos. (EPAGRI, 2002). Estas subespécies (ou raças), por sua vez,

ocorrem em uma ampla gama de variedades, que são estimadas em cerca de 140.000 unidades (REITER et al., 2010).

No Brasil, a cultura do arroz irrigado foi introduzida por imigrantes europeus no final do século XIX, sendo que as primeiras cultivares utilizadas no Rio Grande do Sul e Santa Catarina pertencem à subespécie Japônica, que vem sendo cada vez mais melhoradas e/ou aperfeiçoadas, inclusive pelo emprego de tecnologias de arroz híbrido (REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2010).

### **2.1.2 Composição nutricional**

O consumo de cereais é quase onipresente em todo o mundo, fator que lhes confere uma posição importante na nutrição humana. Além do elevado teor de amido como fonte de energia, cereais fornecem fibras alimentares, proteínas e lipídios nutritivos ricos em ácidos graxos essenciais. Foi estimado que o consumo mundial de cereais fornece diretamente cerca de 50 % de proteína e energia necessária para a dieta humana, com cereais proporcionando um adicional de 25 % de proteína e energia através de intermediários da pecuária (DUARTE, PENA, LINO, 2010).

No Brasil, o arroz é considerado um produto essencial na cesta básica do consumidor e corresponde a um dos principais alimentos consumidos diariamente pela população (consumo de 175,17 g / dia / per capita), fornecendo 20 % da oferta de energia diária mundial. Contudo, a composição deste cereal varia de acordo com o produto comercial de arroz (integral, polido e parboilizado), conforme apresentado na Tabela 1 (MIRANDA et al., 2007).

Tabela 1 - Composição centesimal de arroz integral, polido e parboilizado (g / 100g)

Componente	Arroz		
	Integral	Polido	Parboilizado
Água (%)	70,3	72,6	73,4
Proteína (%)	2,5	2,0	2,1
Gordura (%)	0,6	0,1	0,1
Carboidrato (%)	25,5	24,2	23,3
Fibra alimentar (%)	0,3	0,1	0,1
Cálcio (mg)	12	10	19
Fósforo (mg)	73	28	57
Sódio (mg)	-	-	-
Potássio (mg)	70	28	43
Tiamina (mg)	0,09	0,02	0,11
Riboflavina (mg)	0,02	0,01	-
Niacina (mg)	1,4	0,4	1,2

Encontrado valor de 1% de cinzas para arroz polido (100 –somatório outras determinações centesimais).

Fonte: EMBRAPA (2006).

Verifica-se que o arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, sendo capaz de suprir 20 % da energia e 15 % da proteína necessária a um adulto, além de conter vitaminas, sais minerais, fósforo, cálcio e ferro. Este constituiu uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima e é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo (EMBRAPA, 2005; MAPA, 2011).

### 2.1.3 Cadeia produtiva

Os solos cultivados com arroz irrigado na Região Subtropical do Brasil, especificamente nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina são encontrados, principalmente, nos ecossistemas de várzeas (solos de várzea) formados por planícies de rios, lagoas e lagunas, apresentando uma característica comum: a formação em condições variadas de



deficiência de drenagem. O cultivo do arroz irrigado, por submersão do solo, necessita em torno de 2000 L de água para produzir 1 kg de grãos com casca, estando entre as culturas mais exigentes em termos de recursos hídricos. (EMBRAPA, 2005).

Dentre os sistemas de cultivo de arroz, Santa Catarina utiliza exclusivamente o sistema pré-germinado, o qual caracteriza-se pela implantação da cultura com sementes pré-germinadas, distribuídas a lanço, em solo previamente inundado com lâmina de água de aproximadamente 5 cm. As cultivares de arroz de ciclo tardio são as mais recomendadas para o cultivo em Santa Catarina por apresentarem maior potencial produtivo. Especificamente na região do Litoral Norte deste Estado, há também a indicação daquelas que apresentem alta capacidade de rebrote por permitirem a realização de duas colheitas com apenas uma semeadura (cultivo da soca). Ainda, os principais fatores que influenciam o estabelecimento adequado da cultura, além do sistema de cultivo e cultivar, destacam-se: época de semeadura, qualidade de sementes e cuidados na operação de semeadura (REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2010).

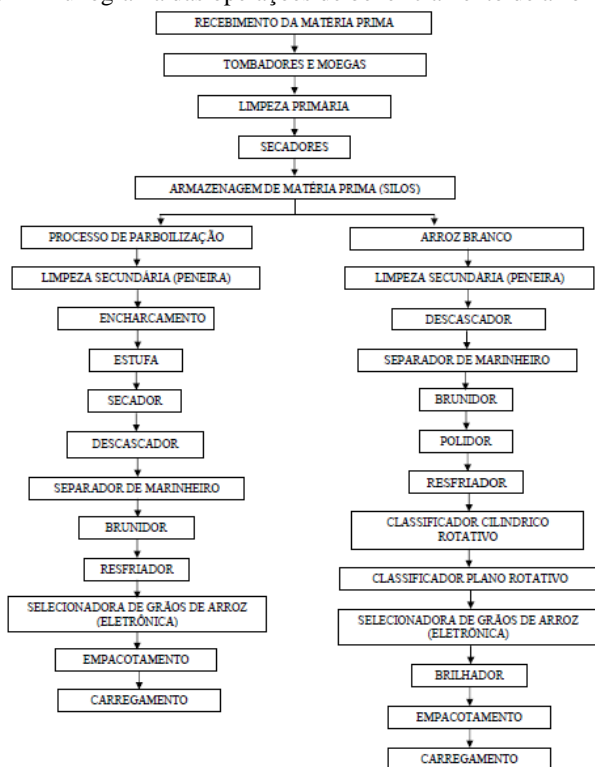
À medida que passa o tempo após a maturação, observa-se importante redução da resistência dos grãos ao ataque de pragas e microrganismos. Portanto, a colheita deve ser realizada no momento próprio e de forma adequada, pois o retardamento dela e as danificações mecânicas podem determinar que sejam colhidos grãos com qualidade já comprometida ou com pré-disposição para grandes perdas durante o armazenamento. Desta maneira, o teor adequado de umidade para o ponto de colheita do arroz está entre 18 e 23 %. Se colhido com teor muito elevado, haverá grãos em formação; por outro lado, se a colheita for muito tarde haverá mais quebra de grãos no beneficiamento e, quando se destina a semente, o vigor poderá ser afetado (EMPRAPA, 2005; ELIAS, OLIVEIRA, ANTUNES, 2009)

A partir da colheita do arroz, as operações de pós-colheita incluem transporte, recepção, pré-limpeza e secagem, armazenamento, beneficiamento e embalagem, sendo que as operações de armazenagem serão descritas no decorrer desta

revisão. Em arroz, as operações de beneficiamento começam no preparo dos grãos para o descascamento e se encerram na embalagem, com variações dependentes do processo de industrialização, se para a produção de arroz integral, branco polido ou parboilizado, por exemplo (EMPRAPA, 2006; ELIAS, OLIVEIRA, ANTUNES, 2009).

As principais operações empregadas nas indústrias beneficiadoras de arroz para a produção de arroz branco e parboilizado, os principais produtos destas empresas, são representadas na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma das operações de beneficiamento de arroz



Fonte: Darabas (2007).

É importante ressaltar que no sistema de produção do arroz, a colheita, a pós-colheita e a industrialização são as últimas operações antes da comercialização. Este fato é suficiente para justificar atenção especial, pois, nestas fases, o custo agregado ao produto é o mais alto, devido aos inúmeros gastos que já foram realizados no decorrer do processo de produção (EMPRAPA, 2005).

#### **2.1.4 Qualidade do arroz**

Conforme legislação brasileira, Portaria N<sup>o</sup> 269/88 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os tipos existentes de arroz branco e de parboilizado são os Tipos 1 a 5 e Abaixo Padrão. Os Defeitos Gerais Agregados definem o critério básico para classificação dos tipos de arroz beneficiado, referindo-se à quantidade dos diferentes defeitos registrados no produto. O Tipo 1 é a categoria de mais alta qualidade, segundo o critério oficial de classificação de arroz. A classificação definida nessa Resolução tem sido muito questionada pelos segmentos do setor. É considerada ultrapassada, tanto que as indústrias acabam criando categorias próprias, com qualidade considerada superior à definida para o Tipo 1, denominando tipo superior, premium, entre outras designações (MIRANDA et al., 2007).

O nível de tecnologia em Santa Catarina é um dos mais elevados na produção agrícola desse cereal. Inclusive, em termos tecnológicos é interessante ressaltar que esse estado possui pesquisa financiada pelo setor privado e um amplo programa de qualidade total que atende a todo o sistema agroindustrial do arroz, inclusive colocando selos de qualidade nos produtos finais. Exemplo da valorização da qualidade são estratégias relacionadas ao pagamento de prêmios sobre o preço do arroz com maior proporção de grãos inteiros ou com menos defeitos (MIRANDA et al., 2007).

Além destes aspectos, a qualidade do arroz envolve outro importante fator, a contaminação do cereal por

micotoxinas, substâncias que vêm se tornando cada vez mais reconhecidas e contempladas em legislações, conforme abordado no decorrer desta revisão.

### **2.1.5 Produção e mercado**

O arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupa área aproximada de 158 milhões de hectares, sendo que mais de 75 % desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado. A produção em cerca de 662 milhões de toneladas de grãos em casca corresponde a 29 % do total de grãos usados na alimentação humana (EMPRAPA, 2005; REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2010).

Segundo dados da Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado (2010), o consumo médio mundial de arroz é de 60 kg / pessoa / ano, sendo que nos países asiáticos, onde são produzidos 90 % deste cereal, é consumido entre 100 e 150 kg / pessoa / ano. Na América Latina são consumidos, em média, 30 kg / pessoa / ano, destacando-se o Brasil como grande consumidor (45 kg / pessoa / ano).

O Brasil, com uma produção anual entre 11 e 13 milhões de toneladas de arroz nas últimas safras, participa com cerca de 82 % da produção do Mercosul, seguido pelo Uruguai, Argentina e, por último, o Paraguai, conforme ilustrado na Tabela 2 (REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2010).

Segundo o MAPA (2011), o Brasil compreende o nono maior produtor mundial, sendo que a produção está distribuída nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso. O cultivo de arroz irrigado, praticado na região Sul do Brasil contribui, em média, com 54 % da produção nacional. Na Figura 3, pode-se verificar a produtividade da cultura de arroz em cada Região do Brasil, com destaque à Região Sul.

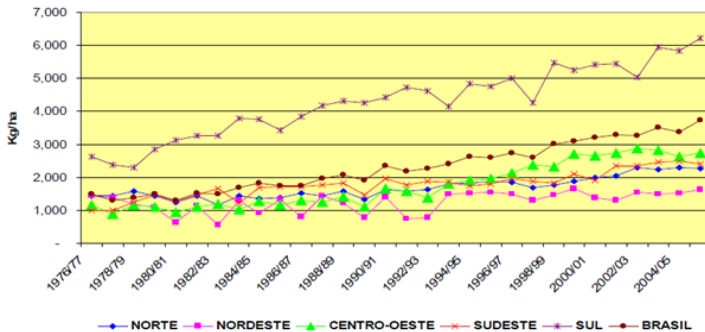
Tabela 2 - Evolução da produção de arroz nos países do Mercosul, no período de 1999/00 a 2009/10

País / Região	Produção por safra (mil t)						
	1999/00	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10 <sup>1</sup>
Brasil	11.090	13.193	11.527	11.080	12.060	12.602	11.357
Uruguai	1.209	1.215	1.146	1.200	1.300	1.286	1.149
Argentina	904	956	1.193	1.075	1.246	1.350	1.240
Paraguai	101	102	126	132	135	260	280
Mercosul	13.304	15.466	13.992	13.487	14.741	15.498	14.026

<sup>1</sup> Estimativas segundo FAO.

FONTE: Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado (2010).

Figura 3 - Produtividade da cultura de arroz no Brasil, em kg/ha. Safras 1976-77 a 2005/06



FONTE: Miranda et al. (2007).

Em Santa Catarina, o plantio por meio do sistema pré-germinado corresponde ao segundo lugar na produção do grão irrigado, com 800 mil toneladas anuais, sendo que o principal produto originário das indústrias catarinenses é o arroz parboilizado. Em Santa Catarina o valor bruto da produção do arroz no ano de 2007 foi de R\$ 428 milhões, chegando próximo a 4 % da PIB da agropecuária catarinense. Neste Estado, o arroz

é produzido em 142 municípios, concentrados no Litoral ou próximo (Região do Baixo e Médio Vale de Itajaí), com 92 % da área e no Alto Vale do Itajaí, com 8 % da área. Na safra 2008/09 havia 8.499 agricultores produzindo arroz irrigado em 11,23 mil propriedades; portanto, trata-se de pequenas propriedades, com área média de 13,3 hectares. O setor agroindustrial operou com 66 indústrias de beneficiamento, concentradas nas regiões de Araranguá (30) e Criciúma (18), com capacidade para beneficiar 1.500 mil t / ano de arroz em casca, bem superior à produção estadual, o que o leva a importar arroz em casca de outros estados, principalmente do Rio Grande do Sul. Atualmente, mais de 30 mil pessoas dependem economicamente desta atividade. (REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 2010, MAPA, 2011).

A Figura 4 representa as áreas de plantação de arroz em Santa Catarina, sendo as áreas semeadas e a produtividade indicadas por área de cultivo, segundo dados da Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado (2010).

Figura 4 - Representação das áreas semeadas e produtividade de arroz em Santa Catarina no período de 2009 a 2010.



FONTE: Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado (2010).

Sendo assim, o Brasil é um grande produtor, mas também grande consumidor de arroz e apenas recentemente passou a gerar excedentes exportáveis do cereal. O crescimento da produção permitiu ao país tornar-se auto-suficiente em arroz na safra 2003/2004, sendo que em 2005, o Brasil chegou a exportar 272 mil toneladas de arroz. Hoje cerca de 5 % da produção nacional é destinada à exportação (MIRANDA et al., 2007; MAPA, 2011).

No Estado de Santa Catarina, a produção de arroz na última década cresceu 42 %. Cerca de 30 % da produção de Santa Catarina são consumidos no Estado, o restante é exportado para os demais centros consumidores. (EMPRAPA, 2005).

A demanda para a produção de arroz continua a aumentar nas próximas décadas, especialmente nos grandes países consumidores de arroz da Ásia, África e América Latina, devido ao crescimento populacional e as perdas de terras cultiváveis (SHI et al., 2009).

Projeções de produção e consumo de arroz indicam que o Brasil vai colher 14,12 milhões de toneladas de arroz na safra 2019/2020, equivalente ao aumento anual da produção de 1,15% nos próximos dez anos. O consumo deverá crescer a uma taxa média anual de 0,86%, alcançando 14,37 milhões de toneladas em 2019/2020. Assim, a importação projetada para o final do período é de 652,85 mil toneladas. A taxa anual projetada para o consumo de arroz nos próximos anos, de 0,86 %, está pouco abaixo da expectativa de crescimento da população brasileira (MAPA, 2011).

## 2.2 FUNGOS E MICOTOXINAS

Microrganismos são onipresentes nos ecossistemas terrestres, local em que se encontram disseminados contaminando diversas cultivares de vegetais. As sementes maturadas não são exceção e estão contaminadas por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos por meio do ar, insetos, chuva, equipamentos e práticas agronômicas.

Sendo assim, cereais e outros cultivos são suscetíveis ao ataque fúngico que, por sua vez, pode ocorrer tanto no campo como no armazenamento (MOLINIE et al., 2005; MAGAN, ALDRED, 2007).

### **2.2.1 Fungos**

Fungos, também denominados mofos ou bolores, são microrganismos eucarióticos, multicelulares e filamentosos. É de conhecimento secular que a atividade de fungos ocasiona alterações no sabor e na qualidade dos alimentos. Algumas destas alterações são desejáveis, como na fabricação de queijos. Todavia, em muitos casos, os fungos podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, causados por diferentes graus de deterioração (MAZIERO, BERSOT, 2010).

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

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

Há uma enfermidade de fungos de campo, sendo os mais representativos *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*; são chamados de fungos de campo porque invadem as sementes e grãos antes da colheita, enquanto as



plantas estão em crescimento no campo. A microbiota fúngica é variável em função da espécie vegetal, localização geográfica e condições climáticas. Os fungos de armazenagem compreendem cerca de 10 a 15 grupos de espécies de *Aspergillus* (dos quais somente cinco ou seis são conhecidos como de deterioração) e várias espécies de *Penicillium*. Invadem os grãos e ocorrem normalmente no armazenamento; não invadem de forma intensa os grãos antes da colheita. Algumas espécies de *Penicillium* são fungos de campo e outras são de armazenagem. Encontram-se em grande número no ar, poeira, solo e nos resíduos de grãos e se desenvolvem tão logo estejam em condições adequadas de umidade e temperatura (SCUSSEL, 2002).

Além das espécies de fungos deteriorantes, os quais são considerados indicadores da qualidade de sementes e grãos armazenados, existem outra classe de fungos (também de campo ou de armazenagem) muito importantes por causarem danos à saúde, são os fungos micotoxigênicos. Alguns gêneros de fungos de campo (principalmente *Fusarium*) e de armazenagem (*Aspergillus* e *Penicillium*) podem produzir toxinas, denominadas genericamente de micotoxinas. Estes fungos, mesmo quando seu desenvolvimento não é acentuado, podem produzir estes compostos. Ainda, diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina (SCUSSEL, 2002; MAZIERO, BERSOT, 2010).

### **2.2.2 Micotoxinas**

Para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxinas são necessárias condições favoráveis de diversos fatores tais como umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox. A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. Isto porque a maioria das micotoxinas são termoestáveis, resistindo a determinados

tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (MAZIERO, BERSOT, 2010).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma grande variedade de espécies de fungos que causam as perdas nutricionais e representam um risco significativo para a cadeia alimentar. Plantas de cereais podem ser contaminadas por micotoxinas de duas maneiras: fungos que crescem como patógenos em vegetais ou em vegetais durante o período de armazenagem. Sendo assim, os cereais contaminados podem representar uma fonte direta de exposição humana, pelo seu consumo direto, ou uma fonte indireta através do consumo de produtos derivados de animais (rim, fígado, leite e ovos) alimentados com ração contaminada (DUARTE, PENA, LINO, 2010; MANKEVICIENÉ et al., 2011).

