

Juliana Regina da Silva

**FUNGOS: ESTRATÉGIAS DE DESCONTAMINAÇÃO POR  
PLASMA A FRIO E OZÔNIO GASOSO NA SEGURANÇA DE  
ALIMENTOS EXTRUSADOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do Grau  
de Doutora em Ciência dos Alimentos  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Vildes Maria  
Scussel  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Elisa  
Helena Moecke

Florianópolis  
2019

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

Silva, Juliana Regina da  
FUNGOS: ESTRATÉGIAS DE DESCONTAMINAÇÃO POR PLASMA  
A FRIO E OZÔNIO GASOSO NA SEGURANÇA DE ALIMENTOS  
EXTRUSADOS / Juliana Regina da Silva ;  
orientadora, Vildes Maria Scussel, coorientadora,  
Elisa Helena Moecke, 2019.  
200 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Cães. 3.  
Descontaminação. 4. Fungos. 5. Ração extrusada. I.  
Scussel, Vildes Maria. II. Moecke, Elisa Helena.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.  
IV. Título.

Juliana Regina da Silva

**FUNGOS: ESTRATÉGIAS DE DESCONTAMINAÇÃO POR  
PLASMA A FRIO E OZÔNIO GASOSO NA SEGURANÇA DE  
ALIMENTOS EXTRUSADOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“Doutor em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma  
final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2019.

---

Prof. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dra.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Vildes Maria Scussel, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Anelise Leal Vieira Cubas, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Geovana Dagostim Savi, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade do Extremo Sul Catarinense

---

Prof.<sup>a</sup> Ananda Portella Félix, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal do Paraná

---

Prof. Diego Peres Netto, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico este trabalho ao meu amado esposo Samuel, por todo amor, paciência e conselhos que me impulsionaram para chegar aqui.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por permitir todas as minhas conquistas e me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais, Rosane e Evaldo, pelo amor incondicional, incentivo, oportunidades proporcionadas que me fizeram ir em frente e pelos princípios ensinados.

Ao meu esposo e amigo Samuel, obrigada por toda paciência, companheirismo, por ter participado juntamente comigo do desenvolvimento deste trabalho e por sempre acreditar que eu chegaria aqui.

A minha orientadora, Profa. Vildes Scussel, pelas oportunidades cedidas e orientação.

A minha co-orientadora, Profa. Elisa Moecke, por todos os ensinamentos compartilhados, conselhos, paciência e orientação durante todo o trabalho, principalmente nas etapas do plasma. Obrigada por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa, com sua humildade e sabedoria.

As minhas amigas do LABMICO, Geovana Savi, Clarissa Aquino, Neyele Cristina, Bruna Silva, Cristina Runtzel, Roberta Valmorbida em especial a Marcella Pereira, Lívia Escatolin e Sabrina Freire, por todos os momentos compartilhados, palavras de incentivo, ajuda na realização desse trabalho e pelos vários momentos de descontração.

A Dona Sônia, por suas palavras de conforto.

A equipe do Laboratório de Plasma da Unisul, Kauan, Júlio, Rodrigo, João, Marina e Profa. Anelise Cubas. Obrigada pelo auxílio em etapas importantes dos experimentos com plasma, por toda paciência e experiências compartilhadas.

Ao Laboratório de Nutrição Animal, Laboratório de Físico-química e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, em especial ao Prof. Diego Netto, Meri Zanetti, Gisele Olivo e Susane Lopes, pelo auxílio de etapas importantes deste trabalho.

Aos professores Ananda Félix e Diego Netto, que sempre estiveram comigo desde o início da minha vida acadêmica, me dando apoio e que me inspiraram como profissionais. Obrigada pela amizade e confiança.

Aos meus cães, que sempre foram a inspiração de meus estudos, Sebastião, Bellatrix, Sol, Lua, Dengoso, Mel, Luna, Vitória, Waldemiro, Valentina, Princesa, Sophie e Joaquim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio da bolsa.

E por fim, agradeço a todos que contribuíram para minha formação profissional e para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!



“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se  
quiser conhecer as borboletas.”  
(Antoine de Saint-Exupéry)



## RESUMO

A indústria de alimentos para animais de estimação vem crescendo ao longo dos anos impulsionada pela exigência dos tutores desses animais quanto a qualidade nutricional, bem-estar e segurança desses alimentos. As rações comercialmente disponíveis apresentam composições diversificadas, como carne e/ou vegetais, cereais, gorduras, vitaminas e minerais, os quais durante o processamento estão susceptíveis à contaminação por propágulos fúngicos, que também já poderiam estar incorporados às matérias primas. A presença desses microrganismos em grãos e rações assim como outros organismos vivos como insetos e ácaros, está sujeita a influência de fatores ambientais como umidade e temperatura. Portanto, a contaminação desses alimentos comerciais pode variar de acordo com as condições ambientais, métodos de processamento ou produção e armazenamento. Diante desse contexto, o objetivo foi estudar estratégias de descontaminação fúngica utilizando métodos alternativos, como o ozônio gasoso e plasma a frio em cepas fúngicas de armazenagem encontradas nesses alimentos. Indicadores de qualidade e segurança alimentar como sujidades leves e contagens totais fúngicas foram avaliadas em amostras de alimentos para esses animais comercializadas em embalagens fechadas e a granel. Constatou-se que 34% tiveram alguma sujidade detectada, sendo 30% delas em alimentos comercializados a granel. A principal sujidade encontrada foram fragmentos de insetos, nas amostras a granel. Em relação à contagem total de fungos, 48% das amostras vendidas a granel apresentaram contaminação, em contrapartida com as embalagens fechadas que apresentaram apenas 28%. Em avaliação realizada para verificar as condições de comercialização em embalagens abertas (à granel), essa forma de exposição proporcionou aumento nos teores de umidade, favorecendo o crescimento de fungos. A presença de insetos e pelos de roedores no produto final também devem ser considerados como importantes veiculadores desses agentes biológicos. No estudo de descontaminação por gás ozônio ( $O_3$ ) em rações inoculadas com *Aspergillus flavus*, um dos principais fungos de armazenagem encontrados nesses alimentos, mostrou sua eficácia (98,3%) sobre esses esporos após 120 min em concentração de 40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$ . Em adição, os valores de umidade antes e após os tratamentos não apresentaram diferença entre eles, mantendo os alimentos dentro dos parâmetros seguros estabelecidos pela indústria para evitar o crescimento fúngico. O mesmo ocorreu com a estabilidade lipídica, em que o gás  $O_3$  não alterou esse parâmetro. Assim, é possível inferir que o gás  $O_3$  teve um efeito