A ingestão de alimentos que contenham micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde animal e humana. Tais efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos quais está exposto. Muitas destas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso frequentemente os mais atingidos (MAZIERO, BERSOT, 2010).

Em geral, as micotoxinas são categorizadas por espécies de fungos, estrutura e/ou modo de ação. Deve-se notar, no entanto, que uma única espécie de fungo pode produzir uma ou várias micotoxinas e cada micotoxina isolada pode ser produzida por diferentes espécies de fungos. Por exemplo, as aflatoxinas (AFLs) são produzidas por várias espécies de fungos, têm inúmeras variações estruturais, e têm diferentes modos de ação dependendo do animal-alvo (HUSSEIN, BRASEL, 2001).

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

A *Food and Agriculture Organisation of the United Nation* (FAO) estima que pelo menos 25 % dos grãos de cereais do mundo estão contaminados por micotoxinas. Estas micotoxinas, por sua vez, podem causar prejuízos econômicos por diversos fatores, tais como perdas diretas de produtos agrícolas, mortalidade de animais, doenças em humanos, diminuição da produtividade agrícola e pecuária, custos indiretos de sistemas de controle, rejeição ou desvalorização de produtos pelo mercado, queda na exportação e aumento da importação, entre outros (SCUSSEL, 2002; LIU, GAO, YU, 2006).

### **2.2.3 Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e micotoxinas**

Segundo Scussel (2002), os fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas são classificados em três categorias: físicos, químicos e biológicos, sendo que estes estão relacionados às condições do próprio grão e do ambiente que o envolve. Os mais importantes compreendem: conteúdo de umidade, umidade relativa (UR), temperatura, linhagem do fungo contaminante e competição microbiana. Também o período de armazenagem, impurezas (restos da planta, poeira, casca e pedaços de grãos), insetos e ácaros (danos), condições dos grãos (grãos com danos mecânicos e/ou visualmente alterados), fungicidas, composição do substrato, variedades resistentes e o grau de contaminação podem interferir na proliferação de fungos e na formação das micotoxinas.

Os fungos de campo exigem alta umidade para se desenvolverem: conteúdo de umidade em equilíbrio com UR de 90 a 100 %, que no cereal significa um conteúdo de 22 a 23 % em peso úmido ou 30 a 33 % em peso seco. Todos os fungos de armazenagem possuem habilidade de crescer em materiais onde a umidade está em equilíbrio com umidade relativa de 70 a 90 %, ou conteúdo de umidade em cerca de 15 %. A temperatura é menos restritiva no que diz respeito ao crescimento fúngico (e à

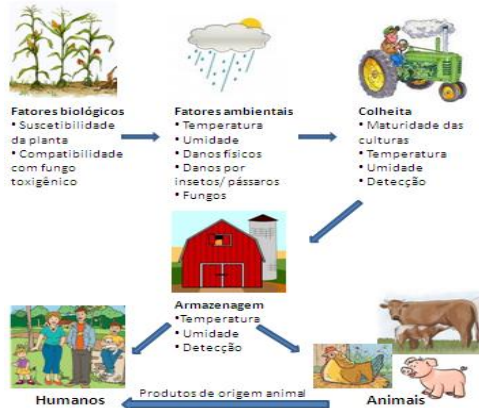
produção de toxinas), sendo que em países de clima tropical, a temperatura quase todo o ano é ideal para os fungos (SCUSSEL, 2002).

As matérias estranhas e/ou impurezas (partes da planta - gravetos, folhas-, cascas, espigas, grãos deteriorados, restos de grãos, poeira, resíduos de insetos, entre outros materiais) presentes tanto nos lotes de grãos quanto na poeira que envolve o ambiente de armazenagem, podem ser responsáveis por deterioração de lotes inteiros já que esta mistura favorece a proliferação de fungos e toxinas. Já os danos mecânicos ou biológicos provenientes do ataque de insetos e roedores nos grãos favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração de fungos no interior altamente nutritivo desses substratos, levando ao rápido desenvolvimento dos fungos e, consequentemente, ao aumento da produção de micotoxinas. O desenvolvimento de fungos também depende da composição atmosférica gasosa do ambiente em que os grãos estão inseridos, sendo que podem crescer em baixas concentrações de oxigênio ( $O_2$ ), sendo afetados somente a concentrações inferiores a 0,2 %; portanto, misturas de gases podem ser usadas para reduzir a concentração de  $O_2$  (SCUSSEL, 2002). A Figura 5 esquematiza os fatores que interferem na ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar, segundo Paterson e Lima (2010).

Ainda que muitos são os anos de pesquisa e da introdução de boas práticas agrícolas na produção de alimentos e boas práticas de fabricação na cadeia de armazenagem e distribuição de cereais, micotoxinas continuam a ser um problema. Considerando que estas são difíceis de evitar e geralmente não são removidas ou degradadas pelo processamento industrial, o monitoramento da cadeia de produção é essencial para avaliar os riscos aos quais os consumidores são expostos, já que o impacto dessas toxinas naturais na saúde humana e animal é bastante ampla. Desta forma, a contaminação mundial de alimentos e rações com micotoxinas corresponde a um problema significativo, sendo que estudos têm demonstrado extensa contaminação por micotoxinas, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento

(DUARTE, PENA, LINO, 2010; MORENO et al., 2009; NUNES et al., 2003; ZAIN, 2011).

Figura 5 - Fatores que interferem na ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar.



FONTE: Paterson, Lima (2010).

## 2.2.4 Legislação

Devido aos efeitos graves que as micotoxinas podem causar nos seres humanos e animais, muitos países têm implementado regulamentos sobre micotoxinas em alimentos e rações para proteger sua saúde (IBÁÑEZ-VEA et al., 2011).

Os limites máximos estabelecidos por legislações para uma ou mais micotoxinas variam de acordo com o país e características do alimento que é consumido e/ou importado e/ou exportado (SCUSSEL, BEBER, SOUZA, 2010).

No Brasil, até o ano de 2010, os limites para micotoxinas eram estabelecidos somente para AFLs por meio da Resolução N° 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, a qual estabelecia o limite aceitável de 30 µg / kg de AFLs para alimentos em geral. Em 2002, por meio da

Resolução N° 274/2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) este limite passou para 20 µg / kg. Contudo, em fevereiro de 2011 entrou em vigor uma nova Resolução (N° 07, de 18 de Fevereiro de 2011 desenvolvida pela Agência ANVISA), conforme indicado no Quadro 1. Esta Resolução apresenta limites de aplicações imediatas e de aplicações previstas para os próximos anos pares; é mais completa que a versão anterior e contempla diversas classes de alimentos e várias das micotoxinas já anteriormente contempladas por outras legislações de referência, tais como as dos Estados Unidos e de diversos países europeus (SCUSSEL, BEBER, SOUZA, 2010).

Quadro 1 - Limites máximos tolerados nacionais de micotoxinas segundo a Resolução RDC n° 07, ANVISA, 2011

MICOTOXINAS	ALIMENTO	DATA DE APLICAÇÃO	LMT (µg/kg) <sup>a</sup>
2011			
Aflatoxina M <sub>1</sub>	Leite fluído		0,5
	Leite em pó		5
	Queijos		2,5
Aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> )	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada		5
	Feijão		5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas		10
	Frutas desidratadas e secas		10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto		20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto		10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior		15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)		1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância		1
	Amêndoas de cacau		10
	Produtos de cacau e chocolate		5
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham		20

	uma ou mais das especiarias acima indicadas	
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolas de milho	20
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	2
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gingibre) Curcuma longa (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	30
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
	Produtos de cacau e chocolate	5,0
	Amêndoa de cacau	10
	Frutas secas e desidratadas	10
Deoxinivalenol	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Fumonisinias (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> )	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Zearalenona	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20
Patulina	Suco de maçã e polpa de maçã	50
Aplicação em janeiro de 2012		
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	2000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	1750
Fumonisinias (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> )	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000

Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200
	Arroz beneficiado e derivados	200
	Arroz integral	800
	Farelo de arroz	1000
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	300
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	400
Aplicação em janeiro de 2014		
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Deoxinivalenol	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
Fumonisinias (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> )	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400
Aplicação em janeiro de 2016		
Deoxinivalenol	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750
Fumonisinias (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> )	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000
Zearalenona	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

<sup>a</sup> limite máximo de tolerância

FONTE: Brasil (2011).



O arroz e seus produtos passam a ser contemplados na nova Resolução brasileira, que estabelece LMTs para quatro micotoxinas deste grupo de alimentos: AFLs, ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZON). Em relação às AFLs (somatório das aflatoxinas B<sub>1</sub> B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> – AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente), foi determinado um LMT de 5 µg / kg para cereais e produtos de cereais para aplicação imediata. Também para aplicação imediata, são determinados os LMTs de 10 µg / kg para OTA em cereais e produtos de cereais e 750 µg / kg para DON em arroz beneficiado e derivados.

A partir de 2012 foram previstos LMTs ajustes para DON e inclusão de nova micotoxina na resolução: (a) LMT de 2000 µg / kg para DON em farelo de arroz e de 1750 µg / kg em cereais e produtos de cereais; (b) inclusão de ZON com LMT de 200 µg / kg para cereais e produtos de cereais, arroz beneficiado e derivados, 800 µg / kg para arroz integral e 1000 µg / kg para farelo de arroz.

As micotoxinas OTA e DON apresentam novo reajuste na Resolução brasileira previsto para 2014: LMT de 20 µg / kg para OTA em cereais para posterior processamento e LMT de 1500 µg / kg para DON em farelo de arroz e 1250 µg / kg em cereais e produtos de cereais. Para 2016 o LMT de DON em farelo de arroz é determinado em 1000 µg / kg e 750 µg / kg em cereais e produtos de cereais; neste mesmo ano, ZON apresenta LMTs estabelecidos de 100 µg / kg para cereais e produtos de cereais, arroz beneficiado e derivados, 400 µg / kg para arroz integral e 600 µg / kg para farelo de arroz.

O Mercosul estabelece limites para outras micotoxinas além das AFLs usualmente contempladas e os níveis são mais exigentes que a legislação brasileira da década de 70, mas não tão completa como a nova Resolução determina. Estas determinações são empregadas na comercialização entre os países desse Bloco e são apresentadas no Quadro 2 (SCUSSEL, BEBER, SOUZA, 2010).

Quadro 2 - Legislação para micotoxinas em alimentos e rações na América Latina.

GRUPO/ PAÍS	ALIMENTO	MICOTOXINA	LMT (µg/kg)
Mercosul	Leite fluído	AFM <sub>1</sub>	0,5
	Leite em pó		5,0
	Milho em grão	AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	20,0
	Farinhas ou sêmolas de milho		
	Amendoim		
Pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim)	AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	20,0	
Argentina	Alimentos infantis	AFB <sub>1</sub>	zero
	Amendoim, milho e subprodutos	AFB <sub>1</sub>	5
		AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	20
	Farelo de soja	AFB <sub>1</sub>	30
	Leite fluído e em pó	AFM <sub>1</sub>	0,05
	Produtos lácteos	AFM <sub>1</sub>	0,5
Chile	Ração animal	AFB <sub>1</sub>	20
		AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	50
Colômbia	Cereais (sorgo, milheto)	AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	30
	Sementes oleaginosas		10
	Rações para gado		50
	Sementes de gergelim		20
	Alimentos para aves		20
Peru	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	10
Uruguai	Alimentos e especiarias	AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	20
	Produtos de soja, amendoim, frutas		30
	Cacau em grão		10
	Alimentos infantis, industrializados		3
	Leite e produtos lácteos:	AFM <sub>1</sub>	0,5
	Milho e cevada	Zearalenona	200
	Sucos de frutas	Patulina	50
	Arroz, cevada, feijões, café e milho	Ocratoxina A	50
	Ração animal	Alcalóides do ergot	450
Venezuela	Farinha de arroz	AFB <sub>1</sub> +AFB <sub>2</sub> +AFG <sub>1</sub> +AFG <sub>2</sub>	5
	Rações		20

<sup>a</sup> limite máximo de tolerância

FONTE: Mercosul, 2002; Scussel (2003) ; [www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)

A União Européia possui a legislação mais restrita para micotoxinas em alimentos e contempla o maior número destes compostos. Neste, por exemplo, todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo produtos derivados de sua transformação, estão limitados a apresentar no máximo 2 e 4  $\mu\text{g} / \text{kg}$  de AFB1 e AFLs, respectivamente. Estes limites correspondem a níveis abaixo dos limites estabelecidos mesmo pela nova Resolução brasileira (SCUSSEL, BEBER, SOUZA, 2010).

## 2.3 CONTAMINAÇÃO DO ARROZ POR FUNGOS E MICOTOXINAS

O cultivo de arroz é realizado em regiões que apresentam calor necessário e umidade abundante ideais para o crescimento de fungos, inclusive toxigênicos. Estas condições típicas de regiões subtropicais propiciam a contaminação micotoxicológica, principalmente no campo e na colheita, situação na qual o teor de umidade não é controlado (GONZÁLEZ et al., 2006; DUARTE, PENA, LINO, 2010).

### 2.3.1 Ocorrência de fungos e micotoxinas em arroz

Durante o período de armazenamento, o crescimento de fungos é um grande problema que causa perda de germinação e valor nutricional e envolve o potencial de produção de micotoxinas. Vários estudos demonstram que arroz com casca apresenta níveis consideráveis de contaminação por fungos, adquirida primeiramente antes e durante a colheita e depois durante o período de armazenamento, sendo que a distribuição dos gêneros predominantes depende, principalmente, do tipo de solo e técnicas de colheita empregados (TONON et al., 1997).

Um dos problemas mais graves na qualidade do arroz é a presença de micotoxinas, que são produzidas por diferentes

espécies e gêneros de fungos. O arroz pode ser infectado com fungos de campo tais como as espécies de *Fusarium*, enquanto no campo, e pode ser degradado por fungos de armazenamento como os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* durante o período de armazenagem. Os três gêneros citados são considerados os mais significativos e importantes em grãos e alimentos, não só devido à sua capacidade de produzir diversas micotoxinas diferentes, tais como a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), fumonisina B<sub>1</sub>, ocratoxina A (OTA), tricotecenos e zearalenona (ZON), mas também por causa de sua ubiquidade na natureza. Ainda, vários estudos em todo o mundo já reportaram a ocorrência de uma vasta diversidade de micotoxinas em arroz (PARK et al., 2005; NGUYEN et al., 2007; TANAKA et al., 2007).

A falta ou precariedade do emprego de Boas Práticas Agrícolas, bem como as condições tropicais de temperatura e umidade elevadas do Brasil, propiciam o desenvolvimento fúngico no arroz, já que este cereal constitui um ótimo substrato para fungos, principalmente por ser rico em carboidratos. Vários estudos em todo o mundo demonstram que o arroz não só apresenta níveis consideráveis de micobiota fúngica, mas também de contaminação por micotoxinas. Embora seja menos comum em arroz do que em outros cereais, a contaminação por micotoxinas tais como ZON, AFLs e OTA neste cereal vem sendo reportada em diversas partes do mundo (DORS, PINTO, BADIALE-FURLONG, 2009; HOELTZ et al., 2009; PARK et al., 2005).

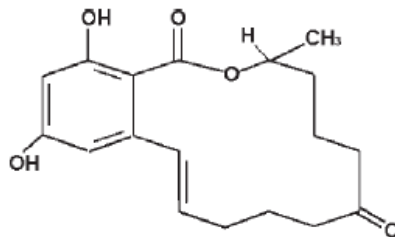
O fato de o arroz ser um alimento de consumo quase diário pela maioria da população brasileira, torna-se importante o conhecimento dos níveis de contaminação fúngica e micotoxicológica, bem como a identificação dos mesmos, para posterior avaliação das possíveis causas da contaminação, dos riscos à saúde do consumidor e possivelmente tomada de medidas efetivas, no sentido de garantir a segurança alimentar da população (NUNES et al., 2003).

### 2.3.2 Zearalenona

A ZON é uma micotoxina estrogênica produzida por diferentes espécies do gênero *Fusarium*. Em comum com outras toxinas produzidas por *Fusarium* spp, ZON é associada principalmente com culturas de cereais, nomeadamente: milho; cevada; aveia, trigo, arroz, sorgo e seus produtos. Ainda que esta é considerada uma micotoxina de campo, há evidências de que esta micotoxina também possa ser produzida em grãos já colhidos (ALLDRICK, 2004; ZINEDINE et al., 2007).

Ainda que a ZON é a micotoxina estrogênica mais estudada, ela é membro de um grande e variado grupo de compostos (estrogênicos) de estrutura semelhante e com propriedades farmacológicas. A ZON (3,4,5,6,9,10-hexahidro-14,16-diidroxí-3-metil-1H-2-benzoxi-ciclo-tetradecin-1,7(8H)-diona;  $C_{18}H_{22}O_5$  (Fig. 6), corresponde a uma micotoxina não esteroidal altamente termoestável produzida por certas cepas de várias espécies do gênero *Fusarium*, incluindo *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, e *F. moniliforme*. Tal como acontece com outras micotoxinas, apenas algumas cepas de certas espécies podem produzir ZON (ALLDRICK, 2004).

Figura 6 - Estrutura química da zearalenona.



FONTE: Alldrick (2004).

Zearalenona tem uma baixa toxicidade aguda oral (valores de  $DL_{50}$  de 4000 a 20.000 mg / kg de peso corporal), sendo que em termos de toxicidade subaguda ou subcrônica, os efeitos da ZON parecem refletir sua capacidade de se ligar aos

receptores de estrogênio, levando a alterações no trato reprodutivo e uma variedade de sintomas, incluindo: diminuição da fertilidade, aumento da reabsorção embrionária; e redução da ninhada em animais; para humanos são poucos os dados disponíveis. A *International Association on Research of Cancer* (IARC) concluiu que havia evidência limitada para avaliar a capacidade carcinogênica de ZON. Contudo, a *European Union of Scientific Committee on Food* (EUSCF) observou a ocorrência de tumores em estudos clínicos devido às características estrogênicas da micotoxina. Atualmente, ingestão diária tolerável de ZON proposta pela FAO é de 0,5 mg / kg de peso corporal por dia (ALLDRICK, 2004; ZINEDINE et al., 2007).