positivo na inativação de *A. flavus* em alimentos para cães e pode ser um procedimento promissor, com potenciais aplicações na área de venda de alimentos. Com relação a descontaminação por plasma a frio (potência de 240 W) em estudos *in vitro*, este mostrou eficiência na inativação de fungos (100%), especialmente *A. flavus*, *Fusarium verticillioides* no tempo de 10 min e *Penicillium citrinum* no tempo de 20 min de exposição, e em adição apresentaram alta sensibilidade quanto a alterações morfológicas, mortalidade e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nas hifas. No estudo *in vivo*, realizado em alimentos extrusados naturalmente contaminados e inoculados com *A. flavus*, o plasma a frio (540 W) mostrou ser efetivo na inativação desses microrganismos após 20 e 40 min de tratamento, no entanto, resultou na alteração do conteúdo lipídico da ração. Neste sentido, tanto o gás ozônio como o plasma a frio possuem vantagens de inativarem cepas fúngicas, são internacionalmente reconhecidos como seguros, além de não deixarem resíduos nos alimentos, podem ser métodos promissores de descontaminação a serem aplicados em alimentos extrusados para cães, a fim de reduzir a contaminação e garantir a segurança do alimento.

**Palavras-chave:** Cães. Descontaminação. Fungos. Ração extrusada.

## ABSTRACT

The pet food industry has been growing over the years driven by the demand of tutors of these animals on the nutritional quality, well-being and safety of these foods. Commercially available feeds contain diversified compositions such as meat and / or vegetables, cereals, fats, vitamins and minerals, which during processing are susceptible to contamination by fungal propagules, which could already be incorporated into the raw materials. The presence of these microorganisms in grains and rations as well as other living organisms such as insects and mites is subject to the influence of environmental factors such as humidity and temperature. Therefore, the contamination of such commercial foods may vary according to environmental conditions, processing methods or production and storage. In this context, the objective was to study fungal decontamination strategies using alternative methods, such as gaseous ozone and cold plasma in fungal storage strains found in these foods. Quality and food safety indicators such as light soil and total fungal counts were evaluated in food samples for these animals marketed in closed and bulk packages. It was found that 34% had some dirt detected, 30% of them in food marketed in bulk. The main soil found was fragments of insects, in bulk samples. Regarding the total fungal count, 48% of the samples sold in bulk showed contamination, in contrast to the closed packs that presented only 28%. In an evaluation carried out to verify the conditions of commercialization in open packages (in bulk), this form of exposure provided an increase in the moisture content, favoring the growth of fungi. The presence of insects and rodents in the final product should also be considered as important carriers of these biological agents. In the study of decontamination by ozone gas ( $O_3$ ) in rations inoculated with *Aspergillus flavus*, one of the main storage fungi found in these foods showed its efficacy (98.3%) on these spores after 120 min at 40 and 60  $\mu\text{mol/mol}$ . In addition, the values of moisture before and after the treatments did not present any difference between them, keeping the foods within the safe parameters established by the industry to avoid the fungal growth. The same happened with the lipid stability, in which the gas  $O_3$  did not change this parameter. Thus, it is possible to infer that  $O_3$  gas had a positive effect on the inactivation of *A. flavus* in dog food and may be a promising procedure with potential applications in the area of food sales. With respect to cold plasma decontamination (240 W power) in in vitro studies, this showed efficiency in the inactivation of fungi (100%), especially *A. flavus*, *Fusarium verticillioides* at 10 min and *Penicillium citrinum* at 20 min of exposure, and in addition showed high

sensitivity regarding morphological alterations, mortality and increased production of reactive oxygen species in the hyphae. In the in vivo study, in naturally contaminated extruded foods inoculated with *A. flavus*, cold plasma (540 W) showed to be effective in the inactivation of these microorganisms after 20 and 40 min of treatment, however, it resulted in the alteration of the lipid content of the ration. In this sense, both ozone gas and cold plasma have the advantages of inactivating fungal strains, are internationally recognized as safe, and do not leave residues in food, can be promising methods of decontamination to be applied in extruded dog foods, in order to reduce contamination and ensure food safety.

**Keywords:** Dogs. Decontamination. Fungi. Extruded food.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Processo de extrusão.....	36
FIGURA 2. Matriz contendo orifícios para vários formatos de extrusados.....	38
FIGURA 3. Processo de produção de alimentos extrusados para cães.....	40
FIGURA 4. Inseto em alimento extrusado para cães do tipo Super-Premium.....	44
FIGURA 5. Gerador de ozônio (a) tipo descarga corona e (b) esquema de reação .....	58
FIGURA 6. Esquema do reator de plasma a frio em descarga em barreira dielétrica, do tipo ponta plano com vários eletrodos.....	62

### CAPÍTULO 2.

FIGURA 1. Porcentagem de sujidades leves detectadas em alimentos extrusados para cães vendidos a granel e em embalagem fechada: (a) total detectado e (b) tipos identificados em amostras .....	95
FIGURA 2. Diferentes sujidades leves detectadas em alimentos extrusados para cães comercializados (a) a granel: (a.1) inseto inteiro; (a.2) fragmento de inseto; (a.3) pelo de roedor e (b) embalagens fechadas: (b.1) e (b.2) fragmentos de inseto.....	96
FIGURA 3. Características de condições de venda, de amostras (a) granel e (b) embalagens fechadas são comercializadas.....	103

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Efeito da aplicação de ozônio (O <sub>3</sub> ) (concentração: 40 e 60 µmol / mol; tempo de exposição: 30, 60 e 120 min) na inativação de esporos de <i>Aspergillus flavus</i> em alimentos secos extrusados contaminados: (a) Standard e (b) tipos Super-premium [Grupos: CG (Controle), TGI (40 µmol/mol) e TGII (60 µmol/mol)].....	113
FIGURA 2. Características comerciais de alimentos secos extrusados de cada tipo: (a) dimensões de ração; (b) distribuição dos poros da superfície (por estereoscopia - 400x) e (c) variabilidade do diâmetro dos poros (por microscopia eletrônica de varredura - 3.000x) [1 - Padrão e 2 - Super-Premium].....	118

FIGURA 3. Alimento seco extrusado para cães vendidos em pequenas porções (a granel) em sacos abertos em lojas de animais - hábito praticado em vários países..... 120

#### CAPÍTULO 4

FIGURA 1. Diferentes reatores de plasma a frio: (a) tipo ponta-plano (um eletrodo); (b) jato de plasma e (c) descarga em barreira dielétrica (ponta-plano) com vários eletrodos..... 133

#### CAPÍTULO 5

FIGURA 1. (a) Reator de plasma a frio (PF) tipo jato de plasma com descarga em barreira dielétrica; (b) colônia fúngica (*Aspergillus flavus*) controle e (c) mesma colônia fúngica após 8 dias de tratamento por PF.....170

FIGURA 2. Efeitos do plasma a frio em diferentes espécies de fungos sobre o crescimento da colônia: (a) *Aspergillus flavus*, (b) *Fusarium verticillioides* e (c) *Penicillium citrinum*, (os dados são apresentados como valores médios do diâmetro dos fungos).....172

FIGURA 3. Efeito do plasma a frio (10 min de exposição) na morfologia das hifas de (a) *Aspergillus flavus*, (b) *Fusarium verticillioides*, e (20 min exposição) (c) *Penicillium citrinum*, [Controle: sem tratamento (a,b,c.); Tratamento com plasma a frio: (a.1, b.1, e c.1)]. Microscopia eletrônica de varredura, 850, 1.000, 2.000 e 3.000× de aumento.....173

FIGURA 4. Efeito do diacetato de 2,7-diclorohidrofluoresceína em fungos tratados com plasma frio (exposição de 10 min) (a) *Aspergillus flavus*, (b) *Fusarium verticillioides*, e (exposição de 20 min) (c) *Penicillium citrinum* [Controle: sem tratamento (a, b, c); Tratamento com plasma frio: desenvolvimento de fluorescência de hifas (após produção de ROS - a.1, b.1, c.1)]. Imagens microscopia de fluorescência, 300 × aumento.....173

#### CAPÍTULO 6

FIGURA 1. Ração extrusada para cães no interior do plasma frio em geometria cilíndrica.....189



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1. Critérios para classificação de alimentos para animais de estimação.....	31
TABELA 2. Classificação do alimento de acordo com a sua função....	33
TABELA 3. Funções das embalagens em alimentos para cães em relação a diferentes barreiras.....	53
TABELA 4. Fungos toxigênicos, ingredientes e limites máximos de micotoxinas em alimentos para animais de estimação.....	55
TABELA 5. Aplicação de gás ozônio para inibição e inativação de bactérias e fungos em diferentes alimentos reportados na literatura.....	60
TABELA 6. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando ozônio.....	61
TABELA 7. Aplicação de plasma a frio para inibição e inativação de bactérias e fungos em diferentes alimentos reportados na literatura .....	64
TABELA 8. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando plasma a frio.....	65

### CAPÍTULO 2

TABELA 1. Contagem total fúngica e umidade em alimentos extrusados para cães vendidos a granel e em embalagem fechada.....	99
TABELA 2. Condições de venda dos alimentos comercializados para cães - vendidos a granel e em embalagem fechada no mercado.....	101

### CAPÍTULO 3

TABELA 1. Efeito do tratamento do gás ozônio em alimentos extrusados de dois tipos Standard e Super-Premium - umidade e índice de peróxido.....	117
---	-----

### CAPÍTULO 4

TABELA 1. Inativação de microrganismos em alimentos usando plasma a frio.....	136
TABELA 2. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando plasma a frio.....	138
TABELA 3. Inativação de microrganismos em alimentos usando ozônio.....	143
TABELA 4. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando ozônio.....	145

## CAPÍTULO 6

TABELA 1. Contagem total fúngica e umidade em alimentos extrusados para cães submetidos ao plasma frio..... 189

TABELA 2. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos em ração extrusada para cães em diversos tempos de tratamento por plasma frio..... 191

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação  
ANFALPET - Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação  
AFLs – aflatoxinas  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AAFCO - Association of American Feed Control Officials  
AOAC - Association of Official Analytical Chemistry  
Aw - Atividade de água  
BPF – Boas Práticas de Fabricação  
DBD - Descarga de Barreira Dielétrica  
DON - Deoxinivalenol  
FAO - Food and Agriculture Organization  
FBs - Fumonisinas  
FDA - Food and Drug Administration  
GRAS - Generally Recognized as Safe  
IARC - International Association on Research of Cancer  
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
Mc – conteúdo de umidade  
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura  
MF – Microscopia de Fluorescência  
OTA - Ocratoxina A  
PF- Plasma frio  
RNS - Reactive nitrogen species  
ROS – Reactive oxygen species  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
UR – Umidade relativa do ar  
USDA - United States Department of Agriculture  
USEPA - United States Environmental Protection Agency  
ZON - Zearalenona



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1	OBJETIVOS .....	24
1.1.1	Objetivo geral .....	24
1.1.2	Objetivos específicos .....	25
<b>CAPÍTULO 1</b> .....		<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1	ALIMENTOS PROCESSADOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO .....	29
2.1.1	Classificação dos alimentos .....	30
2.1.2	Composição e ingredientes .....	33
2.1.3	Processamento de alimentos extrusados para cães .....	34
2.1.4	Qualidade e segurança dos ingredientes e produto final .	40
2.2	CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM ALIMENTOS PARA CÃES .....	41
2.2.1	Fungos .....	42
2.2.2	Insetos, ácaros e pelos de roedores .....	42
2.2.3	Contaminantes orgânicos: micotoxinas.....	44
2.3	FATORES QUE INFLUENCIAM NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES.....	48
2.4	LEGISLAÇÃO PARA CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM ALIMENTOS PARA CÃES .....	53
2.5	PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS PARA CÃES .....	55
2.5.1	Gás ozônio como método descontaminante.....	58
2.5.2	Plasma como método de descontaminação em alimentos	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		<b>67</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>89</b>
<b>ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES COMERCIALIZADOS A GRANEL E EM EMBALAGEM FECHADA: CONTAMINAÇÃO POR ORGANISMOS VIVOS...</b>		<b>91</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>107</b>

<b>EFEITO ANTIFÚNGICO DO GÁS OZÔNIO EM ALIMENTOS EXTRUSADOS CONTAMINADOS COM <i>Aspergillus flavus</i> PARA CÃES</b>	
<b>109</b>	
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 4 ..... 127</b>
<b>PLASMA A FRIO E OZÔNIO COMO TECNOLOGIAS NÃO TÉRMICAS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO ..... 129</b>	
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 5 ..... 165</b>
<b>EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO PLASMA A FRIO NAS ESPÉCIES DE FUNGOS TOXIGÊNICOS DOS GÊNEROS <i>Aspergillus</i>, <i>Fusarium</i> E <i>Penicillium</i>. ..... 167</b>	
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO 6 ..... 183</b>
<b>PLASMA A FRIO NA DESCONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM RAÇÕES EXTRUSADAS PARA CÃES INOCULADAS E NATURALMENTE CONTAMINADAS E SEU PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS ..... 185</b>	
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 199</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A relação cada vez mais próxima entre homens e animais de estimação induz a busca por dietas que, além de suprirem suas necessidades nutricionais, proporcionem longevidade, bem-estar e saúde. Com ampla gama de produtos no mercado, proprietários passaram a não somente se interessar pelos níveis nutricionais das rações, como também pela sua segurança.