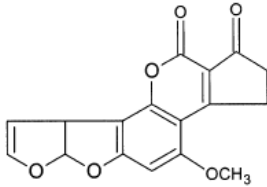
### 2.3.3 Aflatoxinas

As AFLs correspondem ao grupo mais estudado de micotoxinas e são produzidas por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, correspondendo a metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, principalmente. Esses fungos sobrevivem em uma ampla gama de ambientes e podem ser encontrados no solo, em restos de plantas e animais, e em grãos e sementes. Estes dois fungos são responsáveis pela deterioração dos grãos armazenados em todo o mundo, sendo o *Aspergillus flavus* a principal causa de contaminação por AFLs no período pré-colheita de diversas culturas (HUSSEIN, BRASEL, 2001; LIU, GAO, YU, 2006).

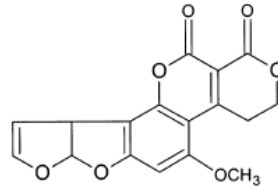
As AFLs são caracterizadas pela ligação dihidrofurano ou tetrahydrofurano fundido a um anel de cumarina (Fig 7). Há mais de 20 derivados isolados AFs produzido por várias espécies de fungos, sendo que as mais importantes são produzidas por *Aspergillus flavus*, que produz AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> e *Aspergillus parasiticus*, que produz AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. Estas AFLs, assim como muitos outros compostos heterocíclicos, fluorescem e são distinguidos por suas propriedades de fluorescência. Ambos AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> formam fluorescência azul e

AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> formam fluorescência verde-amarelada sob luz ultravioleta (HUSSEIN, BRASEL, 2001).

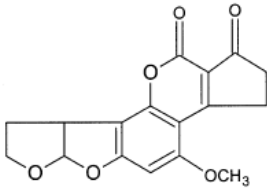
Figura 7 - Estrutura química de aflatoxinas B (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>) à esquerda e de aflatoxinas G (AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) à direita.



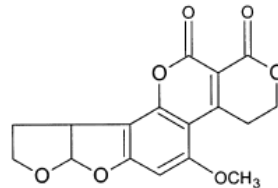
Aflatoxin B<sub>1</sub>



Aflatoxin G<sub>1</sub>



Aflatoxin B<sub>2</sub>



Aflatoxin G<sub>2</sub>

FONTE: Hussein, Brasel (2001).

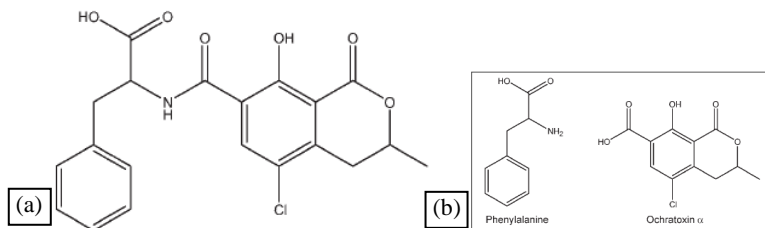
A toxicidade das AFLs decresce na seguinte ordem: AFB<sub>1</sub> > AFG<sub>1</sub> > AFB<sub>2</sub> > AFG<sub>2</sub> (SCUSSEL, 2002). Entre as aflatoxinas, AFB<sub>1</sub> é a forma mais tóxica para os mamíferos e apresenta propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas, é classificada no grupo classe 1 da IARC e causa danos tais como hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunossupressão e carcinoma hepático (REDDY, REDDY, MURALIDHARAN, 2009).

### 2.3.4 Ocratoxina A

A OTA foi originalmente isolada de *Aspergillus ochraceus* e é o composto mais tóxico do grupo das ocratoxinas. A OTA corresponde a um metabólito de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos capazes de crescer em climas e plantas diferentes, sendo que sua contaminação de OTA pode ocorrer em todo o mundo em diversas culturas de alimentos, inclusive cereais, produtos que representam a fonte dietética mais importante desta micotoxina, contribuindo em cerca de 50 % da sua ingestão (AISH et al., 2004; DUARTE, PENA, LINO, 2010).

A estrutura química da OTA consiste de um 5'-cloro-3,4-dihidro fração-3-metil-isocumarina ligado à L-fenilalanina, conforme representado pela Figura 8 (AISH et al., 2004).

Figura 8 - Estrutura química da (a) ocratoxina A e (b) fenilalanina e ocratoxina  $\alpha$ .



FONTE: Aish et al.(2004).

Os efeitos bioquímicos da OTA recorrem principalmente a partir de sua semelhança estrutural com o aminoácido essencial, fenilalanina. O principal efeito parece ser a inibição da síntese de proteínas, embora os efeitos secundários, tais como a inibição da síntese de RNA e DNA também têm sido implicados no seu mecanismo de ação (AISH et al., 2004).

Esta micotoxina demonstra efeitos nefrotóxicos, teratogênicos, embriotóxicos, genotóxicos, neurotóxicos, imunossupressivos e carcinogênicos, sendo classificada como



pertencente ao grupo 2B da IARC (DUARTE, PENA, LINO, 2010).

## 2.4 ARMAZENAGEM COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO DA QUALIDADE

No momento da maturação dos grãos está a expressão máxima de sua qualidade, tanto metabólica como nutritiva. Depois da maturação, portanto, não existem possibilidades de melhorias; então, durante o armazenamento, o que se pode buscar é a sua preservação, mantendo a qualidade mais próxima possível da que existe no momento em que os grãos são armazenados (ELIAS, OLIVEIRA, ANTUNES, 2009).

A armazenagem é uma das operações pela qual os grãos passam na sua cadeia produtiva, e apresenta como pressuposto básico a guarda e a conservação dos produtos armazenados. Armazenar, então, compreende guardar e conservar o produto, diminuindo ao máximo as perdas e utilizando-se da melhor maneira possível as técnicas existentes disponíveis (BIAGI, BERTOL, CARNEIRO, 2002; REZENDE, 2002)

### 2.4.1 Tipos de armazenagem

De acordo com Biagi, Bertol e Carneiro (2002), rede armazenadora de grãos corresponde ao sistema de armazenagem que permite receber as quantidades produzidas das safras agrícolas, retendo a produção que não encontra comercialização imediata e mantendo as características qualitativas e quantitativas até efetuar a distribuição para consumo ou comercialização. Essa rede é composta por unidades armazenadoras que possuem estrutura adequada às suas finalidades específicas e devem ser localizadas e dimensionadas de acordo com as características de operação estabelecendo um fluxo lógico, de atendimento ao escoamento da safra, com manutenção da qualidade dos grãos até

que esses produtos cheguem ao consumo humano, animal ou industrial.

Segundo Weber (1998), as unidades armazenadoras podem se classificar segundo a entidade a que pertencem e a sua localização. Quanto a entidade a que pertencem, estas podem ser governamentais, cooperativas ou particulares; e podem se localizar ou pertencerem ao produtor, às coletoras, aos subterminais ou a terminais.

A armazenagem de grãos propriamente dita pode ser feita de duas formas: a granel (sem embalagem) ou acondicionadas em volumes (sacarias). Verifica-se um aumento da armazenagem a granel em relação à armazenagem em sacarias devido a várias vantagens que o método a granel apresenta sobre o em sacaria (GIORDANO, 2009).

As unidades armazenadoras para grãos ensacados é bastante empregada no armazenamento de produtos com maior valor agregado, tais como café, farinhas, sementes, entre outros. Tal metodologia de armazenamento apresenta vantagens e desvantagens em relação ao armazenamento a granel. As vantagens compreendem: fácil identificação e separação de lotes ou parte deles que sofram contaminação ou fermentação; grande flexibilidade de armazenamento, ou seja, capacidade de armazenar produtos diferentes com características diferentes; necessidade de pouca técnica para manuseio e armazenamento; maior tolerância à umidade contida nos grãos; baixo investimento de capital; fácil caracterização do produto, propiciando o armazenamento por lotes de qualidades e/ou valores distintos. As desvantagens correspondem a limitada mecanização e automação das operações; aumento da utilização da mão-de-obra; necessidade da utilização de sacarias, material caro e com curto tempo de vida útil; difícil controle de pragas devido ao fácil acesso ao produto; necessidade de desensacar e re-ensacar o produto para efetuar secagem ou outra operação; aproveitamento não otimizado de local, baixa velocidade nas operações de carga, descarga, expurgo, entre outras (BIAGI, BERTOL, CARNEIRO, 2002; GIORDANO, 2009).

As unidades armazenadoras para grãos a granel têm se difundido principalmente pela rapidez com que os grãos podem ser trabalhados. Geralmente, este armazenamento é feito em silos, contudo também pode ser feito em armazéns graneleiros ou granelizados, porém em menor frequência. Suas vantagens correspondem a menor tempo de manipulação do produto; dispensa sacarias; possibilita elevado índice de utilização da mecanização e automação; utilização de menos mão-de-obra; grande velocidade/agilidade de operações; dificuldade de acesso das pragas ao produto; devido ao aproveitamento vertical, aumenta a capacidade de armazenagem; evita a operação de ensacamento e desensacamento do produto; possibilita a aeração do produto, desfazendo pontos de aumento de taxa respiratória. As desvantagens compreendem: investimento inicial alto; menor tolerância na umidade dos grãos; necessita de mão-de-obra especializada para o manuseio e armazenagem de grãos; dificuldade de individualização dos lotes por quantidade e/ou valores; pontos de infestação podem comprometer todo o lote e baixa flexibilidade de armazenamento (WEBER, 1998; BIAGI, BERTOL, CARNEIRO, 2002).

As unidades armazenadoras metálicas ou silos metálicos são produzidos e instalados em larga escala, sendo que sua versatilidade, facilidade de ampliação e qualidade têm sido preferidos para obras de pequeno, médio e grande porte. Além da versatilidade de separação por lotes, tipos e variedades que o sistema convencional de sacaria permite, os silos metálicos oferecem condições de armazenagem por períodos mais longos que os armazéns, pois possibilitam um controle de focos de deterioração mais eficiente, apresentam menor custo de mão-de-obra, maior velocidade de recebimento e expedição e possibilidade de realização de expurgo, assim como oferecem segurança, acesso, boa distribuição dos grãos e medidas de temperatura e ventilação, além de outros importantes e convenientes acessórios (WEBER, 1998; BIAGI, BERTOL, CARNEIRO, 2002).

Estes silos podem ser construídos de chapas metálicas (silos metálicos), de concreto, de madeira e de alvenaria. Os silos

metálicos vêm sendo amplamente utilizados e apresentam como vantagem a possibilidade de montagem e desmontagem rápida, possibilidade de mudança de local e fundações mais simples e baratas, gerando um menor custo por tonelada; e maior flexibilidade operacional, devido a possibilidade de variação da capacidade das células. Por outro lado, este tipo de silo apresenta maior custo com manutenção, menor capacidade de vedação com possível infiltração de água e vazamento de gases de expurgo, maior influência do ambiente em relação ao ambiente interno (BIAGI, BERTOL, CARNEIRO, 2002; GIORDANO, 2009).

Atualmente, o armazenamento em silos ou em armazéns equipados com eficientes sistemas de termometria, aeração e outros recursos para manutenção da qualidade dos grãos são as formas mais empregadas por cooperativas, agroindústrias e grandes produtores (ELIAS, OLIVEIRA, ANTUNES, 2009). A Figura 9 demonstra a armazenagem em silos metálicos, comumente empregados na armazenagem de arroz.

Figura 9 - Armazenagem em silos metálicos.



FONTE: Darabas (2007).

#### **2.4.2 Controle das condições de armazenagem**

De maneira geral, as operações de armazenamento e de manutenção dependem do próprio sistema de conservação e podem incluir movimentação, acondicionamento, controle termométrico, aeração, transilagem, intra-silagem, expurgo,

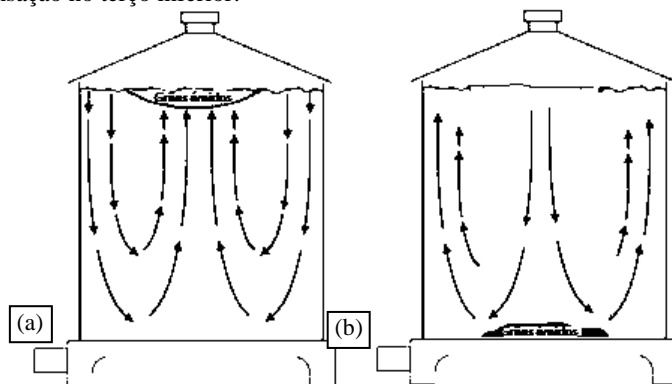
combate roedores, proteção contra o ataque de pássaros e retificação tanto da secagem como da limpeza. Os sistemas de manutenção a aplicar, sua periodicidade e sua intensidade ficam na dependência de resultados observados ao longo do período de armazenamento, das avaliações de controle de qualidade obtidas em análises e testes específicos. Dentre outros sistemas de manutenção, devem ser considerados parâmetros como variação de umidade relativa e temperatura do ar, umidade e temperatura dos grãos, grau de desenvolvimento de microrganismos, presença de insetos, ácaros, roedores e outros animais (ELIAS, OLIVEIRA, ANTUNES, 2009).

No que diz respeito aos parâmetros de controle mais especificamente para fungos, duas são as condições que mais se relacionam com seu desenvolvimento: umidade e temperatura. As condições que favorecem uma umidade relativa (UR) elevada, com conseqüente proliferação de fungos inclui clima chuvoso e colheita dos grãos com umidade elevada e armazenados com pouca ventilação. As condições que favorecem um conteúdo de umidade heterogêneo (devido a secagem deficiente) durante a armazenagem, com conseqüente proliferação de fungos inclui: produto com alto conteúdo de umidade; presença de umidade secundária devido a precipitação ou absorção dos vapores de água; difusão do calor e umidade de grãos não completamente secos; atividade de microrganismos, aumentando a temperatura e o conteúdo de umidade em grãos não completamente secos; mistura de lotes de grãos com umidades diferentes e presença de insetos. Contudo, conteúdo de umidade baixo não assegura armazenagem eficiente, pois alguns outros fungos podem se desenvolver e liberar calor e água. Cuidados importantes para atingir umidade desejada correspondem a secagem homogênea; evitar excesso de quebra de grãos durante a colheita, secagem e armazenagem; controle de roedores e insetos, manter ambiente bem ventilado e realizar secagem a níveis inferiores da umidade crítica para o desenvolvimento destes microrganismos (SCUSSEL, 2002).

Ainda, com a presença de diferenças de temperatura na massa de grãos (em decorrência das alterações de temperatura

ambiente), ocorre transferência de umidade, sendo que vapores de água de camadas mais quentes translocam-se para as mais frias e condensa, conforme indicado na Figura 10, favorecendo a proliferação fúngica. Portanto, o uso da aeração juntamente com o acompanhamento do conteúdo de umidade leva à melhor conservação dos grãos, já que a aeração uniformiza a temperatura dos grãos, evitando a transferência de umidade. Este método de controle é bastante importante, já que a refrigeração de silos é considerada bastante dispendiosa. Ainda, em países de clima tropical, a temperatura quase todo ano é ideal para fungos e os grãos armazenados em silos sofrem com a ação do sol pelo aquecimento das paredes dos silos. Os grãos próximos às paredes são aquecidos e transferem calor para outras regiões do silo, carregando também vapor de água. Quanto maior for a diferença entre as camadas frias e quentes, maior será a movimentação do ar aumentando a migração de umidade para as camadas frias e favorecendo, por conseguinte, a proliferação de fungos (SCUSSEL, 2002).

Figura 10 - Representação de correntes convectivas e transferências de calor e água no interior dos silos: (a) temperatura externa menor e condensação no terço superior, (b) temperatura externa maior e condensação no terço inferior.



FONTE: adaptado de Elias (2009).

### 2.4.3 Problemas na armazenagem

Os grãos, apesar das características morfológicas de resistência e rusticidade próprias de cada espécie, estão sujeitos aos ataques de insetos, ácaros, microrganismos, roedores, pássaros e outros animais, às danificações mecânicas, às alterações bioquímicas e as químicas não enzimáticas, ou seja, estão sujeitos às ações de seus próprios metabolismos e de organismos associados, que começam desde antes do armazenamento. Este conjunto de fatores indesejáveis provoca perdas quantitativas e qualitativas pelo consumo de reservas e por modificações na composição química dos grãos, redução do valor nutritivo e desenvolvimento de substâncias tóxicas, com redução do valor comercial. A deterioração dos grãos é inexorável e irreversível; por consequência, acaba por comprometer a utilização do produto para o consumo e para a industrialização, caso não forem adotadas técnicas adequadas e métodos eficientes de conservação (ELIAS, OLIVEIRA, ANTUNES, 2009).

Dependendo das condições climáticas no momento da colheita, o grão carrega uma vasta gama de contaminantes microbianos, sendo que o tratamento pós-colheita destes cereais e os principais fatores ambientais são determinantes no impacto da interferência dos fungos na qualidade de grãos. É importante enfatizar que o grão colhido e seus microrganismos contaminantes estão vivos e respirando lentamente sob condições secas, liberando calor e água, mesmo no armazenamento seguro. Assim sendo, um manejo pós-colheita precário pode levar à rápida deterioração da qualidade nutricional dos grãos (MAGAN, ALDRED, 2007).

Esta atividade microbiana em grãos (a) pode causar efeitos indesejáveis, tais como descoloração dos grãos; (b) contribui para o aquecimento e as perdas de matéria seca por meio da utilização de carboidratos como fontes de energia, lipídios e proteínas, podendo alterar sua digestibilidade; (c) pode produzir metabólitos voláteis formando odores não desejados; (d) pode reduzir a qualidade de seus produtos industrializados ou

derivados; (e) geralmente afeta o uso na alimentação animal ou como semente por reduzir a germinação. Ainda, estes organismos filamentosos de deterioração tais como fungos também podem produzir micotoxinas, compostos conhecidos por suas características maléficas ao organismo humano e animal (MAGAN, ALDRED, 2007).

Sendo assim, as alterações que ocorrem durante o armazenamento são refletidas em perdas qualitativas e quantitativas. As quantitativas são mais facilmente observáveis, refletem o metabolismo dos grãos e dos organismos associados e reduzem o conteúdo da matéria seca dos grãos. Já as qualitativas ocorrem devido, sobretudo, às reações químicas e enzimáticas, à presença de materiais estranhos, impurezas e ao ataque microbiano, resultando em perdas de valor nutricional, germinativo e comercial, com a possibilidade da formação de substâncias tóxicas no produto armazenado, se o processo não for adequadamente conduzido (ELIAS, OLIVEIRA, ANTUNES, 2009).