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2018), o Brasil possui a 2<sup>o</sup> maior população de animais de estimação (cães, gatos e aves ornamentais) do mundo, sendo a população de cães a mais numerosa com 52,2 milhões de animais, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Um estudo realizado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) estimou que 44,3% dos domicílios do país possuíam em 2013, pelo menos um cachorro (IBGE, 2013).

Como consequência, a produção de alimentos industrializados para animais de estimação contabilizou mais de 2,6 milhões de toneladas (SINDIRAÇÕES, 2017). O segmento de alimentação animal representa 66,8% de todo o mercado pet. Esse montante coloca o Brasil na segunda posição global do setor, perdendo apenas para os Estados Unidos (ABINPET, 2017).

A partir da procura por parte dos proprietários, em alimentos comerciais de qualidade, indústrias de alimentos para animais de estimação têm procurado redirecionar suas pesquisas. A qualidade das matérias-primas utilizadas para a fabricação desses alimentos é tão importante quanto à eficiência dos ingredientes e/ou nutrientes relacionados à saúde animal.

Nesses alimentos estão presentes subprodutos de origem animal e produtos agrícolas, principalmente grãos, que são amplamente utilizados na sua fabricação. Os grãos em geral apresentam grande susceptibilidade à proliferação por fungos, e quando encontram ambiente favorável para se desenvolverem, toda a matéria prima pode ficar comprometida, podendo acarretar em inúmeros prejuízos à saúde do animal e transtornos para seus donos.

Outros fatores de risco são inerentes aos estabelecimentos comerciais e até mesmo na residência do proprietário desse animal, principalmente no que se refere a armazenamento dos alimentos destinados aos animais de estimação. A utilização de matéria prima de qualidade baixa ou o incorreto armazenamento pode fazer com que haja

contaminação biológica (fungos, insetos, ácaros), comprometendo o produto e saúde do animal.

A contaminação por fungos pode causar grandes perdas econômicas associadas à redução de nutrientes, da palatabilidade e a presença de micotoxinas. Devido à capacidade de produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários com potencial de toxicoses ao homem e aos animais, causam impacto desde a queda da produtividade animal, favorecendo a uma debilidade imunológica, apresentando propriedades alergênicas, teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos.

O conhecimento da contaminação biológica, seja por organismos vivos (fungos toxigênicos, insetos e ácaros) ou contaminantes orgânicos (micotoxinas e pesticidas), é fundamental para que medidas sejam tomadas para o controle da contaminação e, portanto, prevenção de danos diretos ou indiretos aos animais de estimação. Embora exista conhecimento sobre os riscos de contaminação e seu dano à saúde, estudos quanto a métodos de descontaminação a fim de garantir a qualidade e segurança do produto final e consequentemente desses animais são escassos.

O ozônio ( $O_3$ ) é um importante agente germicida e um gás oxidante, que tem inúmeras aplicações na indústria de alimentos, mostrando ser eficaz contra fungos, micotoxinas, bactérias e pesticidas. Além disso, é reconhecido como seguro e não deixa resíduo no alimento e ambiente, pois é espontaneamente convertido em oxigênio ( $O_2$ ).

O plasma a frio, tecnologia mais recente que o  $O_3$ , vem sendo usado na indústria alimentícia com o mesmo intuito. Seu uso não altera sabor e odor do alimento, apresenta tratamento uniforme e não deixam resíduos. O plasma tem sido aplicado em alimentos para a descontaminação de fungos, bactérias, micotoxinas e pesticidas, além de ser usado também para esterilização superficial de embalagens.

Essas duas tecnologias não-térmicas de descontaminação, já demonstraram seu potencial em alimentos para humanos, no entanto ainda não existem estudos que comprovem sua eficácia em alimentos extrusados para animais de estimação. Além disso, a interação destes agentes antifúngicos, com os constituintes químicos e nutricionais dos alimentos extrusados ainda precisam ser melhor esclarecidos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral



Investigar estratégias alternativas de descontaminação fúngica através de plasma a frio (PF) e ozônio (O<sub>3</sub>) gasoso na segurança de alimentos extrusados para cães.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

1. Estudar a possível presença de fungos do gênero *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, conhecidos como toxigênicos em alimentos extrusados.

2. Investigar a presença de sujidades leves (insetos, pelo de roedores e ácaros) e fungos em alimentos comercializados a granel e em embalagem fechada na região da Grande Florianópolis.

3. Avaliar os efeitos antifúngicos in vitro do plasma a frio em diferentes espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, quanto ao crescimento de colônias e alterações de hifas (morfologia, mortalidade e espécies reativas do oxigênio).

4. Estudar o efeito descontaminante (PF e O<sub>3</sub> gasoso) para inativação de fungos em alimentos extrusados contaminados.



**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ALIMENTOS PROCESSADOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO

A alimentação dos animais de estimação passou por evolução visível nas últimas décadas. Na década de 80 a maioria deles ainda era alimentada com os restos de comida de seus proprietários, e poucas indústrias de rações existiam e investiam no Brasil. Neste ponto, dois fatores contribuíram para a expansão do segmento, o aumento do poder aquisitivo das populações dos grandes centros e a sofisticação dos padrões de consumo (PETBR, 2013). Além disso, proprietários estão cada vez mais preocupados com o que está sendo fornecido aos seus animais, sendo necessário maior controle tanto na qualidade da matéria prima bem como no produto acabado.

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação – ABINPET (2018), o Brasil registra atualmente uma população de 52, 2 milhões de cães, ficando atrás somente dos Estados Unidos. No ano passado, o setor faturou R\$20,3 bilhões, crescimento de 7,9% na comparação com o ano anterior. Desse total, 68,6% é representado pelo segmento de alimentação para animais. Em relação a um cenário mundial, o Brasil tem o terceiro maior faturamento desse mercado.

A produção de alimentos para animais de estimação segue as regras de um mercado competitivo que exige redução de custos sem comprometer a qualidade do produto final. A qualidade higiênico-sanitária do alimento animal é uma medida de controle da veiculação de patógenos e outros contaminantes que possam estar presentes. Muitos desses contaminantes são responsáveis pelo aparecimento de patologias em animais de estimação a curto e/ou longo prazo, já que são veiculados pelos alimentos fornecidos aos animais (DE SOUZA KOERICH, 2010). Essa situação acaba sendo agravada já que esses animais não possuem variação na dieta, normalmente baseada em alimentos industriais (ração e petiscos) que são fornecidos diariamente, podendo expor o animal ao contaminante presente de forma contínua.

Os alimentos comerciais para animais de estimação são encontrados em diversas formas para agradar seus proprietários. No entanto, deve seguir padrões de qualidade, como palatabilidade, digestibilidade, característica de fezes e segurança, sempre priorizando a saúde, bem-estar e longevidade animal (CARCIOFI, 2008).

Além dos parâmetros físicos e químicos, existem algumas classificações propostas de modo a facilitar o entendimento por parte do nutricionista e proprietários, como o teor de umidade (úmido, semi-úmido e seco), as indicações no rótulo (alimentos completos, alimentos especiais e alimentos complementares) e segunda a indústria (standard, premium e superpremium) (SAAD et al., 2005; SÀ-FORTES, 2005).

### **2.1.1 Classificação dos alimentos**

Na indústria, os alimentos para cães podem ser classificados quanto ao seu propósito de uso, o tipo de processamento que varia de acordo com o teor de água e por fim pela segmentação de mercado que se diferenciam nestas classificações com a qualidade das matérias primas utilizadas para formular a ração.

Há hoje um grande número de marcas de dietas comerciais prontas para o consumo, com formulações cada vez mais sofisticadas e específicas. Estabeleceu-se, com isto, elevada competitividade, o que tem levado à segmentação de produtos que apresentam padrões comerciais e nutricionais distintos. As empresas, de um lado, têm desenvolvido produtos específicos, chamando a atenção do consumidor para um alimento diferenciado e de elevado valor nutricional, com consequência também um maior custo. Estes apresentam formulação mais sofisticada, com o emprego de ingredientes selecionados e melhor processamento. Por outro lado, também são produzidos alimentos econômicos, de baixo valor agregado e que competem no mercado apenas por preço, sendo formuladas com ingredientes mais baratos (CARCIOFI, 2008).

Em relação ao seu processamento, existem três formas básicas de alimentos comerciais para animais de estimação baseada no teor de umidade: seco, semi-úmido e úmido (enlatados ou saches). Alimentos secos contêm geralmente menos de 11% de umidade, alimentos semi-úmidos com 15 a 30% e úmido, com aproximadamente 60 a 87% de água (NRC, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios para classificação de alimentos para animais de estimação.

Critério de classificação	Classificação
Teor de umidade	Seco (6 – 11%) Semi-úmido (15-30%) Úmido (60-87%)
Segmento de Mercado	Econômico Standard (padrão) Premium Superpremium

Adaptado do NRC (2006) e CARCIOFI (2007).

Alimento seco: representam a maior parte do que é produzido e vendido. São produzidos pelo processo de cozimento por extrusão, que utiliza pressão e temperatura em seu processamento para formação do produto final. Os carboidratos compreendem mais de 50% da fórmula (SÁ-FORTES, 2005). A conservação do produto é devida à baixa umidade aliada aos antioxidantes, antifúngicos e acidificantes. As embalagens têm como função impedir a entrada de água, oxigênio e luz no produto, aumentando o tempo de prateleira das dietas.

Alimento semi-úmido: são produzidos por meio de extrusão e caracterizam-se por apresentarem *kibbles* macios. A conservação destes produtos é através de baixo pH, antifúngicos, antioxidantes e umectantes. A umidade do produto varia de 15 a 30%, tornando o alimento mais palatável. As embalagens dos produtos semi-úmidos são mais caras que as das rações secas, uma vez que é produzida para uma maior proteção contra a perda de umidade, pois a desidratação afeta sua plasticidade e palatabilidade (ZICKER, 2008; SÁ-FORTES, 2005).

Alimentos úmidos: este tipo de alimento é formulado a base de proteínas e gorduras, com pequena concentração de carboidratos. Exigem a presença de agentes geleificantes, como as gomas, para alcançar sua consistência final (SÁ-FORTES, 2005). Devido ao alto teor de umidade (60-87%), esses alimentos geralmente contem níveis altos de carnes frescas ou congeladas.

Os alimentos úmidos são processados em cozimento sobre pressão semelhante a uma autoclave e seu principal meio de conservação é a esterilização do próprio processo. São alimentos com alta digestibilidade (80 a 85%) e palatabilidade. São produtos caros tendo em vista seu alto teor de água e o tipo de embalagem (CARCIOFI, 2004; FRANÇA et al., 2011). Esses alimentos são aqueles encontrados em latas ou saches que tem por objetivo fornecer uma refeição individual para o animal.

Os alimentos semi-úmidos e secos são mais práticos e mais fáceis de transportar, pois não precisam de refrigeração após serem abertos como os alimentos úmidos. As latas dos alimentos úmidos depois de abertas além de serem refrigeradas, devem ser consumidas rapidamente, pois pode sofrer uma rápida deterioração (JONES et al., 1999).

Os alimentos podem ainda ser classificados de acordo com a segmentação comercial: econômico, standard (padrão), premium e super premium. Essa segmentação é feita pela própria indústria e baseia-se na qualidade e no tipo de matéria-prima, concentração de nutrientes, características do rótulo e preço, sendo normalmente aceita pelos consumidores como um critério qualitativo que norteia decisões de compra (CARCIOFI, 2003).

Alimento econômico: ingredientes de baixo custo e formulação variável, em geral, apresentam baixa digestibilidade (até 75%) e palatabilidade. Os níveis nutricionais aproximam dos limites mínimos ou máximos permitidos, reduzindo os custos (FRANÇA, 2011). De acordo com Sá-Fortes (2005), são empregados farelos vegetais como fontes de carboidratos e os teores de fibra bruta e matéria mineral são elevados.