A agroindústria brasileira vem se destacando com o aumento da produção, principalmente de grãos, obtido mediante investimentos em novas tecnologias de plantio e colheita, além do uso de variedades mais produtivas, o que tem tornado o país um dos maiores produtores de grãos no mundo. Sendo assim, a conservação de grãos e sua proteção durante o armazenamento constituem uma necessidade social e econômica. No entanto, o Brasil não possui um sistema eficiente para armazenagem de grãos e investe pouco em novas tecnologias pós-colheita, convivendo com elevadas perdas de armazenagem (PEREIRA et al., 2008).

Muitos foram os avanços verificados na produção, contudo, estes não são acompanhados pelo que se verifica na pós-colheita. O armazenamento, principalmente na propriedade rural, é uma área relativamente nova como conhecimento e prática, mas que tem se caracterizado como gargalo na evolução da cadeia produtiva de grãos. Segundo dados da FAO (2006), cerca de 15 % da safra de arroz é perdida anualmente, principalmente durante as críticas operações pós-colheita, porém



este valor pode chegar a 50 % em regiões tropicais (DORS, PINTO, BADIALE-FURLONG, 2009; ELIAS et al., 2008; MAGAN, ALDRED, 2007).

## 2.5 OZÔNIO

Contaminação por fungos em grãos é uma das questões mais importantes que determinam a qualidade de grãos, com perdas qualitativas e quantitativas devido a ação destes microrganismos. Estes, que estão presentes nos grãos em sua superfície ou em seu interior, deterioram a qualidade nutricional dos produtos e também produzir metabólitos tais como micotoxinas, que são perigosas para a saúde humana e animal (TIWARI, et al., 2010).

O interesse no armazenamento seguro de grãos visando a redução de prejuízos qualitativos e quantitativos é expressivo. Devido a preocupações ambientais de empregar aditivos não prejudiciais ao meio ambiente e de reduzir a emissão de resíduos químicos, os novos regulamentos e legislações alimentares vêm limitando o uso de fumigantes pesticidas empregados no manejo de grãos. Este fator limita a variedade de fumigantes disponíveis para o armazenamento de grãos e, ainda, por consequência do uso repetido dos poucos agentes fumigantes regulamentados, aumenta a resistência dos organismos alvo a estes compostos (KELLS et al., 2001; TIWARI et al., 2010).

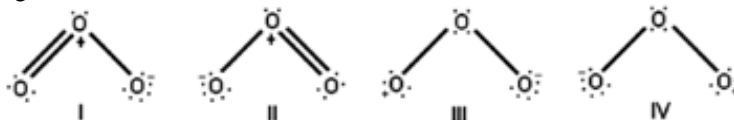
Assim sendo, surge a necessidade do desenvolvimento de estratégias alternativas ao controle de agentes indesejáveis no armazenamento de grãos. Para tanto, o ozônio (O<sub>3</sub>) tem sido efetivamente usado para controlar o crescimento de fungos e reduzir a contaminação de micotoxinas em grãos e cereais com diversas vantagens sobre os métodos tradicionais (KELLS et al., 2001; TIWARI et al., 2010).

## 2.5.1 Características e produção de ozônio

O precursor para a produção industrial de  $O_3$  é o  $O_2$ , composto abundante e inesgotável. Ozônio resulta da reorganização de átomos de moléculas de  $O_2$ , quando são submetidos a alta tensão de descarga elétrica. O produto é um gás azulado com odor pungente e fortes propriedades oxidantes. O  $O_3$  é gerado pela reação de radicais livres de oxigênio diatômico com oxigênio para formar moléculas de  $O_2$  triatômicas. Geração de radicais livres do oxigênio ocorre por quebra de fortes ligações O-O, exigindo uma entrada de energia significativa. Métodos de descarga corona podem ser usados para iniciar a formação de radicais livres de oxigênio e, assim, gerar ozônio (TIWARI et al., 2010).

Os três átomos de oxigênio na molécula de ozônio são dispostas em um ângulo obtuso em que um átomo central de oxigênio está ligado a dois átomos de oxigênio equidistantes; o ângulo formado é de aproximadamente  $116^{\circ}49'$  e o comprimento de ligação é de 1,278 Å. Quatro estruturas de ozônio são mostradas na Figura 11 (GUZEL-SEYDİM, GREENE, SEYDİM, 2004).

Figura 11 - Estruturas de ressonância da molécula de ozônio.

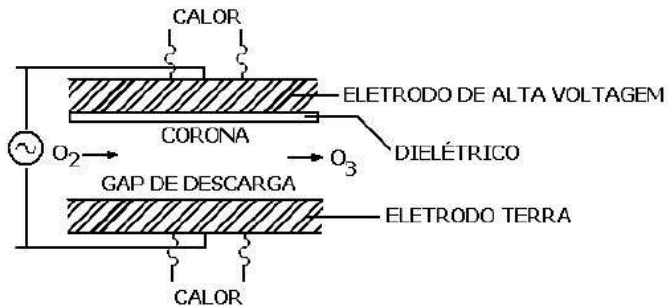


FONTE: Guzel-Seydim, Greene, Seydim (2004).

Geralmente, o método de descarga corona demonstrado na Figura 12 é usado para geração de  $O_3$  em nível comercial. Dois eletrodos, de alta tensão e baixa tensão (eletrodo terra), separados por um meio dielétrico de cerâmica oferecem uma estreita abertura de descarga. Elétrons com energia cinética suficiente (cerca de 6-7 eV) para dissociar a molécula de oxigênio colidem e uma molécula de  $O_3$  pode ser formado a

partir de cada átomo de oxigênio. Se o ar atmosférico é o gás de alimentação passado através do gerador, 1 a 3 % de  $O_3$  pode ser produzido, no entanto, uso de  $O_2$  de alta pureza, a produção de  $O_3$  pode alcançar até 16 %. O ozônio é produzido no local da operação como gás e não pode ser armazenado, já que este se degrada de volta para os átomos de oxigênio espontaneamente (TIWARI et al., 2010).

Figura 12 - Diagrama esquemático da geração de ozônio pelo método de descarga corona.



FONTE: adaptado de Guzel-Seydim, Greene, Seydim (2004).

### 2.5.2 Poder oxidante e mecanismo de ação sobre fungos e micotoxinas

Ozônio destrói microrganismos pela oxidação progressiva de componentes celulares vitais. Dois mecanismos principais foram identificados na destruição dos organismos-alvo: (a) o  $O_3$  oxida os grupos sulfidríla e aminoácidos de enzimas, peptídios e proteínas a peptídios menores; (b)  $O_3$  oxida ácidos graxos poliinsaturados para os peróxidos ácidos, sendo que ligações duplas de lipídios insaturados são particularmente vulneráveis ao ataque do ozônio. Assim, o  $O_3$  causa oxidação generalizada de proteínas celulares internas causando rápida morte celular. Morte celular também pode

ocorrer devido à potente destruição e danos aos ácidos nucleicos (GUZEL-SEYDIM, GREENE, SEYDIM, 2004).

O ozônio corresponde ao segundo agente oxidante comum mais potente, conforme descrito na Tabela 3. Esta potente capacidade de oxidação o torna muito eficaz na destruição de microrganismos e por reagir frente a diversos constituintes celulares, possui reduzida chance de desenvolvimento de resistência frente aos organismos alvo (GUZEL-SEYDIM, GREENE, SEYDIM, 2004; GRAHAM et al., 2011).

Tabela 3 - Agentes oxidantes de seus respectivos potenciais oxidativos

Agente oxidante	Potencial oxidativo (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Ácido hipocloroso	1,49
Gás cloro	1,36

mV: milivolts

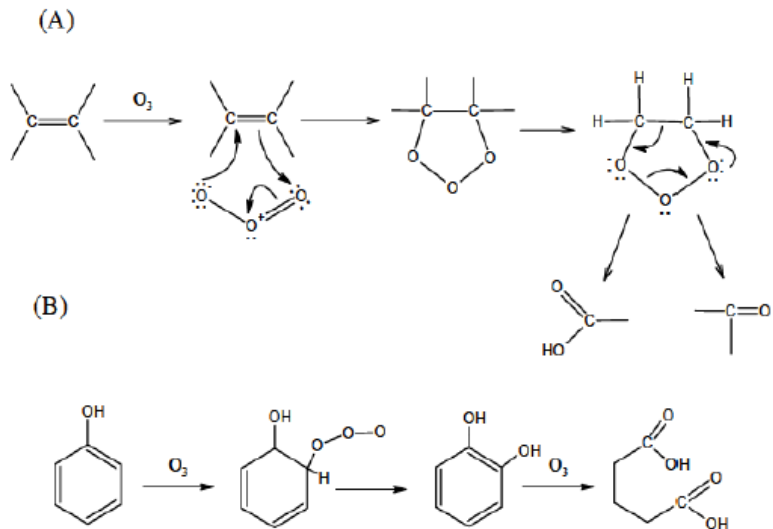
FONTE: Guzel-Seydim, Greene, Seydim (2004).

Este gás é um forte oxidante que também altera a composição química de compostos inorgânicos tais como agrotóxicos ou outros resíduos químicos. Ainda, diversos estudos já demonstraram que o O<sub>3</sub> gasoso reduz a população fúngica e a atividade biológica de uma variedade de micotoxinas, correspondendo a um método eficaz para a desinfestação e desinfecção de grãos. (MENDEZ et al., 2003; GUZEL-SEYDIM, GREENE, SEYDIM, 2004; HARDIN et al., 2010; MCDONOUGH et al., 2011; TIWARI et al., 2010; WHITE et al., 2010; YOUNG, ZHU, ZHOU, 2006; ZORLUGENIC et al., 2008).

Esta redução da atividade biológica de micotoxinas também se deve ao seu poder oxidativo. De acordo com Giordano (2009), nas reações de degradação de compostos

orgânicos, o ozônio tende a reagir preferencialmente com compostos insaturados (alquenos, alquinos, anéis aromáticos, entre outros). De fato, o  $O_3$  é o reagente clássico usado em reações orgânicas para quebrar ligações duplas carbono-carbono, via o mecanismo de Criegee (ou simplesmente ozonólise), conforme representado na Figura 13.

Figura 13 - Reação direta do ozônio com a matéria orgânica: (a) mecanismo de Criegee e (b) exemplo do ataque eletrofilico do ozônio a um composto aromático.



FONTE: Giordano (2009).

Além da degradação de hidrocarbonetos alifáticos com duplas ligações ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, a presença de estruturas de anel clorados e heterociclos de nitrogênio em micotoxinas também estão sujeitas ao ataque de  $O_3$  (TIWARI et al., 2010).

### 2.5.3 Aplicações em alimentos

Um dos importantes empregos de ozônio na agricultura corresponde ao tratamento pós-colheita de produtos agrícolas. Ozônio pode ser aplicado aos alimentos como um gás ou como em forma dissolvida na água, sendo que os principais objetivos de sua aplicação na pós-colheita são: inativação de crescimento bacteriano, prevenção da deterioração fúngica, destruição de pesticidas e resíduos químicos, bem como no controle de pragas de armazenagem (ÖZTEKIN, ZORLUGENIC, ZORLUGENIC, 2006).

Ozônio tem sido efetivamente usado para controlar o crescimento de fungos e reduzir a contaminação por micotoxinas, inclusive as AFLs, OTA e ZON com a importante propriedade de não reduzir o valor nutricional de cereais. Ainda, o O<sub>3</sub> é reconhecido desde 1997 como seguro (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) e vem sendo empregado na indústria alimentícia na degradação ou detoxificação de microrganismos ou produtos químicos (RAILA et al., 2006; DESVIGNES et al., 2008; TIWARI et al., 2010).

Ainda que o uso comercial do ozônio para o manejo de grãos não ser bem documentado, existem diversos estudos que descrevem seus potenciais benefícios tecnológicos, sendo efetivamente empregado no controle do crescimento fúngico e na redução da ocorrência de micotoxinas em grãos e em produtos a base de grãos, conforme representado no Quadro 3. Ainda, oferece vantagens ao processamento de grãos com desejadas ou mínimas alterações físico-químicas ao produto exposto a este tratamento (MCDONOUGH et al., 2011; TIWARI et al., 2010).

Quadro 3 - Aplicação de ozônio (O<sub>3</sub>) gasoso em diferentes concentrações e tempos de exposição em alimentos reportados na literatura.

Matriz	Concentração O <sub>3</sub>	Tempo de exposição O <sub>3</sub>	Reduções Observadas	Referências
<b>CEREAIS</b>				
Trigo	0,33 mg/g por min	5 min	96 % esporos de fungos	Wu et al. (2006) <i>in</i> Tiwari et al. (2010)
Cevada	0,16 mg/g	5 min	96 % esporos de fungos	Allen et al. (2003) <i>in</i> Tiwari et al. (2010)
Cevada	11 e 26 mg/g	15 min	24 e 36 % <i>Fusarium</i> , respectiv.	Kottapalli et al. (2005) <i>in</i> Tiwari et al. (2010)
Milho	50 ppm = mg/L	3 dias	63 % <i>Aspergillus</i>	Kells et al. (2001)
Milho	200 mg/min	92 horas	>95 % AFB <sub>1</sub>	McKenzie et al. (1998) <i>in</i> Zorlugenic et al (2008).
Arroz com casca, milho, trigo, soja	50 ppm = mg/L	30 dias	Sem alterações de composição química	Mendez et al. (2003)
<b>OUTROS</b>				
Figo desidratado	13,8 mg/L	15 min	100 % fungos	Zorlugenic et al (2008).
Figo desidratado	13,8 mg/L	30, 60, 180 min	48,7; 72, 4 e 95, 2 % AFB <sub>1</sub> , respectiv.	Zorlugenic et al (2008).
Pimenta vermelha	33 e 66 mg/L	60 min	80 e 93 % AFB <sub>1</sub>	Inan, Pala, Doymaz (2007)
Salsicha	1 ppm = mg/L	8 horas/dia	Baixo crescimento de <i>Aspergillus</i> , sem produzir OTA	Iacumin, Manzano, Comi (2011)

Reduções tão altas quanto  $10^3$  de microrganismos associados a grãos armazenados foram alcançadas com os tratamentos de  $O_3$ , bem como reduções significativas nos níveis de micotoxinas. Além disso, as investigações em grãos tratados com  $O_3$  indicam que este não tem impacto sobre a qualidade intrínseca do grão (MCDONOUGH et al., 2011).

Estudos anteriores que avaliaram concentrações de  $O_3$  menores que 100 ppm (partes por milhão ou mg/L) indicam que longos tempos de tratamento são necessários para controlar os insetos e fungos em grãos armazenados (MCDONOUGH et al., 2011).

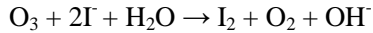
#### **2.5.4 Método de quantificação do ozônio**

Vários métodos são utilizados para quantificar o ozônio. Esses métodos podem ser classificados em físicos, químicos e físico-químicos. Os métodos físicos medem a capacidade de adsorção de radiações no espectro visível, UV ou Infravermelho. Os métodos químicos medem a formação de produtos quando o  $O_3$  reage com substâncias como o iodeto de potássio (KI) ou iodeto de hidrogênio. Os métodos físico-químicos medem o efeito físico da reação do  $O_3$  com substâncias químico luminescentes (luminol, acridium), onde se mede a luz produzida por oxidação química, o que confere maior sensibilidade ao método (CHIATTONE, TORRES, ZAMBLAZI, 2008).

Conforme Giordano (2009), medições de concentrações de  $O_3$ , tanto no *feed-gas* como no *off-gas*, em processo contínuo, via método de absorção em UV e iodométrico, permitem melhor controle operacional do sistema. O método iodométrico utilizado para a análise das amostras é quantitativo, sujeito a poucas interferências e capaz de boa precisão. O método iodométrico é o mais utilizado para a quantificação do  $O_3$  na fase gasosa, e baseia-se na oxidação do íon iodeto pelo  $O_3$ , que causa liberação



de iodo. O gás contendo  $O_3$  e oxigênio passa pela solução de iodeto de potássio, onde reage quantitativamente para produzir um mol de  $O_2$  para cada mol de  $O_3$ .



O iodo liberado é então titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio e a concentração de  $O_3$  é calculada. Esse método, muito empregado, utiliza uma solução de KI que, ao reagir com o  $O_3$ , libera íons  $OH^-$ . O pH elevado e a presença de íons hidroxila constituem fatores propícios para o início da decomposição do  $O_3$ , podendo interferir na determinação da concentração (GIORDANO, 2009).

### 2.5.5 Viabilidade de aplicação

Atualmente, o setor agrícola enfrenta o problema do baixo valor agregado de seus produtos e do alto custo de seus insumos, que podem reduzir a margem de lucro da atividade do setor agrícola. Em razão dos resultados de pesquisas que apontam o potencial do ozônio no controle de fungos e insetos-praga de grãos armazenados, este gás tem se tornado uma importante alternativa para proteção de produtos armazenados. Sua utilização na agricultura vem se tornando atraente, pois, entre outras vantagens, pode ser gerado no próprio local de uso (PEREIRA et al., 2008).

Diversos estudos demonstram a eficácia do gás  $O_3$  frente a insetos, fungos e micotoxinas durante o armazenamento de cereais. Diante destes resultados, verifica-se a necessidade de estudos detalhados sobre a viabilidade econômica desta nova tecnologia. Uma análise dessa natureza é de fundamental importância, pois traz contribuições ao setor agrícola, podendo auxiliar na tomada de decisão sobre o planejamento, administração e o retorno financeiro da atividade de armazenagem (PEREIRA et al., 2008).

Resultados do trabalho de estudo de viabilidade de fumigação de O<sub>3</sub> em grãos de milho armazenados desenvolvido por Pereira et al. (2008) demonstram estreita relação com a temperatura na qual se inicia a degradação do ozônio. Como o processo de degradação do ozônio inicia-se entre temperaturas variando de 30 a 35°C, é muito provável que o comprometimento do retorno do capital na temperatura de 30°C esteja relacionado com perdas na concentração deste gás. Dessa forma, pode-se inferir que a fumigação com O<sub>3</sub> pode se tornar economicamente viável principalmente quando a ozonização for realizada a temperaturas da massa de grãos correspondentes a faixa de 20 a 30°C.

Neste estudo de Pereira et al. (2008), foram utilizados os indicadores financeiros Valor Presente Líquido (VPL), que representa o retorno líquido gerado pelo investimento (indicado pela diferença positiva entre receitas e custos) e Taxa Interna de Retorno (TIR), que representa a taxa média de crescimento de um investimento para avaliar a viabilidade econômica da aplicação de ozônio gasoso em grãos. O VPL encontrado foi maior que zero na temperatura de 20°C em todos os períodos de armazenamento dos grãos (90, 135 e 180 dias), em que se constatou que o VPL aumentou proporcionalmente com o período de armazenamento. Quando a ozonização dos grãos foi realizada a temperatura de 30°C, o VPL foi maior que zero apenas no período de armazenamento de 180 dias. Já na temperatura de 40°C, os valores de VPL de todos os períodos de armazenamento avaliados foram menores que zero. A TIR do presente investimento aumentou proporcionalmente com o período de armazenamento quando a ozonização dos grãos foi feita na temperatura da massa de grãos de 20°C, em que as TIRs 14,33 %, 55,5 % e 76,6 % correspondem, respectivamente, aos períodos de armazenamento de 90, 135 e 180 dias. Na temperatura de 30°C, a TIR foi maior que zero apenas no período de armazenamento de 180 dias, com percentual de 15,75 %. Os valores das TIRs maiores que zero encontrados neste trabalho indicam que as receitas descontadas seriam superiores aos custos descontados, mesmo se o mercado trabalhasse com taxas

superiores a 10 % ao ano. Já na temperatura de 40°C, todas as TIRs foram negativas, indicando a inviabilidade de utilização do ozônio nesta temperatura, confirmando, assim, os resultados observados para o retorno do capital e para o VPL. Desta forma, os indicadores financeiros demonstraram rentabilidade da fumigação do gás O<sub>3</sub> quando os grãos foram armazenados durante 90, 135 e 180 dias após a ozonização realizada na temperatura da massa de grãos de 20°C.

Outros estudos realizados por vários autores também demonstram a viabilidade econômica do uso do ozônio para fumigar cereais armazenados, corroborando o uso de ozônio como fumigante de grãos de uma alternativa viável de ambas as perspectivas ambientais e econômicas (TIWARI et al., 2010).

## REFERÊNCIAS

- AISH, J. L.; RIPPON, E. H.; BARLOW, T.; HATTERSLEY, S. J. Ochratoxin A. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food – detection and control**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 307-338.
- ALLDRICK, A. J. Zearalenone. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food – detection and control**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 353-366.
- BIAGI, J. D.; BERTOL, R.; CARNEIRO, M. C. Armazéns em unidades centrais de armazenamento. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Biogeneziz, 2002. p. 157–174.
- BRASIL. Resolução RDC N° 7, de 18/02/2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10 ago. 2011.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C.  
Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alim. Nutr.**,  
v.19, p. 341-349, 2008.

DARABAS, A.M. **Processo de produção do arroz da Cooperja**. Disponível em:  
<<http://www.cooperja.com.br/produtos/producaodearroz.pdf>>.  
Acesso em 15 set. 2011.

DESIGNES, C.; CHAURANDA, M.; DUBOIS, M.;  
SADOUDI, A.; ABECASSIS, J.; LULLIEN-PELLERIN, V.  
Changes in common wheat grain milling behavior and tissue  
mechanical properties following ozone treatment. **Journal of  
Cereal Science**, p. 245–251. 2008.

DORS, G. C.; PINTO, L. A. de A.; BADIALE-FURLONG, E.  
Migration of mycotoxins into rice starchy endosperm during the  
parboiling process. **LWT - Food Science and Technology**, v.  
42, p. 433–437, 2009.

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

ELIAS, M. C; OLIVEIRA, M. de; ANTUNES, P. L.  
Fundamentos científicos e tecnológicos da secagem e do  
armazenamento na conservação de grãos. In: ELIAS, M. C.  
**Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de  
grãos**. Pelotas: Santa Cruz, 2009. p. 17-71.

ELIAS, M. C.; de OLIVEIRA, M.; WALLY, A. P. S.; MORAS,  
S. R. de A.; ROCHA, J. da C. Desafios da pós-colheita na  
qualidade de arroz e feijão para indústria e consumo. In:  
SCUSSEL, V. M.; da ROCHA, M. W.; LORINI, I.; SABINO,  
M; ROSA, C. A. da R.; CARVAJAL, M. M. **Atualidades em**

**Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II.**

Florianópolis: ABMAG, 2008. p. 465-494.

**EMBRAPA. Arroz e feijão: o Par Perfeito do Brasil, 2006.**

Disponível em:

<<http://www.cnpaf.embrapa.br/parperfeito/arroz.htm>>. Acesso em 23 nov. 2010.

**EMBRAPA. Cultivo do arroz irrigado no Brasil, Embrapa, 2005.** Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/index.htm>>. Acesso em 23 jun. 2011.

**EPAGRI. A cultura do arroz irrigado pré-germinado.**

Florianópolis: Epagri, 2002.

GIORDANO, B. N. E. **Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H. B. K.).** In: Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009. 193 p.

GONZÁLEZ, L.; JUAN, C.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, p. 223 – 227. 2006.

GRAHAM, T.; ZHANG, P.; WOYZBUN, E.; DIXON, M. Response of hydroponic tomato to daily applications of aqueous ozone via drip irrigation. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 464–471, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, v. 37, p. 453–460, 2004.

HARDIN, J. A.; JONES, C. L.; BONJOUR, E. L.; NOYES, R. T.; BEEBY, R. L.; ELTISTE, D. A.; DECKER, S.. Ozone fumigation of stored grain; closed-loop recirculation and the rate of ozone consumption. **Journal of Stored Products Research**, p. 149-154. 2010.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E. A. L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v.39, 2009.

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

IBÁÑEZ-VEA, M.; CORCUERA, L. A.; REMIRO, R.; MURILLO-ARBIZU, M. T.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E. Validation of a UHPLC-FLD method for the simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley. **Food Chemistry**, v. 127, p. 351–358, 2011.

INAN, F.; PALA, M.; DOYMAZ, I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. **Journal of Stored Products Research**, p. 425–429. 2007.

IACUMIN, L.; MANZANO, M.; COMI, G. Prevention of *Aspergillus ochraceus* growth on and Ochratoxin a contamination of sausages using ozonated air. **Food Microbiology**, article in press, 2011.

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

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

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

MANKEVICIENÉ, A.; BUTKUTÉ, B.; GAURILCIKIENÉ, I.; DABKEVICIUS, Z.; SUPRONIENÉ, S. Risk assessment of Fusarium mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. **Food Control**, v. 22, p. 970-976, 2011.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Arroz**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>>. Acesso em 23 jun. 2011.

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

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

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

MIRANDA, S. H. G; SILVA, G. S.; MOTTA, M. A. S. B.; ESPOSITO, H. O sistema agroindustrial do arroz no Rio Grande do Sul. In: **45 Congresso da Sober**. Londrina: 2007. p. 1-20.

MOLINIE, A.; FAUCET, V.; CASTEGNARO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. **Food Chemistry**, v. 92, p. 391–400, 2005.

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

NGUYEN, M. T.; TOZLOVANU, M.; TRAN, T. L.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. **Food Chemistry**, v. 105, p. 42–47, 2007.

NUNES, I. L.; MAGAGNIN, G.; BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 190-194, 2003.

ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENIC, B.; ZORLUGENIC, F. K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal of Food Engineering**, p. 396–399. 2006.

PARK, J. W.; CHOI, S.; HWANG, H.; KIM, Y. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, p. 305–314. 2005.

PEREIRA, A. de M.; FARONI, L. R. D.; JÚNIOR, A. G. da S.; SOUSA, A. H. de; PAES, J. L. Viabilidade econômica do gás ozônio como fumigante em grãos de milho armazenados. **Engenharia na Agricultura**, v.16, p. 144-154, 2008.



RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; STEPONAVICIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVICIENĖ, A.; ZVICEVICIUS, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Ann Agric Environ Med**, v. 13, p. 287–294, 2006.

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

REITER, E. V.; VOUK, F.; BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E.. Aflatoxins in rice – A limited survey of products marketed in Austria. **Food Control**, v. 21, p. 988–991, 2010.

REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Porto Alegre: SOSBAI, 2010.

REZENDE, A. C. Boas práticas de armazenamento: análise de perigos e pontos críticos de controle. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Biogeneziz, 2002. p. 177-190.

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

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

SHI, G.; YANG, L.; WANG, Y.; KOBAYASHI, K.; ZHU, J.; TANG, H.; PAN, S.; CHEN, T.; LIU, G.; WANG, Y. Impact of elevated ozone concentration on yield of four Chinese rice cultivars under fully open-air field conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 131, p. 178–184, 2009.

TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, M. Mycotoxins in rice. **International Journal of Food Microbiology**, p. 59–66. 2007.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Review - Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, p. 248–255. 2010.

TONON, S. A.; MARUCCI, R. S.; JERKE, G.; GARCÍA, A.. Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay. **International Journal of Food Microbiology**, p. 231–235. 1997.

WEBER, E. A. **Armazenagem agrícola**. Porto Alegre: Kepler Weber Industrial, 1998.

WHITE, S. D.; MURPHY, P. T.; BERN, C. J.; LEEUWEN, J. van. Controlling deterioration of high-moisture maize with ozone treatment. **Journal of Stored Products Research**, p. 7–12. 2010.

YOUNG, J. C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 417–424, 2006.

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

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.

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



### **3 ARTIGO: MICOBIOTA E QUALIDADE MICOTOXICOLÓGICA DE QUATRO CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM CASCA RECÉM- COLHIDO E A RELAÇÃO COM O TEMPO ENTRE COLHEITA E RECEPÇÃO NA INDÚSTRIA**

#### **3.1 RESUMO**

Este estudo relata a qualidade e segurança de quatro cultivares (Epagri 109 / SCS 114 Andosan / Tio Taka 113 / Epagri 115 CL) de arroz (*Oryza sativa* L.) recém-colhido cultivado sob sistema de irrigação na cidade de Massaranduba, Norte de Santa Catarina. Os parâmetros de qualidade avaliados foram micobiota, micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona), distribuição de água (conteúdo de umidade e atividade de água -  $a_w$ ) além de condições ambientais (umidade relativa - UR e temperatura) e a relação com o tempo entre a colheita e a recepção na indústria. As cultivares apresentaram tempo médio de espera de 8,6 horas (mín. 0,3 e máx. 24,9 h), carga total de fungos de  $8,6 \times 10^4$  ufc / mL (mín.  $1,8 \times 10^3$  e máx.  $9,4 \times 10^5$  ufc / mL), com distribuição de água bastante elevada - conteúdo de umidade de 18,97 % (mín. 14,9 e máx. 24,5 %) e  $a_w$  0,92 (mín. 0,78 e máx. 0,99.) - sob as condições ambientais médias de 87,3 % (mín. 80,0 e máx. 96,8%) e 25,4°C (mín. 22,5 e máx. 27,5°C) de UR e temperatura, respectivamente. As condições sob as quais as amostras foram submetidas permitiu o crescimento de fungos, porém não foi detectada a presença de micotoxinas. Em relação aos gêneros de fungos isolados das cultivares de arroz, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes entre todas as cultivares e variações na distribuição destes entre as cultivares não foram observadas. Ainda, não foi encontrada uma correlação do tempo entre carga e descarga dos grãos com a distribuição de água (conteúdo de umidade e  $a_w$ ) e com a carga total de fungos. Além disso, todos os resultados e a importância do monitoramento da qualidade micotoxicológica do arroz foram discutidos.

**Palavras-chave:** fungos, micotoxinas, arroz recém-colhido, tempo de espera.

### 3.2 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes que alimentam a maior proporção de população do mundo (SHI et al., 2009). Cultivado e consumido em todos os continentes, o cereal se destaca pela área de cultivo e produção, desempenhando um papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social (EMBRAPA, 2005).

Microrganismos são onipresentes nos ecossistemas terrestres, local em que se encontram disseminados contaminando diversas culturas de vegetais. Os grãos não são exceção e são contaminados por uma grande variedade de fungos por meio do ar, insetos, chuva, equipamentos e práticas agronômicas. Esta atividade fúngica pode causar uma variedade de efeitos indesejáveis em grãos e sementes, sendo que também pode levar à produção de micotoxinas (MAGAN, ALDRED, 2007), compostos conhecidos por suas características maléficas ao organismo humano (PITT, 2000).

O desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas resultam da interação entre fungo, substrato e ambiente (MORENO et al., 2009). O arroz constitui um ótimo substrato para fungos, principalmente por ser rico em carboidratos (HOELTZ et al., 2009) e por crescer em regiões que apresentam calor necessário e umidade abundante ideais para o crescimento de fungos. Estas condições propiciam a contaminação micotoxicológica, principalmente no campo e na colheita, situação na qual o teor de umidade não é facilmente controlado. No caso específico do arroz, os grãos ainda não processados, provenientes diretamente do campo, são os mais suscetíveis às mais intensas contaminações (DUARTE, PENA, LINO, 2010). Sendo assim, torna-se importante conhecer a composição das comunidades fúngicas estabelecidas durante o

período da colheita, já que esta influencia diretamente na qualidade pós-colheita e principalmente na armazenagem (PATERSON, LIMA, 2010).

Os cereais contaminados podem representar uma fonte direta de exposição humana, pelo seu consumo direto, ou uma fonte indireta através do consumo de produtos derivados de animais alimentados com ração contaminada. Embora seja menos comum em arroz do que em outros cereais, a contaminação por micotoxinas tais como zearalenona - ZON, aflatoxinas - AFLs e ocratoxina A - OTA neste cereal vem sendo reportada em diversas partes do mundo. Ainda que muitos são os anos de pesquisa e da introdução de boas práticas agrícolas na produção de alimentos e boas práticas de fabricação na cadeia de armazenagem e distribuição de cereais, micotoxinas continuam a ser um problema mundial. Atualmente, estudos têm demonstrado extensa contaminação por micotoxinas, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, sendo que o impacto destas toxinas na saúde humana e animal é ampla e extensamente documentada (HOELTZ et al., 2009; DUARTE, PENA, LINO, 2010; TIWARI et al., 2010; ZAIN, 2011).

Desta forma, o presente trabalho avalia a (a) microbiota e a contaminação por micotoxinas (AFLs, OTA e ZON) e sua relação com as condições ambientais, bem como a distribuição de água no arroz em casca recém-colhido cultivado em sistema irrigado no Norte de Santa Catarina e (b) relação entre parâmetros de qualidade / segurança e o tempo em que o arroz em casca recém-colhido passou no caminhão de transporte (desde a colheita até a descarga na recepção da indústria).

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Material

### 3.3.1.1 Amostra

Arroz em casca (n=40) recém-colhido, cultivado sob sistema de irrigação, pertencente a quatro diferentes cultivares e proveniente de 39 propriedades agrícolas localizadas na cidade de Massaranduba e região, no Norte de Santa Catarina, conforme indicado na Figura 1. As amostras foram coletadas de fevereiro a março de 2012 e as cultivares utilizadas foram (a) Epagri 109 (b) SCS 114 Andosan, (c) Tio Taka 113 e (d) CL Epagri115 (que somadas representam aproximadamente 90 % das cultivares utilizadas na região), todas provenientes da Epagri, Brasil.

Figura 1 - Mapa da localização geográfica da cidade de Massaranduba, a qual forneceu as amostras de arroz recém-colhido para o presente estudo.



### 3.3.1.2 Padrões, reagentes, meios de cultura e outros materiais

Padrões de aflatoxinas (AFLs: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZON), todos da Sigma. Acetona, etanol e tolueno (Synth), sulfato de amônia e benzeno (J. T. Baker), clorofórmio, acetato de etila, metanol, ácido acético, ácido fórmico, cloreto de alumínio and sulfato de sódio anidro (Vetec), cloreto de potássio (Lafan), sulfato de



cobre (F. Maia), todos de grau analítico. Peptona, malt extract agar - MEA e potato dextrose agar – PDA, todos da Himedia. Corante lactofenol (Fluka), cloranfenicol (Sigma), terra diatomácea (Synth), papel filtro (Unifil), placa cromatográfica Reagen (Quimibrás).

### 3.3.1.3 Equipamentos

Removedor de impurezas de 1 kg de capacidade (Ouro Peças), autoclave (Phoenix), medidor de atividade água modelo Aqua Lab 4TE (Decagon Devices), cabine de fluxo laminar (Veco), estufa de secagem (Olidex Cz), microscópio óptico (Olympus), microscópio estereoscópio (Carlzeiss Jena), estufa incubadora (Quimis), balança analítica e semi-analítica (Shimadzu e BEL, respectivamente), contador de colônias (Phoenix), pipeta automática de 100 e 1000  $\mu$ L (Digipet), liquidificador inoxidável, 2 L de capacidade (Metvisa).

## 3.3.2 Métodos

### 3.3.2.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras foram randomicamente coletadas, perfazendo um total de dez amostras por cada cultivar, no período de fevereiro a março de 2012 a partir de caminhões que estavam na recepção da indústria. A coleta foi realizada com o emprego de um calador pneumático em seis pontos de cada caminhão (capacidade de coleta: 10 kg). Cada amostra foi quarteada e reduzida até 300 g, encaminhada para remoção de sujidades, identificada e enviada para laboratório para a realização das análises subsequentes.

### 3.3.2.2 Distribuição de água

Em relação à distribuição de água, conteúdo de umidade e atividade água -  $a_w$  foram avaliados. O conteúdo de umidade foi determinado em triplicata pela secagem da amostra em estufa ( $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ), de acordo com o método gravimétrico da AOAC (2005). A  $a_w$  foi realizada em triplicata, utilizando o equipamento do Aqua Lab 4TE (Decagon Devices), que possui uma lâmina higroscópica de cloreto de lítio, que alterna resistência elétrica ou condutância, fornecendo a atividade em água.

### 3.3.2.3 Testes micológicos

A contagem total de fungos foi realizada em duplicata utilizando o método de Samson, Hoesktra, Frisvad (2004) por plaqueamento de diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) em meio PDA com 50 ppm de cloranfenicol. A identificação de gênero empregou microcultivo em MEA pela técnica de Riddell, conforme descrito por Weber e Pitt (2000), e seguiu as chaves de Samson, Hoesktra, Frisvad (2004).

### 3.3.2.4 Análise de multi-toxinas

A análise de AFLs, OTA e ZON foi realizada por cromatografia em camada delgada, conforme Soares e Rodriguez-Amaya, 1989. O limite de detecção do método para AFLs, OTA e ZON corresponde a 2, 5 e 55  $\mu\text{g} / \text{kg}$  e o limite de quantificação a 4, 10 e 165  $\mu\text{g} / \text{kg}$  para cada micotina respectivamente. Fase móvel de tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (6 : 3,95 : 0,05). Placa cromatográfica foi visualizada em luz ultra-violeta em 360 nm para interpretação dos resultados.