Alimento standard (padrão): produto similar ao alimento econômico, no entanto empregam-se níveis nutricionais melhores, com mais proteína e extrato etéreo. A digestibilidade e palatabilidade são melhores que os produtos econômicos. Recebem recursos relativos para publicidade e venda (FRANÇA, 2011).

Alimento premium: produto com formulação fixa na maioria das vezes. Possui alta digestibilidade e palatabilidade, incluindo apelos de vendas com ingredientes diferenciados e nutracêuticos. Visa ao melhor atendimento às necessidades nutricionais (CARCIOFI, 2007).

Alimento super premium: são aquelas formuladas com ingredientes com qualidade superior e elevado valor nutricional, possuindo um severo controle de qualidade. As matérias primas seguem padronização de acordo com a sua formulação, em que a ração deve ter o padrão de qualidade de acordo com o que está descrito na embalagem, oferecendo ao proprietário do pet uma maior confiança do produto que está comprado (MARTINS & PONTIERI, 2010). De acordo com Case et al. (2011), podem incluir ainda, ingredientes especiais, com benefícios diferenciados. Seu processamento é realizado com moagem mais fina e adequado cozimento.

Além do teor de umidade e da classificação das indústrias de acordo com a qualidade dos ingredientes, outra variação diferencia esses alimentos. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, de acordo com o artigo 3º do anexo I da IN 30 DE 05 de Agosto



de 2009, classifica o produto de acordo com a sua função: como completos, complementares e especiais de acordo com a Tabela 2 (BRASIL, 2009).

Tabela 2. Classificação do alimento de acordo com a sua função

Alimento	Função
Completo	Ingredientes, aditivos e matérias - primas que atendem as exigências nutricionais. Podem possuir propriedade funcional ou específica.
Complementares	Biscoitos, petiscos e ossinhos, que não dispõem de todos os nutrientes necessários para as exigências do animal. Finalidade de agrado e não devem ser a única refeição.
Especiais	Alimentos formulados para animais com problemas fisiológicos e metabólicos.

Adaptado de CARCIOFI (2008) e SÁ-FORTES (2005)

### 2.1.2 Composição e ingredientes

O mercado pet absorve hoje ampla gama de ingredientes e subprodutos, empregados na produção de alimentos variados, com densidades nutricionais e digestibilidades distintas. Esses alimentos são formulados com o objetivo de atender às necessidades específicas de nutrientes para suprir os diferentes estados fisiológicos de cães, como filhotes, crescimento, manutenção, de acordo com a *Association of American Feed Control Officials- AAFCO* (CASE et al., 2011).

Para fabricação das rações são necessários ingredientes energéticos, protéicos, vitaminas, minerais e aditivos, necessários para sustentar a vida e otimizar o desempenho dos animais de estimação. A escolha das matérias primas definirá uma ração de qualidade e seu objetivo no mercado (SÁ-FORTES, 2005).

As fontes proteicas para cães podem ser classificadas em origem vegetal, que incluem os grãos e os farelos provenientes de subprodutos de processos industriais de grãos e vegetais, e origem animal, provenientes de tecidos animais ou de subprodutos da indústria de carnes de frango, bovinos, suínos, ovinos, peixes, ovos, leite, etc. (SEIXAS et al., 2003).

Alguns exemplos de ingredientes protéicos de origem animal utilizados na formulação de rações para cães são farinha de frango, farinha de fígado de frango, farinha de subprodutos de frango, farinha de penas hidrolisadas, farinha de peixe, peixe, farinha de carneiro, farinha de carne e ossos, carne mecanicamente separada, ovos em pó, leite em pó (integral, semi-desnatado e desnatado). Os ingredientes de origem vegetal

são: grãos de soja, farelo de soja, farinha de glúten de milho, proteína texturizada de soja, farelo de canola, grão de ervilha, farelo de amendoim, entre outros (ANFALPET, 2008; FRANÇA et al., 2011).

Os lipídeos desempenham pelo menos três funções em rações para carnívoros e devem ser observadas antes mesmo do início da formulação. Eles fornecem energia, ácidos graxos essenciais e flavor, este último diretamente relacionado ao aroma e paladar do alimento (FRANÇA et al., 2011), os lipídeos animais são mais palatáveis que os vegetais (WILLARD, 2003). Segundo a ABINPET (2008), as fontes de óleo de origem vegetal utilizadas nas rações para cães e gatos são: óleo de abacate, óleo de alecrim, óleo de arroz, óleo de linhaça (bruto ou cru), óleo de palma, óleo de girassol, óleo de soja (bruto ou cru), óleo de soja degomado, óleo de soja refinado e lecitina de soja. Já os de origem animal são óleo de aves, óleo de peixes, gordura bovina e gordura suína.

Já em relação ao amido, estes constituem a maior fonte de energia em rações extrusadas para cães (CHEEKE, 1999), fornecendo de 30% a 60% de sua energia metabolizável (CARCIOFI, 2008), além de serem necessários ao processo de extrusão para moldar o alimento (TARDIN, 2002; KRABBE, 2009).

De acordo com a ABINPET (2008), alguns ingredientes podem ser citados como fontes de carboidratos: fécula de mandioca, milho (grão integral), amido de milho, milho integral extrusado, arroz integral, sorgo, farelo de trigo, farelo de gérmen de milho, sorgo, quirera de arroz, grão integral de cevada, entre outras. O processamento do amido, incluindo sua moagem e cozimento durante o processo de extrusão, é fundamental para aumentar sua digestibilidade para os carnívoros (MURRAY et al., 2001). Independentemente do tipo de ilustração (quadro, desenho, figura, fotografia, mapa, entre outros), sua identificação aparece na parte superior, precedida da palavra designativa.

### **2.1.3 Processamento de alimentos extrusados para cães**

#### *Extrusão*

O processo de cozimento por extrusão tem sido usado em alimentos para cães e gatos há mais de 50 anos. O primeiro alimento extrusado foi desenvolvido pela Ralston Purina Company, em 1954 (CORBIN, 2003). Estes alimentos ganharam importância na alimentação de animais de estimação, pois com a possibilidade de aumentar a digestibilidade de cereais a partir da extrusão foi possível desenvolver

alimentos economicamente viáveis para cães, cerca de 95% dos alimentos comerciais para cães são extrusados (SPEARS; FAHEY, 2004).