### 3.3.2.5 Obtenção de dados do tempo da colheita até a recepção na indústria e das condições ambientais

Informações sobre o arroz em casca recém-colhido, tais como o horário da colheita, do carregamento e da entrada na Recepção da Indústria foi obtido a partir das notas fiscais dos caminhões transportadores. Este tempo (expresso em horas) da colheita até ao momento em que os grãos foram descarregados na indústria representa o período em que o arroz ficou dentro do caminhão para transporte. Os dados sobre as condições ambientais (temperatura e umidade relativa – UR) dos dias de coleta de amostra foram fornecidas pela Epagri, Massaranduba, Santa Catarina.

### 3.3.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados em tabelas descritivas contendo frequências absolutas, frequências relativas percentuais (proporções), amplitudes, médias e desvios padrão. Para comparação das proporções de gêneros de fungos foi utilizado o teste Qui-quadrado de proporções independentes. Para comparar as cultivares com relação às variáveis quantitativas, foi utilizado o teste Kruskal Wallis da ANOVA. Para correlacionar variáveis quantitativas entre si numa análise bivariada utilizou-se a Correlação Linear de Pearson. Em todos os testes utilizados na pesquisa o resultado foi considerado significativo se o valor  $P < 0,05$ . Para análise dos dados foi utilizado o software Statistica versão 7.

## 3.4 RESULTADOS

Os resultados de umidade (conteúdo de umidade e  $a_w$ ), carga total de fungos, micotoxinas (AFLs, OTA e ZON) e tempo de espera no caminhão de cada cultivar separadamente e de todas

as cultivares juntas estão organizados na Tabela 1, que indica a amplitude, média e desvio padrão de cada variável.

Para melhor visualização, a distribuição dos resultados apresentados na Tabela 1 está disposta em histogramas de Shapiro-Wilk na Figura 2, para todas as cultivares.

Tabela 1 - Resultados do tempo de espera, conteúdo de umidade, atividade água, carga total de fungos e micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona) em cada cultivar de arroz em casca recém-colhido coletados entre fevereiro e março de 2012

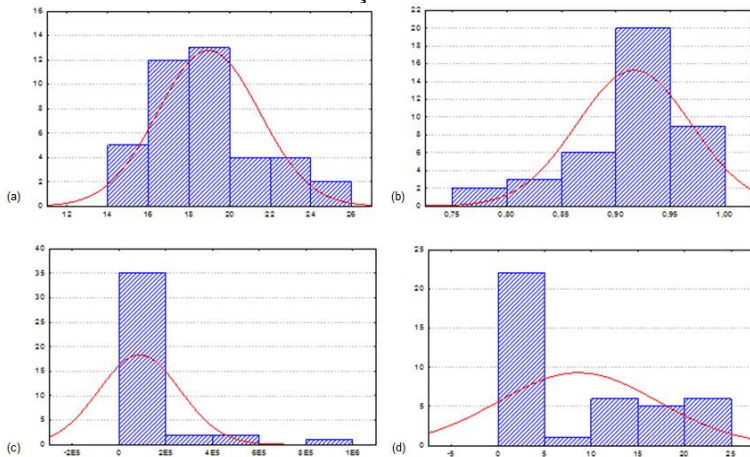
Cultivar	Arroz		Amplitude	Média ± DP
	Parâmetros analíticos	n		
Epagri 109	Tempo de espera* (h)	10	0,3 – 20,6	10,76 ± 7,46
	Conteúdo de umidade (%)	10	17,1 – 24,3	19,44 ± 2,22
	Atividade água	10	0,91 - 0,98	0,94 ± 0,03
	Carga total de fungos (ufc / mL)	10	4,9 x 10 <sup>3</sup> - 4,2 x 10 <sup>5</sup>	6,1 x 10 <sup>4</sup> ± 1,3 x 10 <sup>5</sup>
	Micotoxinas	10	ND	ND
Tio Taka 113	Tempo de espera* (h)	10	0,3 – 24,3	9,79 ± 9,81
	Conteúdo de umidade (%)	10	14,9 – 24,5	18,24 ± 2,76
	Atividade água	10	0,78 – 0,98	0,9 ± 0,06
	Carga total de fungos (ufc / mL)	10	1,8 x 10 <sup>3</sup> – 1,2 x 10 <sup>5</sup>	3,5 x 10 <sup>4</sup> ± 3,6 x 10 <sup>4</sup>
	Micotoxinas	10	ND	ND
SCS 114 Andosan	Tempo de espera* (h)	10	1 – 24,9	4,18 ± 7,32
	Conteúdo de umidade (%)	10	15,6 – 23,4	18,78 ± 3,36
	Atividade água	10	0,78 – 0,99	0,9 ± 0,07
	Carga total de fungos (ufc / mL)	10	3,2 x 10 <sup>3</sup> – 9,4 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup> ± 2,8 x 10 <sup>5</sup>
	Micotoxinas	10	ND	ND

Epagri 115 CL	Tempo de espera * (h)	10	0,5 - 22	9,69 ± 9,12
	Conteúdo de umidade (%)	10	17,7 - 22,6	19,4 ± 1,46
	Atividade água	10	0,87 - 0,96	0,93 ± 0,03
	Carga total de fungos (ufc / mL)	10	5,2 x 10 <sup>3</sup> - 4,1 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup> ± 1,5 x 10 <sup>5</sup>
	Micotoxinas	10	ND	ND
Todas	Tempo de espera * (h)	40	0,3 - 24,9	8,61 ± 8,57
	Conteúdo de umidade (%)	40	14,9 - 24,5	18,97 ± 2,5
	Atividade água	40	0,78 - 0,99	0,92 ± 0,05
	Carga total de fungos (ufc / mL)	40	1,8 x 10 <sup>3</sup> - 9,4 x 10 <sup>5</sup>	8,6 x 10 <sup>4</sup> ± 1,7 x 10 <sup>5</sup>
	Micotoxinas	40	ND	ND

n – número de cultivares analisadas; DP – desvio padrão; ND - não detectado

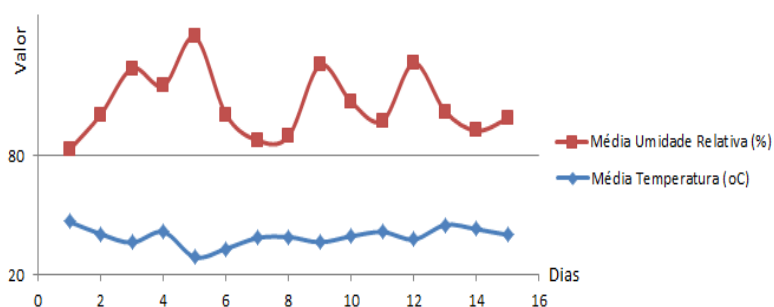
\* Tempo entre a colheita e a descarga na indústria

Figura 2 - Histogramas de Shapiro-Wilk dos resultados de (a) conteúdo de umidade, (b) atividade água, (c) carga total de fungos e (d) tempo de espera de todas as amostras das quatro cultivares de arroz recém-colhido coletadas de fevereiro a março de 2012.



No que diz respeito às condições ambientais, dados da temperatura e UR de cada dia de coleta foram graficamente organizados na Figura 3. A temperatura e UR nos 15 dias de coleta (entre fevereiro e março de 2012) apresentaram variação entre 22,5 a 27,5°C para temperatura e entre 80,0 a 96,8 % de UR, apresentando valor médio de 25,4°C e 87,3 %, para cada variável, respectivamente.

Figura 3 - Representação gráfica da média das condições ambientais (umidade relativa e temperatura) em cada dia de coleta de arroz em casca recém-colhido entre fevereiro e março de 2012.



Para verificar a relação entre conteúdo de umidade,  $a_w$  e carga total de fungos nas amostras estudadas, a correlação linear de Pearson foi utilizada, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 2. Para o arroz recém-colhido analisado, uma correlação significativa fraca ( $R = 34,91$  para conteúdo de umidade e carga total de fungos e  $R = 31,08$  para  $a_w$  e carga total de fungos) foi observada entre essas variáveis. O parâmetro tempo de espera não apresentou correlação significativa com as variáveis analisadas.

Tabela 2 - Resultados da Correlação Linear de Pearson entre tempo de espera e conteúdo de umidade, atividade água e carga total de fungos de arroz em casca recém-colhido

Parâmetros analíticos	Tempo de espera	Conteúdo de umidade	Atividade água	Carga total de fungos
Tempo de espera	R = 100% NA	R = -21,95% P = 0,1740	R = -7,59% P = 0,6420	R = -13,78% P = 0,3970
Conteúdo de umidade	NA NA	R = 100% NA	R = 87,33% P = 0,0000	R = 34,91% P = 0,0270
Atividade água	NA NA	NA NA	R = 100% NA	R = 31,08% P = 0,0510
Carga total de fungos	NA NA	NA NA	NA NA	NA NA

I - Se  $P < 0,05$  então correlação significativa ( $P < 0,05$ ).

II - Observação: a correlação linear de Pearson (R) pode ser classificada como: (i) inexistente (se  $0\% \leq R \leq 20\%$ ), (ii) fraca (se  $20\% < R \leq 50\%$ ), (iii) moderada (se  $50\% < R \leq 80\%$ ), (iv) forte (se  $80\% < R \leq 100\%$ ).

NA- não aplicável

A fim de comparar as cultivares de arroz entre si com o objetivo de identificar possíveis diferenças de comportamento entre as estas, o teste de Kruskal Wallis da ANOVA foi utilizado, o qual não indicou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as cultivares quanto a tempo de espera, carga total de fungos e distribuição de água.

A distribuição dos gêneros de fungos entre as quatro cultivares é apresentada na Tabela 3. A proporção dos gêneros de fungos verificada para cada cultivar foi analisada pelo teste Qui-quadrado, o qual não indicou diferenças significativas nas proporções dos gêneros de fungos entre as cultivares ( $P > 0,05$ ). Os gêneros fungos mais presentes em maiores proporções no arroz recém-colhido analisado foram *Aspergillus* e *Penicillium*.

Tabela 3 - Distribuição dos gêneros de fungos isolados de arroz em casca recém-colhido

Gênero	Número absoluto e percentual de fungos isolados para cada cultivar				P*
	Epagri 109	Tio Taka 113	SCS 114 Andosan	Epagri 115 CL	
<i>Acremonium</i>	3 (30)	3 (30)	4 (40)	1 (10)	0,49691
<i>Aspergillus</i>	10 (100)	9 (90)	10 (100)	9 (90)	0,55085
<i>Botrytis</i>	NI	1 (10)	NI	NI	NA
<i>Fusarium</i>	5 (50)	NI	2 (20)	1 (10)	0,10905
<i>Mucor</i>	1 (10)	2 (20)	1 (10)	NI	NA
<i>Penicillium</i>	9 (90)	10 (100)	10 (100)	10 (100)	0,37992
<i>Phialophora</i>	NI	NI	NI	1 (10)	NA
<i>Rhizomucor</i>	NI	NI	1 (10)	NI	NA
<i>Rhizopus</i>	5 (50)	7 (70)	8 (80)	8 (80)	0,41418
<i>Saprolegnia</i>	NI	1 (10)	NI	NI	NA
<i>Trichoderma</i>	NI	1 (10)	NI	1 (10)	NA

\*Teste Qui-quadrado

NI – não isolado; NA – não aplicável

### 3.5 DISCUSSÃO

Para todas as cultivares de arroz recém-colhido estudadas, o conteúdo de umidade e  $a_w$  juntamente com o substrato em questão propiciou uma contaminação fúngica média de  $8,6 \times 10^4$  ufc / mL no arroz em casca. Mesmo com uma contaminação fúngica significativa, nenhum fungo se mostrou toxigênico nestas condições, uma vez que não foram detectadas micotoxinas nas amostras analisadas.

Em relação às condições ambientais, a temperatura e UR nos dias de coleta apresentaram o valor médio de 25,4°C e 87,3 %, respectivamente. Como descrito por vários autores, essas condições são passíveis estabelecer altos níveis de conteúdo de umidade e  $a_w$  conforme verificado no estudo, bem como de propiciar o desenvolvimento de fungos, especialmente durante o tempo de espera no caminhão, onde a respiração e transpiração dos grãos são afetadas e favorecem esta proliferação.



De acordo com Velluti et al. (2000) e Moreno et al. (2009), condições ambientais, tais como temperatura e disponibilidade de água, tem um importante impacto tanto sobre o crescimento de fungos quanto na ocorrência de micotoxinas, já que a produção destes compostos é geneticamente regulada em resposta às condições ambientais. Conforme indicado pela Correlação de Pearson para conteúdo de umidade e  $a_w$  frente a carga total de fungos, realmente foi verificada uma relação entre estes fatores. Contudo, mesmo que a contaminação fúngica tenha ocorrido, o tempo de espera não apresentou relação direta com o conteúdo de umidade,  $a_w$ , carga total de fungos e micotoxinas. Provavelmente isto ocorreu devido (a) à qualidade micotoxicológica inicial do arroz recém-colhido, o qual apresentou uma contaminação fúngica relativamente baixa (cerca de  $10^4$  ufc / mL), além de não apresentar micotoxinas provenientes do campo, bem como devido (b) às condições climáticas (temperatura e UR) durante a colheita e o tempo em que o arroz estava no caminhão, as quais se mostraram suficientemente adequadas para manter a qualidade micotoxicológica inicial do cereal. Portanto, pode-se considerar que as condições climáticas e o tempo de espera no caminhão durante o período estudado não propiciaram uma contaminação excessiva por fungos ou favoreceram a produção de micotoxinas no substrato analisado.

Em relação ao teste de Kruskal Wallis da ANOVA, utilizado para comparar as cultivares de arroz entre si, não foram indicadas diferenças significativas entre as cultivares ( $P > 0,05$ ). Portanto, foi encontrado um comportamento semelhante nas quatro cultivares em relação conteúdo de umidade,  $a_w$ , carga total de fungos e tempo de espera no caminhão. Desta forma, nenhuma cultivar específica apresentou resistência ou suscetibilidade significativa para algum destes parâmetros. Ainda, a distribuição dos gêneros fungos isolados analisada pelo teste do Qui-quadrado não indicou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre as quatro cultivares, o que significa que não há uma tendência ou susceptibilidade de uma cultivar de arroz específica para os gêneros de fungos encontrados.

Como esperado, resultados da distribuição de gêneros de fungos apresentaram uma presença ubíqua de *Aspergillus* e *Penicillium* no arroz recém-colhido analisado. Os gêneros mais importantes de fungos toxigênicos, de acordo com Zain (2011), inclui *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, sendo que todos estes foram encontrados nas amostras de arroz estudadas. Micotoxinas ocorrem com mais freqüência em áreas de clima quente e úmido, propício para o crescimento de fungos (Zain, 2011); no entanto, não foram detectadas micotoxinas neste estudo. Este fato pode ser indicativo tanto de que as espécies de fungos presentes não eram micotoxigênicas e / ou as condições entre o substrato e as condições ambientais não eram adequadas o suficiente para a produção de micotoxinas. De qualquer forma, o conhecimento sobre os padrões de infecção fúngica em arroz pode corresponder a uma importante ferramenta na prevenção da deterioração fúngica tanto no campo como no armazenamento.

Sendo assim, torna-se importante a manutenção de uma avaliação regular da qualidade micotoxicológica do arroz a partir do campo e da colheita, uma vez que é na maturação em que o grão tem sua expressão máxima de qualidade, que por sua vez só tende a reduzir durante o armazenamento, na indústria e no comércio, conforme Elias, Oliveira, Antunes (2009) relata. Além disso, de acordo com Bennett e Klich (2003), alimentos podem ser contaminados por micotoxinas em várias fases da cadeia alimentar e, conforme relatado por Hussein e Brasel (2001), uma vez que os fatores que contribuem para a presença ou produção destas toxinas incluem condições ambientais e ecológicas, muitas vezes, se apresentam além do controle humano.

### 3.6 CONCLUSÕES

De maneira geral, foi verificado um comportamento semelhante entre as quatro cultivares de arroz recém-colhido analisadas, sendo que nenhuma cultivar específica apresentou resistência ou suscetibilidade significativa para algum dos parâmetros analisados.

Ainda que a contaminação fúngica tenha ocorrido, o tempo de espera não apresentou relação direta com o conteúdo de umidade, atividade água, carga total de fungos e micotoxinas; o que demonstra que o tempo de espera no caminhão não influenciou estas variáveis para as amostras analisadas nas condições em que estas se encontravam.

Como esperado, resultados da distribuição de gêneros de fungos apresentaram uma presença ubíqua de *Aspergillus* e *Penicillium* no arroz recém-colhido. No entanto, não foram detectadas micotoxinas neste estudo. De qualquer forma, o conhecimento sobre os padrões de infecção fúngica em arroz recém-colhido pode corresponder a uma importante ferramenta para na prevenção da deterioração fúngica tanto no campo como no armazenamento.

Sendo assim, torna-se importante a manutenção de uma avaliação regular da qualidade micotoxicológica do arroz a partir do campo e da colheita, uma vez que sua qualidade só tende a reduzir durante o armazenamento, na indústria e no comércio e uma vez que os fatores que contribuem para a produção destas toxinas muitas vezes se apresentam além do controle humano.

### 3.7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem (a) a Cooperativa Juriti, localizada na cidade de Massaranduba, Norte de Santa Catarina pela parceria fornecendo amostras de arroz e pelo suporte financeiro, bem como (b) a CAPES pela bolsa de estudos.

### REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis**. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2005.

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

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

ELIAS, M. C; OLIVEIRA, M. de; ANTUNES, P. L. Fundamentos científicos e tecnológicos da secagem e do armazenamento na conservação de grãos. In: ELIAS, M. C. **Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de grãos**. Pelotas: Santa Cruz, 2009. p. 17-71.

EMBRAPA. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil, Embrapa, 2005**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/index.htm>>. Acesso em 23 jun. 2011.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E. A. L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v.39, 2009.

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

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

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

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N.. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, v. 43, p. 1902–1914, 2010.

PITT, J. I.. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, p. 184-192, 2000.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.. **Introduction to food and airborne fungi**. Wageningen: CBS, 2004.

SHI, G.; YANG, L.; WANG, Y.; KOBAYASHI, K.; ZHU, J.; TANG, H.; PAN, S.; CHEN, T.; LIU, G.; WANG, Y. Impact of elevated ozone concentration on yield of four Chinese rice cultivars under fully open-air field conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 131, p. 178–184, 2009.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUES-AMAYA, D. B.. Survey of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian food by using multitoxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, p. 22-26, 1989.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Review - Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, p. 248–255. 2010.

VELLUTI, A.; MARIN, S.; BETTUCCI, L.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B-1 and zearaleone formation. **International Journal of Food Microbiology**, p. 59-66, 2000.

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



## 4 ARTIGO: EFEITO DO GÁS OZÔNIO NA MICBIOTA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM CASCA

### 4.1 RESUMO

Este trabalho relata o efeito da aplicação de atmosfera modificada com gás ozônio ( $O_3$ ) em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em sistema irrigado, seco e armazenado, sobre a sua micobiota e distribuição de água (conteúdo de umidade e atividade água -  $a_w$ ) a fim de aprimorar a segurança durante o armazenamento deste cereal. A partir de aplicações de três diferentes concentrações de  $O_3$  (10, 20 e 40 mg / L) durante 1,6 minutos de corrente de gás ozonizado mais 30 minutos de repouso, a maior variação observada foi na carga total de fungos, que alcançou uma redução de 3-log (de  $10^5$  para  $10^2$  ufc / mL) para os tratamentos com concentração de 20 e 40 mg / L de gás  $O_3$ . Após o tratamento com o gás, o conteúdo de umidade e  $a_w$  apresentaram uma ligeira redução (média do conteúdo de umidade baixou de 12,03 para 11,61% e média da  $a_w$  baixou de 0,67 para 0,63) nestas variáveis, o que era esperado devido o curto tempo de exposição ao gás  $O_3$ . Apesar da extensa redução da carga total de fungos, foi verificado que os gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras demonstram resistência às concentrações de gás  $O_3$  aplicado, de modo que os gêneros de fungos mais sensíveis foram *Acremonium* e *Alternaria*. Desta forma, o tratamento com  $O_3$  mostrou ser uma alternativa eficaz segura ao meio ambiente para reduzir a contaminação fúngica de arroz armazenado e manter sua segurança micológica durante esta etapa da pós-colheita.

**Palavras-chave:** atmosfera modificada, ozônio, fungos, distribuição de água, arroz armazenado.

## 4.2 INTRODUÇÃO

Microrganismos são onipresentes nos ecossistemas terrestres, local em que se encontram disseminados contaminando diversas culturas de vegetais. Os grãos não são exceção e são contaminados por uma grande variedade de fungos por meio do ar, insetos, chuva, equipamentos e práticas agronômicas. Esta atividade fúngica pode causar uma variedade de efeitos indesejáveis em grãos e sementes, sendo que também pode levar à produção de micotoxinas (MAGAN, ALDRED, 2007), compostos conhecidos por suas características maléficas ao organismo humano (PITT, 2000).

O desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas resultam da interação entre fungo, substrato e ambiente (MORENO et al., 2009), sendo que o arroz (*Oryza sativa* L.), constitui um ótimo substrato para fungos, principalmente por ser rico em carboidratos (HOELTZ et al., 2009) e por crescer em regiões que apresentam calor necessário e umidade abundante ideais para o crescimento de fungos (DUARTE, PENA, LINO, 2010). Como resultado, fungos ou seus esporos podem contaminar o arroz em toda a sua cadeia produtiva, inclusive aqueles produtores de micotoxinas (Duarte et al, 2010; Beber-Rodrigues, Scussel, 2013).

Uma vez que os fatores que contribuem para a presença ou produção de fungos incluem condições ambientais e ecológicas que muitas vezes se apresentam além do controle humano, a contaminação mundial de alimentos por fungos corresponde a um problema significativo (Hussein e Brasel, 2001). Desta forma, tornam-se necessários estudos sobre desenvolvimento de métodos de descontaminação de fungos a fim de reduzir sua incidência em alimentos e seus subprodutos. Para este fim, a atmosfera modificada têm sido aplicada, incluindo gases tais como gás carbônico, nitrogênio, oxigênio (isolados ou em uma mistura) e, mais recentemente, o gás ozônio (O<sub>3</sub>) (Scussel et al, 2011).



Um dos importantes empregos de  $O_3$  na agricultura corresponde ao tratamento pós-colheita de produtos agrícolas (Zorlugenic et al., 2008), cuja aplicação na manipulação e armazenagem pode reduzir ou eliminar microbiota indesejável de grãos e seus produtos (Tiwari et al., 2010). O gás  $O_3$  destrói microrganismos pela ação oxidativa progressiva de componentes celulares vitais e, por consequência, previne o crescimento microbiano e estende a vida de prateleira de diversos alimentos (Guzel-Seydim et al, 2004; Aguayo et al, 2006).

O  $O_3$  é um agente oxidante potente reconhecido desde 1997 como seguro (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) e vem sendo empregado na indústria alimentícia para a degradação ou detoxificação de microrganismos. Suas aplicações incluem a descontaminação de superfícies, de água ou equipamentos, armazenagem e preservação de alimentos e esterilização de embalagens (Desvignes et al., 2008; Cardenas et al., 2011).

Ainda que o uso comercial do  $O_3$  para o manejo de grãos não é bem documentado, existem diversos estudos que descrevem seus potenciais benefícios tecnológicos (McDonough et al., 2011), principalmente em trigo, cevada, milho e castanha do Brasil (Kells et al., 2001; Allen et al., 2003; Kottapalli et al., 2005; Raila et al., 2006; Wu et al., 2006; McDonough et al., 2011; Scussel et al., 2011); sendo que os autores não têm conhecimento de estudos sobre o efeito deste gás na qualidade micológica de arroz.

Sendo assim, este estudo foi conduzido de forma a avaliar o efeito do gás  $O_3$  (em três diferentes concentrações) sobre a degradação da microbiota e sobre a possível redução de água em arroz sob condições de armazenagem.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Material

#### 4.3.1.1 Amostra

Grãos de arroz (12,4 kg) cultivados em sistema irrigado, em casca, armazenados, secos (conteúdo de umidade em 12,03%, atividade água em 0,67), livres de impurezas e com contagem total de fungos de  $3,0 \times 10^5$  ufc / mL. As amostras foram obtidas a partir de um silo de arroz (capacidade: 5.000 toneladas) da indústria de arroz Cooperativa Juriti localizada em Massaranduba, Norte de Santa Catarina.

#### 4.3.1.2 Reagentes e meios de cultura

Ácido sulfúrico, iodeto de potássio e tiosulfato de sódio de grau analítico (Synth), cloranfenicol (Sigma), corante lactofenol (Fluka), indicador de amido. Peptona, malt extract agar - MEA e potato dextrose agar - PDA, Himedia.

#### 4.3.1.3 Equipamentos e aparelhos

Gerador de gás O<sub>3</sub>, modelo OP-35-5L (Interozone), medidor de atividade água Aqua Lab (Decagon Devices), medidor de fluxo 0-15 L / min (Protec), equipamento de remoção de impurezas (Ouro Peças), autoclave (Phoenix), capela de fluxo laminar (Veco), microscópio óptico (Olympus), microscópio estereoscópico (Carlzeiss Jena), estufa (Quimis), balança semi-analítica (BEL), contador de colônias (Phoenix), pipeta automática, 10-100 µL (Digipet), estufa (Olidef Cz), liquidificador inoxidável (Metvisa).

#### 4.3.1.4 Outros materiais

Termômetro e higrômetro (J. Prolab). Silos-piloto verticais (n = 7), construídos com tubos de policloreto de vinil (PVC), nas dimensões de 25 x 10 cm de altura e diâmetro,

contendo uma tampa superior e duas aberturas (parte superior e parte inferior dos silos-piloto) para a coleta da amostra e aplicação de  $O_3$ , respectivamente.

### 4.3.2 Métodos

#### 4.3.2.1 Preparo dos silos-piloto e amostras para aplicação de $O_3$

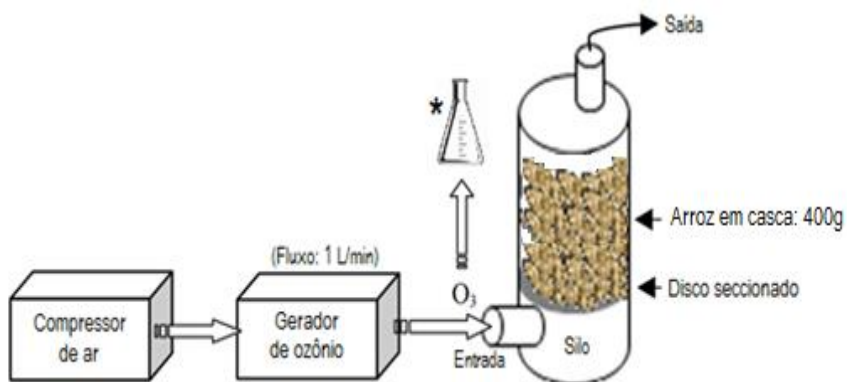
Os silos-piloto, depois de serem limpos, foram preenchidos com 400 g de arroz que para aplicação de gás  $O_3$ , conforme indicado na Figura 1. Os silos-piloto foram divididos em 4 grupos para a aplicação de gás ozonizado: Grupo C (Controle: sem tratamento de  $O_3$ ), Grupo 1 ( $O_3$ : 10 mg / L), Grupo 2 ( $O_3$ : 20 mg / L), o Grupo 3 ( $O_3$ : 40 mg / L). Cada tratamento foi realizado em dez repetições ( $n = 10$ ), exceto para o Grupo C ( $n = 1$ ).

#### 4.3.2.2 Tratamento com $O_3$

O gás  $O_3$  foi aplicado através da abertura inferior do silo-piloto por meio de uma bomba de ar comprimido e de um gerador de  $O_3$  a fim de obter a concentração estabelecida em cada silo-piloto (10, 20 e 40 mg / L a um fluxo de 1 L / min). A corrente de gás foi mantida até que o volume do silo-piloto fosse completado com o gás ozonizado (tempo de exposição à corrente de gás: 1,6 min) e então deixado em repouso por 30 minutos (coleta de amostras de arroz tratado após o tempo de exposição à corrente de gás e ao tempo de repouso). Após este período, amostras de arroz tratado foram coletadas e encaminhadas para os testes micológicos, análise de conteúdo de umidade e atividade água. A concentração de  $O_3$  foi medida na saída do gerador por meio do método iodométrico, de acordo com APHA (1999); no qual o gás ozonizado foi borbulhado em solução de iodeto de potássio, seguido da titulação com

tiosulfato de sódio para quantificação de ozônio. O esquema completo do tratamento de arroz em casca com gás O<sub>3</sub> está representado na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática do tratamento de gás ozônio no arroz em casca (\*) *método iodométrico para quantificar a concentração de ozônio.*



#### 4.3.2.3 Análises

##### 4.3.2.3.1 Testes micológicos

A contagem total de fungos foi realizada em duplicata utilizando o método de Samson, Hoesktra, Frisvad (2004) por plaqueamento de diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) em meio PDA com 50 ppm de cloranfenicol. A identificação de gênero empregou microcultivo em MEA pela técnica de Riddell, conforme descrito por Weber e Pitt (2000), e seguiu as chaves de Samson, Hoesktra, Frisvad (2004).

#### 4.3.2.3.2 *Distribuição de água*

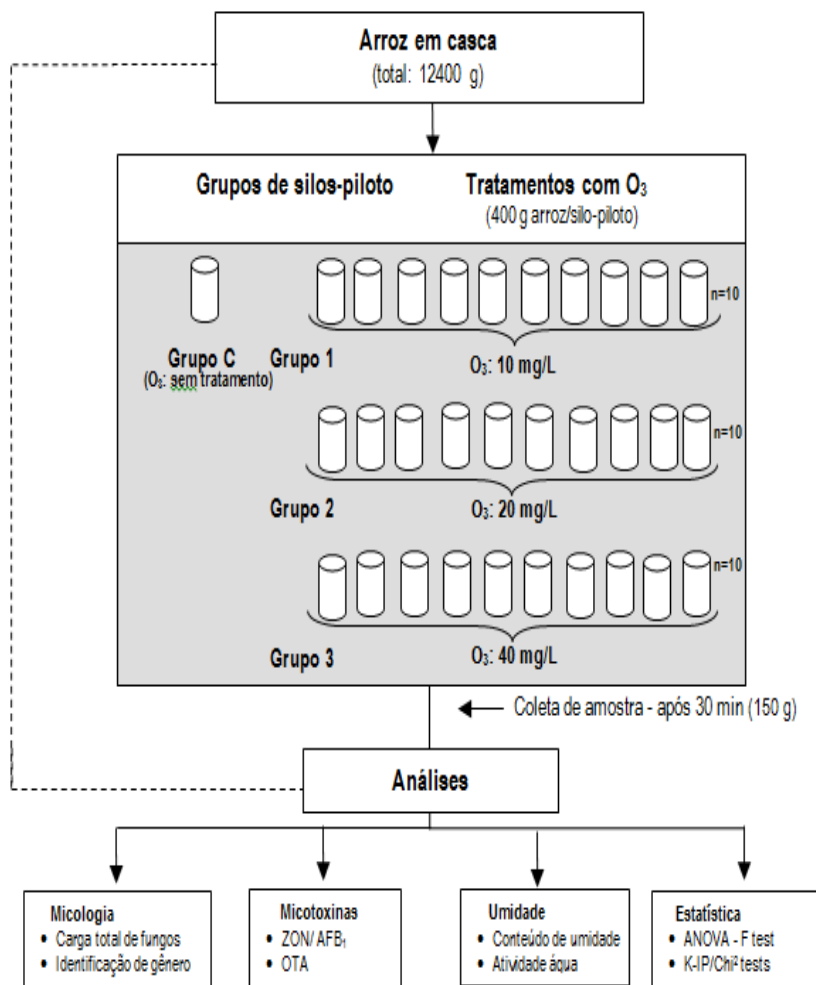
Em relação à distribuição de água, conteúdo de umidade e atividade água -  $a_w$  foram avaliados. O conteúdo de umidade foi determinado em triplicata pela secagem da amostra em estufa ( $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ), de acordo com o método gravimétrico da AOAC (2005). A  $a_w$  foi realizada em triplicata, utilizando o equipamento do Aqua Lab 4TE (Decagon Devices), que possui uma lâmina higroscópica de cloreto de lítio, que alterna resistência elétrica ou condutância, fornecendo a atividade em água.

#### 4.3.2.3.3 *Estatística*

Os dados foram organizados em tabelas descritivas contendo frequências absolutas, frequências relativas percentuais (proporções), médias, desvios padrão. Para comparar os tratamentos entre si, com relação a variáveis quantitativas, foi utilizado o Teste F da ANOVA. Para comparação das proporções de fungos em cada tratamento e em cada gênero foi utilizado o Teste k de proporções independentes da ANOVA. Para associar os gêneros de fungos e leveduras com os tratamentos foi utilizado o Teste Qui-quadrado de independência. Em todos os testes utilizados na pesquisa o resultado foi considerado significativo se o valor  $P < 0,05$ . Ainda, uma equação de regressão foi desenvolvida a fim de verificar o comportamento logarítmico da redução da carga total de fungos após os tratamentos com ozônio. Para análise dos dados foi utilizado o software Statistica, versão 7.

O fluxograma do estudo arroz em casca em diferentes tratamentos com gás ozônio é esquematizado na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática do preparo de amostras, tratamentos de ozônio e análises realizadas no arroz em casca armazenado estudado.



## 4.4 RESULTADOS

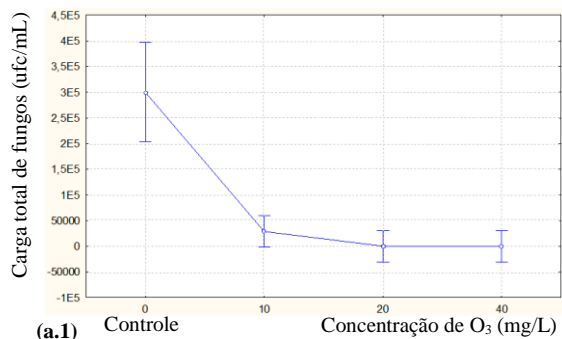
Dados sobre o efeito do gás  $O_3$  no arroz em casca quanto a carga total de fungos e distribuição de água (conteúdo de umidade e  $a_w$ ) para cada tratamento de  $O_3$  (Grupos 1, 2 e 3) foram avaliados estatisticamente por meio do teste ANOVA, sendo que os resultados estão apresentados na Tabela 1 e Figura 3.

Tabela 1. Resultados do arroz em casca tratado com gás ozônio quanto à carga total de fungos e distribuição de água

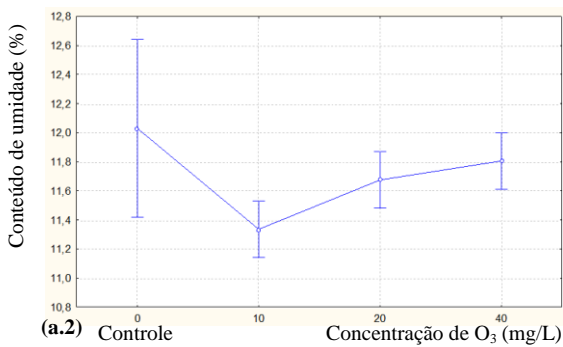
Parâmetros Analíticos	Tratamento com $O_3$			Dados		$P^b$
	Grupo	Concentração (mg/L)	$N^a$	Média±DP	Amplitude	
Carga total de fungos (ufc/mL)	C	0	1	$3,0 \times 10^5 \pm NA$	NA	0,00002
	1	10	10	$2,8 \times 10^4 \pm 8,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^{-2} - 2,6 \times 10^5$	
	2	20	10	$1,6 \times 10^2 \pm 5,4 \times 10$	$9,5 \times 10^{-2} - 2,5 \times 10^2$	
	3	40	10	$1,4 \times 10^2 \pm 7,7 \times 10$	$2,5 \times 10^{-2} - 2,9 \times 10^2$	
Conteúdo de umidade (%)	C	0	1	$12,03 \pm NA$	NA	0,00666
	1	10	10	$11,34 \pm 0,30$	11,01-11,85	
	2	20	10	$11,68 \pm 0,31$	11,23-12,02	
	3	40	10	$11,81 \pm 0,29$	11,4-12,24	
Atividade Água	C	0	1	$0,67 \pm NA$	NA	0,00025
	1	10	10	$0,65 \pm 0,01$	0,63-0,66	
	2	20	10	$0,63 \pm 0,02$	0,61-0,66	
	3	40	10	$0,61 \pm 0,02$	0,56-0,64	

<sup>a</sup>número de amostras analisadas; <sup>b</sup>Teste *f* se  $P < 0,05$ : diferença significativa; DP: desvio padrão; NA: não aplicável

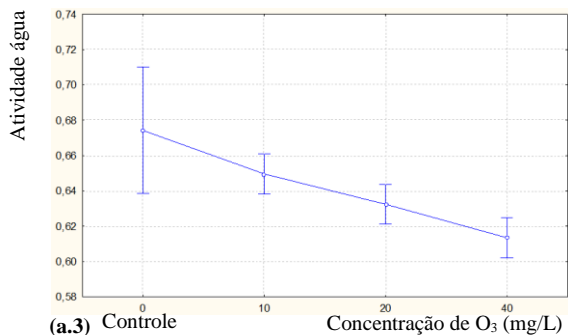
Figura 3 - Resultados gráficos do arroz em casca tratado com ozônio quanto a fungos e distribuição de umidade: (a.1) carga total de fungos, (a.2) conteúdo de umidade, (a.3) atividade água para cada concentração de ozônio (10, 20 e 40 mg/L para os Grupos 1, 2 e 3, respectivamente) aplicada.