Segundo Krabbe e Loiola (2005), a extrusão é considerada um processo de alta temperatura e curto espaço de tempo (high temperature – short time – HTST), com período de residência do alimento no extrusor de 1 a 2 minutos. A extrusão aumenta a digestibilidade das proteínas, amido, energia e elimina fatores antinutricionais, microrganismos e enzimas. A extrusora é um cilindro com barreiras multi-segmentadas e uma rosca no centro que impulsiona a mistura para frente.

É um equipamento de grande produtividade, podendo processar mais de 125 toneladas de alimento por hora. Uma vez na extrusora, os ingredientes são impulsionados por atrito passando por câmaras de retenção permanecendo em média 1 a 2 minutos e sofrem a ação de vapor, temperatura (130-180°C) e pressão (34 a 37 atm) responsáveis pela cocção final da mistura e pela gelatinização do amido. Além desses fatores químicos há a ação física do atrito no tubo de rosca sem fim, que auxilia na homogeneização da mistura, propiciando uma cocção uniforme de toda a massa (CARCIOFI, 2004).

Existem basicamente dois tipos de extrusoras, as de rosca simples (*single screw*) e as de rosca dupla (*twin screw*). Ambas são utilizadas para produção de alimentos para consumo animal e humano. As extrusoras de rosca simples são utilizadas em formulações ricas em carboidratos e pobres em gordura, com alta flexibilidade de expansão, apresentando boa estabilidade de processo. Já, as extrusoras de roscas duplas foram desenvolvidas para alimentos cujas formulações apresentem altos níveis de proteína e gordura; baixos níveis de carboidratos e de difíceis processamentos, apresentando alta estabilidade durante a extrusão (SAAD et al., 2005).

O sistema de extrusão consiste fundamentalmente em um alimentador, pré-condicionador, extrusora e matriz (Figura 1). Cada componente é desenvolvido para desempenhar uma função específica no processo de cozimento e formação do produto (RIAZ, 2003).

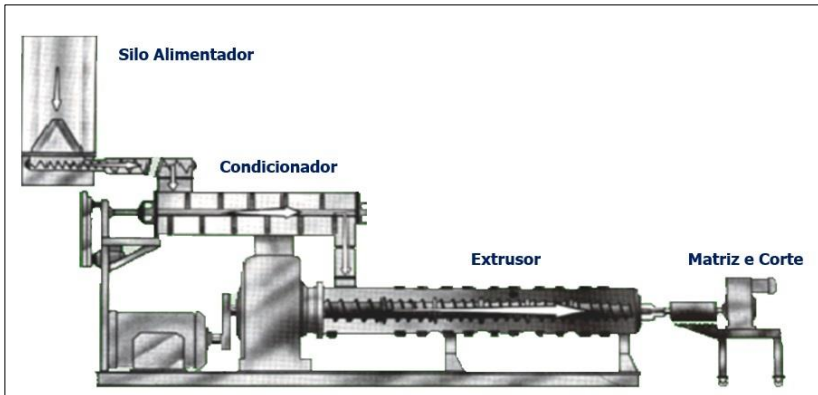


Figura 1. Equipamento usado no processo de extrusão.  
Fonte: Ferraz (2012)

(a)Silo Alimentador:

Proporciona a entrada, em fluxo contínuo e controlado, da mistura seca dos ingredientes para o pré-condicionador e conseqüentemente, para o canhão da extrusora (HAUCK, 1994). Contém 1 ou 2 elementos transportadores e misturadores, que consistem em eixos rotativos com batedores ou pás em linhas ou radiais, fixados nestes eixos (SOUZA, 2010).

(b)Condicionador:

No condicionador são adicionados à mistura de ingredientes vapor e água. Essa mistura é então homogeneizada por um sistema de barras cilíndricas com pás dispostas radialmente, transformando-a em uma massa. O objetivo é aumentar a umidade e temperatura da massa e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade da extrusora e a qualidade do produto final. Ele reduz também o desgaste das roscas da extrusora, feitas de aço inox. A umidade desta massa é mantida geralmente entre 10 a 25% e a temperatura entre 70 a 90° C. Nessa fase do processo, podem ser adicionados carne fresca, óleos ou outros aditivos líquidos (RIAZ, 2003).

De acordo com Rokey et al. (2012), as gorduras normalmente são adicionadas ao fim do processo no condicionador (em alimentos com alto teor de lipídios). Isso acontece porque as gorduras podem encapsular as partículas dos cereais e isso pode comprometer a absorção de umidade e transferência térmica, requeridas para realizar a gelatinização do amido. Alimentos com teor alto de gordura podem permanecer por maior tempo

e intensidade de mistura no condicionador para garantir maior gelatinização.

(c)Extrusora:

Após sair do condicionador, a massa entra na extrusora que consiste em um tubo com um sistema de rosca-sem-fim, denominado canhão da extrusora. Esse sistema de rosca irá comprimir a massa, gerando energia mecânica. O atrito causado pela ação da rosca criará energia térmica, elevando a temperatura da massa e proporcionando o cozimento do amido (CHUANG & YEH, 2004; DING et al., 2004). A escolha da velocidade de rotação e da configuração da rosca irá influenciar a energia mecânica aplicada à massa, para auxiliar o aumento da temperatura é possível realizar injeção de vapor direto na massa (ABECASSIS et al., 1994).

Quando vapor é injetado no canhão extrusor há grande contribuição para o cozimento do alimento, pois, esta energia térmica adicional pode aumentar a capacidade da extrusão e melhorar a qualidade de fórmulas com maior teor de gordura (ROKEY et al., 2012). No final do canhão da extrusora, a pressão pode chegar a 37 atm, a temperatura de 150° C e a umidade de 28% (RIAZ, 2003).

(d)Matriz e corte:

Por fim, o processo de extrusão apresenta o sistema de matriz e corte (Figura 2). A matriz possui duas funções: restringir a saída da mistura para criar a pressão necessária para a aplicação da energia mecânica e alterar o formato final do extrusado através do formato do orifício da matriz e da velocidade de corte das facas (COWELL et al., 2000). É nesse processo que são criados os formatos variados dos extrusados.