(a.1)



(a.2)



(a.3)



#### 4.4.1 Distribuição de umidade e carga total de fungos

O teste estatístico aplicado mostrou que a carga total de fungos e a distribuição de umidade variaram com as diferentes concentrações de  $O_3$  aplicadas ( $P < 0,05$ ). O conteúdo de umidade e  $a_w$  também apresentaram diferenças entre os tratamentos, tendo suas médias reduzidas após a aplicação de  $O_3$  (Tabela 1). A carga total de fungos apresentou diferença significativa entre os tratamentos de  $O_3$ , sendo expressa como uma importante redução: para o tratamento de 10 mg / L, houve uma redução de 90,40 %, a qual atingiu a marca de 99,95 % para ambos os tratamentos de 20 e de 40 mg / L (Tabela 2).

Tabela 2 - Proporções da redução da carga total de fungos no arroz em casca após diferentes tratamentos com gás ozônio

Grupos	Tratamento com $O_3$ (mg/L)	Carga total de fungos (ufc/mL)	Proporção de redução (%)
C	0	$3,0 \times 10^5$	NA <sup>a</sup>
1	10	$2,8 \times 10^4$	90,40
2	20	$1,6 \times 10^2$	99,95
3	40	$1,4 \times 10^2$	99,95

<sup>a</sup> não aplicável

#### 4.4.2 Distribuição dos gêneros de fungos versus tratamentos com gás $O_3$

A distribuição e a proporção dos gêneros de fungos isolados de amostras de arroz estão apresentadas na Tabela 3, a qual indica a presença de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Alternaria* e *Aureobasidium* além de leveduras no substrato analisado. Diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas entre a distribuição e proporção de gêneros de fungos para cada tratamento de gás  $O_3$  pelo Teste k da ANOVA. Mesmo com a acentuada redução da carga fúngica, os resultados sugerem uma certa resistência dos gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e de leveduras frente ao gás  $O_3$  nas condições de aplicação do presente estudo, já que suas proporções

foram mantidas quando a concentração de gás O<sub>3</sub> aumentou (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição e proporção dos gêneros de fungos no arroz em casca após diferentes tratamentos com gás ozônio

Gênero de fungos	Número total e proporção (%) de amostras positivas após cada tratamento com gás ozônio (mg/L)				P <sup>b</sup>
	Sem tratamento <sup>a</sup>	Grupo 1 (10)	Grupo 2 (20)	Grupo 3 (40)	
<i>Aspergillus</i>	10 (100)	3 (30)	6 (60)	6 (60)	< 0,001
<i>Penicillium</i>	10 (100)	10 (100)	6 (60)	7 (70)	< 0,001
<i>Acremonium</i>	10 (100)	1 (10)	NI <sup>c</sup> (NA <sup>d</sup> )	NI (NA)	< 0,001
<i>Alternaria</i>	10 (100)	1 (10)	1 (10)	NI (NA)	< 0,001
<i>Aureobasidium</i>	10 (100)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	< 0,001
Leveduras	NI <sup>a</sup> (NA) <sup>b</sup>	NI (NA)	3 (30)	2 (20)	< 0,001

<sup>a</sup> Controle <sup>b</sup> Teste *k* se P<0,05: diferença significativa <sup>c</sup> não isolado <sup>d</sup> não aplicável

#### 4.4.3 Ocorrência de fungos e leveduras

A ocorrência de fungos juntamente com leveduras bem como apenas de leveduras isolados para cada tratamento com O<sub>3</sub> das amostras de arroz em casca estão na Tabela 4. O teste qui-quadrado indicou diferença significativa (P < 0,05) entre estes dois eventos, indicando que as leveduras são mais resistentes ao gás O<sub>3</sub> quando comparadas aos fungos, nas condições aplicadas ao presente estudo.

Tabela 4 - Efeito na distribuição de fungos e leveduras no arroz em casca após diferentes tratamentos com gás ozônio

Fungos e/ou leveduras	Distribuição de fungos e leveduras <i>versus</i> tratamento com O <sub>3</sub> (mg/L)				P <sup>b</sup>
	Sem tratamento <sup>b</sup>	Grupo 1 (10)	Grupo 2 (20)	Grupo 3 (40)	
Fungos+leveduras	50	16	14	14	0,0118
Leveduras	NI <sup>c</sup>	NI	3	2	

<sup>a</sup> Controle <sup>b</sup> Qui-quadrado se P<0,05: diferença significativa <sup>c</sup> não isolado

## 4.5 DISCUSSÃO

Como esperado, os parâmetros analíticos (carga total de fungos; conteúdo de umidade;  $a_w$ ) que no arroz em casca não-tratado (Controle), estavam elevados ( $3,0 \times 10^5$  ufc / mL; 12,03 %; 0,67; respectivamente), nos Grupos 1, 2 e 3 tratados com  $O_3$  apresentaram variações tais como importante redução no crescimento de fungos e redução na média da distribuição de água. Após os tratamentos, o parâmetro analítico que mais foi alterado no arroz em casca foi a carga total de fungos (de  $10^5$  para  $10^2$  ufc / mL para os Grupos 2 e 3 de concentração de  $O_3$  de 20 e 40 mg / L), seguido por conteúdo de umidade e  $a_w$ , embora em menor intensidade. Todos os dados foram estatisticamente analisados, indicando que os resultados da carga total de fungos, conteúdo de umidade e  $a_w$  variaram significativamente ( $P < 0,05$ ) em relação às diferentes concentrações de  $O_3$  aplicadas.

Os dados relativos à carga total de fungos apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1), indicando que houve uma diminuição de 90,40 % para o tratamento de 10 mg / L de  $O_3$  (Grupo 1) e alcançando 99,95 % de destruição de fungos, para os tratamentos de concentração de gás  $O_3$  mais elevados (20 e 40 mg / L nos Grupos 2 e 3, respectivamente). Esta taxa de redução na carga total de fungos corresponde a uma redução na ordem de 3 log (de  $10^5$  a  $10^2$  ufc / mL), de forma que se mostrou na mesma proporção que Tiwari et al. (2010) e McDonough et al. (2011), relataram em grãos de cereais após submetidos a tratamentos com o gás  $O_3$ . Não obstante, Antony-Babu e Singleton (2009) verificaram ainda que a inibição fúngica ocasionada pelo tratamento com gás  $O_3$  foi proeminente mesmo em organismos que foram expostos a níveis bastantes baixos (0,2  $\mu\text{mol} / \text{mol}$ ) de  $O_3$  por curto período de tempo (10 minutos), sendo já capaz de degradar tanto o micélio quanto os esporos dos fungos estudados. Ainda, este comportamento de redução observado no estudo corresponde a uma regressão logarítmica, a qual, depois de uma determinada concentração de  $O_3$  (no caso: 20 mg / L nas condições de aplicação realizadas neste estudo), não é mais esperada uma redução da carga total de fungos. Por

consequente, esta informação proveniente da regressão logarítmica estabelecida no estudo pode ser empregada como uma ferramenta para o desenvolvimento de avaliações de custo-benefício para a aplicação O<sub>3</sub> em arroz em casca em larga escala.

No que diz respeito à distribuição e proporção de gêneros dos fungos isolados de amostras de arroz em casca analisadas (Tabela 3), identificou-se a presença de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, bem como de leveduras. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas entre a proporção gêneros de fungos para cada tratamento de O<sub>3</sub> aplicado no arroz em casca, o que demonstra que um aumento na concentração de O<sub>3</sub> leva a uma redução significativa dos fungos isolados. Além disso, os dados sugerem uma resistência dos gêneros *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e leveduras frente ao O<sub>3</sub>, já que suas proporções mantiveram-se quando a concentração de O<sub>3</sub> aumentou. Cárdenas et al. (2011) relataram que uma variedade de resultados vem sendo registrada na literatura científica em função das concentrações de O<sub>3</sub> aplicados, dos tipos de aplicação (gás ou líquido), bem como da matriz de alimento (grãos, frutos, alimentos para animais) . Contudo, os resultados obtidos estiveram de acordo com o relatado por White et al (2007), cujo estudo realizou uma avaliação da degradação de fungos pelo O<sub>3</sub> em milho e verificou susceptibilidade dos gêneros na seguinte ordem: *Rhizopus* > *Fusarium* > *Aspergillus* > *Mucor* > *Penicillium*. Além disso, os mesmos autores sugeriram que o O<sub>3</sub> pode ser mais eficaz para determinados gêneros de fungos em diferentes concentrações, que também foi observado no presente estudo.

Ainda, a ocorrência de fungos e leveduras simultaneamente foi significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) da ocorrência de somente leveduras para cada tratamento de O<sub>3</sub> (Tabela 4). Portanto, estes dados confirmam que as leveduras são mais resistentes que os fungos frente ao tratamento com gás O<sub>3</sub>, conforme sugerido pela Tabela 3. Este fato vem a corroborar com as preocupações sobre a contaminação por micotoxinas, já que estes microrganismos não são conhecidos por produzirem estes compostos.

É importante enfatizar que o gênero *Fusarium* não foi isolado das amostras de arroz em casca analisadas, já que estas foram armazenadas, apresentaram baixo conteúdo de umidade (12,03 %) e as condições de armazenagem não foram adequadas / ótimas para o desenvolvimento deste gênero de fungo. O conteúdo de umidade ideal para fungos de campo, incluindo *Fusarium*, é conhecido por variar de 20 a 23% (Scussel et al., 2011). White et al (2007) apresentou um crescimento de *Fusarium* no milho no em níveis de conteúdo de umidade tão baixo como 16 %. No entanto, as amostras de arroz em casca deste estudo não alcançaram estes níveis de conteúdo de umidade. Além disso, o arroz armazenado e suas condições de temperatura, luz e ventilação também podem impedir o crescimento de *Fusarium*.

No que diz respeito aos dados de conteúdo de umidade e  $a_w$  em função dos tratamentos de  $O_3$ , houve diferenças registradas na forma de redução destes parâmetros, mesmo que ligeiramente, ou seja, de 12,03 para 11,61 % de conteúdo de umidade e 0,67 para 0,63 de  $a_w$ . Essa redução não foi acentuada provavelmente devido ao fato de que o fluxo da corrente de gás de ozonizado (1L / min) e o tempo da aplicação desta corrente (1,6 min) foram provavelmente curtos, não permitindo uma grande percentagem de liberação de umidade a partir de tecidos mais internos do arroz em casca. Outros estudos relatam tratamentos de outros alimentos com exposições mais longas de  $O_3$ , de 60 a 189 minutos, permitindo maior tempo de efeito do gás sobre a estrutura química das toxinas (Tiwari et al., 2010; Scussel et al, 2011; Giordano et al, 2012). Contudo, Mendez et al. (2003) observaram a ocorrência de alterações organolépticas indesejáveis quando o arroz foi submetido a concentrações de  $O_3$  maiores que 50 mg / L; devido a este fato, o tempo de exposição do gás  $O_3$  no presente estudo foi mantido curto de maneira que a concentração do gás ficasse abaixo deste limite.

## 4.6 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o gás O<sub>3</sub>, pode ser uma alternativa eficaz e confiável para a redução da contaminação fúngica de arroz armazenado e para, conseqüentemente, evitar danos na saúde humana provenientes da ocorrência fungos toxigênicos viáveis no cereal. Além disso, a taxa de redução da carga total de fungos demonstrou um comportamento logarítmico, que pode ser empregado como uma ferramenta para o desenvolvimento de avaliações de custo-benefício para a aplicação de O<sub>3</sub> em arroz em casca armazenado em larga escala.

O tratamento com O<sub>3</sub>, do ponto de vista ecológico, é mais valioso que meios químicos de desinfecção, o que se torna apropriado, já que legislações relacionadas a alimentos demandam o uso de aditivos seguros ao meio ambiente, bem como há cada vez mais incentivos para o desenvolvimento de novas alternativas para desinfectar grãos.

Este é o primeiro trabalho realizado com O<sub>3</sub> sobre fungos e micotoxinas em arroz em casca, alimento básico dos brasileiros e também de países orientais como China, Japão, Tailândia, Indonésia, Malásia e Ilhas do Pacífico Sul.

## 4.7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem (a) a Cooperativa Juriti, localizada na cidade de Massaranduba, Norte de Santa Catarina pela parceria fornecendo amostras de arroz e pelo suporte financeiro, bem como (b) a CAPES pela bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

AGUAYO, E., ESCALONA, V.H., ARTÉS, F. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 39, 169-177, 2006.

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

ANTONY-BABU, S., SINGLETON, I. Effect of ozone on spore germination, spore production and biomass production in two *Aspergillus* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, 413-422, 2009.

AOAC. **Official methods of analysis**. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2005.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Water Works Association: Washington, 1999.

BEBER-RODRIGUES, M., SCUSSEL, V.M. Mycoflora and mycotoxicological quality of four freshly harvested paddy rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and the relation with the harvest to industry reception timing. Article accepted for publication in **Rice Science** -Manuscript ID: RiceSci-2012-0076. 2013.

BRASIL. Instrução Normativa IN Nº 9 de 24/03/2000. Dispõe sobre o preparo de soluções padrões de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, tricotecenos e fumonisina B<sub>1</sub>. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 05 mar. 2013.

BRASIL. Resolução RDC Nº 7, de 18/02/2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10 ago. 2011.

CÁRDENAS, F.C., ANDRÉS, S., GIANNUZZI, L., ZARITZKY, N.. Antimicrobial action and effects on beef quality

attributes of a gaseous ozone treatment at refrigeration temperatures. **Food Control**, v. 22, p. 1442-1447, 2011.

DESVIGNES, C.; CHAURANDA, M.; DUBOIS, M.; SADOUDI, A.; ABECASSIS, J.; LULLIEN-PELLERIN, V. Changes in common wheat grain milling behavior and tissue mechanical properties following ozone treatment. **Journal of Cereal Science**, p. 245–251. 2008.

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

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and Nutrition Paper No. 81**. 2004.

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

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, v. 37, p. 453–460, 2004.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E. A. L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, v.39, 2009.

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



- KOTTAPALLI, B., WOLF-HALL, C.E., SCHWARZ, P.  
Evaluation of gaseous ozone and hydrogen peroxide treatments for reducing *Fusarium* survival in malting barley. **Journal of Food Protection**, p. 1236–1240. 2005.
- MCDONOUGH, M. X.; CAMPABADAL, C. A.; MASON, L. J.; MAIER, D. E.; DENVIR, A.; WOLOSHUK, C. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, p. 249-254. 2011.
- MENDEZ, F.; MAIER, D. E.; MASON, L. J.; WOLOSHUK, C. P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, p. 33–44. 2003.
- RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; STEPONAVICIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVICIENĖ, A.; ZVICEVICIUS, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Ann Agric Environ Med**, v. 13, p. 287–294, 2006.
- SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C..  
**Introduction to food and airborne fungi**. CBS: Wageningen, 2004.
- SCUSSEL, V.M. BEBER, M., TONON, K.M. **Seminário sobre Giberela em cereais de inverno**. Berthier: Passo Fundo, 2011.
- SCUSSEL, V.M., GIORDANO, B.N., SIMAO, V., MANFIO, D., GALVAO, S., RODRIGUES, M.N.F. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled Brazil Nuts during storage. *International Journal of Analytical Chemistry*, p. 1-9. 2011.
- TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Review

- Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, p. 248–255. 2010.

VICAM, L.P. **AOZ HPLC Instruction Manual**. Vicam: Watertown, 2004

WEBER, R. W. S., PITT, D.. Teaching Techniques for Mycology: Riddell's Slide Cultures. **Mycologist**, v. 14, 118-120, 2000.

WHITE, S. D.; MURPHY, P. T.; BERN, C. J.; LEEUWEN, J. van. Controlling deterioration of high-moisture maize with ozone treatment. **Journal of Stored Products Research**, p. 7–12. 2010.

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

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

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

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

- Todas as cultivares de arroz recém-colhido apresentaram comportamento semelhante, sendo que nenhuma cultivar específica apresentou resistência ou suscetibilidade significativa para algum dos parâmetros analisados.
- Ainda que a contaminação fúngica tenha ocorrido, o tempo de espera no caminhão não apresentou relação direta com o conteúdo de umidade, atividade água, carga total de fungos e micotoxinas; o que demonstra que este o tempo de espera não influenciou estas variáveis.
- A distribuição de gêneros de fungos indicou uma presença ubíqua de *Aspergillus* e *Penicillium* no arroz recém-colhido; no entanto, não foram detectadas micotoxinas neste estudo. De qualquer forma, o conhecimento sobre os padrões de infecção fúngica em arroz recém-colhido pode corresponder a uma importante ferramenta para na prevenção da deterioração fúngica tanto no campo como no armazenamento.
- O tratamento com gás  $O_3$  demonstrou ser uma alternativa eficaz para a redução da contaminação fúngica de arroz armazenado e para, conseqüentemente, evitar danos na saúde humana provenientes da ocorrência fungos toxigênicos viáveis neste alimento.
- A taxa de redução da carga total de fungos com o tratamento estudado demonstrou um comportamento logarítmico, que pode ser empregado como uma ferramenta para o desenvolvimento de avaliações de custo-benefício para a aplicação de  $O_3$  em arroz em casca armazenado em larga escala.
- O tratamento com  $O_3$ , do ponto de vista ecológico, é mais valioso que meios químicos de desinfecção, já que legislações relacionadas a alimentos demandam o uso de aditivos seguros ao meio ambiente.