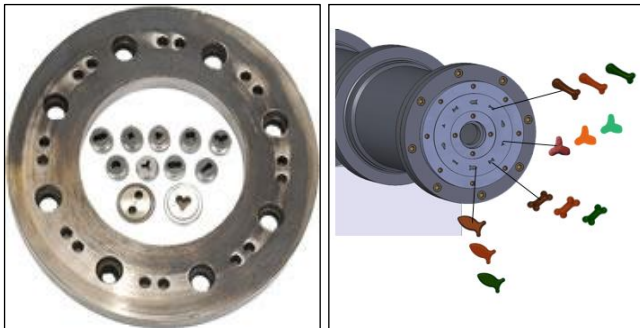


Figura 2. Matriz contendo orifícios para vários formatos de extrusados.  
Fonte: Ferraz (2012)

### *Secagem*

Por definição, secagem é a operação que tem por finalidade reduzir o teor de umidade do produto a nível adequado à sua estocagem por um período prolongado. É um processo térmico que dá novas características funcionais, nutricionais e estruturais a produtos (KRABBE, 2007).

Produtos secos devem possuir umidade final menor ou igual a 10%, a fim de evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis, como fungos e leveduras. Para que o crescimento fúngico seja inibido, a atividade de água (aw) do alimento extrusado precisa ser menor que 0,6 (ROKEY et al., 2010; LIMA, 2015). Este parâmetro pode ser controlado com a secagem do produto.

Logo que o alimento é extrusado a umidade está em torno de 23 a 28%. Entretanto, parte desta umidade é perdida antes do alimento chegar ao secador. Durante a expansão do produto uma parcela é perdida como energia evaporativa. Outra parcela de umidade é perdida durante o transporte pneumático até o secador. Esta perda pode corresponder a, aproximadamente, 2 a 3% da umidade total do produto (ROKEY et al., 2010).

A secagem mecânica pode apresentar várias vantagens, entre elas estão maior velocidade do processo e redução no tempo em que o produto permanece úmido impedindo o desenvolvimento de microrganismos. No entanto, a secagem excessiva pode resultar em perdas de ingredientes como antioxidantes, antifúngicos e outros alimentos termolábeis, além de reduzir a palatabilidade do alimento (KRABBE, 2007; BRITO et al., 2010).

### *Recobrimento*

A maioria dos produtos extrusados para cães faz a aplicação de óleos, gorduras e aromas líquidos após o processo de secagem. Essa sequência faz com que o banho de óleo seja realizado no produto ainda quente, melhorando sua absorção.

O óleo que será colocado no produto fica armazenado em tanques para o sistema de aplicação. Dois tipos de injetores podem ser utilizados para realizar o banho de óleo. Para aplicação de até 5%, pode ser utilizado um injetor tipo nebulizador. Para aplicação de 6% ou mais, deve-se utilizar injetor tipo inundador. Em outro sistema de aplicação de coberturas o alimento extrusado seco flui através de uma cortina de líquidos, gerada por um disco rotativo (ROKEY et al., 2012).

Além da aplicação de óleo realizada durante o banho de óleo, a mesma pode ser realizada em parte no condicionador. A extrusão pode promover complexações lipoproteicas e diminuir os teores de extrato etéreo em hidrólise ácida. Quando o óleo é adicionado na massa esta complexação pode ser ainda maior, o que reduziria a deterioração da ração por oxidação (SOUSA et al., 2012; LIMA, 2015).

Alimentos para animais de estimação recebem ainda o banho de palatabilizante imediatamente após o resfriamento, também por aspersores. Este banho é realizado após o resfriamento para que o mesmo fique na parte mais externa do produto. Assim, o alimento fica mais atrativo para o cão (FELIX et al., 2010).

### *Resfriamento*

Após a secagem, o produto está com a temperatura elevada e precisa ser resfriado a uma temperatura próxima a temperatura ambiente, o que geralmente ocorre após o banho de óleo.

De acordo com Rokey et al. (2012) deve-se utilizar um resfriador, se ocorrer o resfriamento naturalmente dentro da embalagem haverá condensação da umidade residual do produto e esta umidade permanecerá na embalagem e poderá fazer com que haja crescimento microbiano e desenvolvimento fúngico. Para alimentos completos em que a aplicação de óleo supera 8%, o produto deve ser seco, revestido pelo óleo e depois passar pelo resfriador. Neste caso, o tipo de resfriador mais indicado é o de contra fluxo vertical, pois este evitará o acúmulo de gorduras nas esteiras transportadoras.

### *Ensaque*

Alimentos completos destinados a cães podem ficar armazenados por um longo período de tempo, e por essa razão tanto o local de

armazenamento quanto o material em que o alimento será embalado devem ter atenção especial por parte dos fabricantes, revendedores e proprietários dos animais de estimação. As embalagens destinadas a alimentos extrusados para cães devem apresentar barreira contra a luz, gordura, umidade e gases, tudo isso para garantir as propriedades nutricionais e manter o alimento protegido de microrganismos (LIMA, 2015).

O formato e os materiais de embalagem devem fornecer adequada proteção aos produtos, a fim de minimizar a contaminação, prevenir danos e permitir rotulagem apropriada (CODEX ALIMENTARIUS, 2003). A Figura 3 mostra o processo de produção de alimentos extrusados para cães.

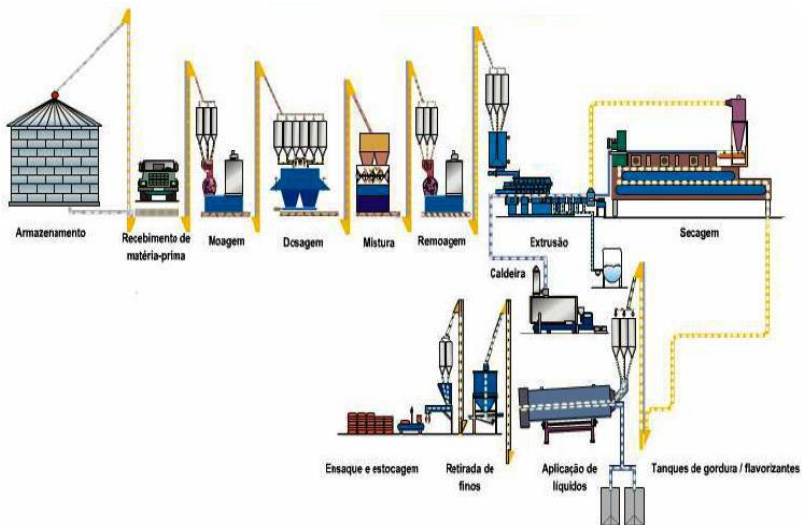


Figura 3. Processo de produção de alimentos extrusados para cães  
Fonte: Adaptado de Ferraz (2012)

#### 2.1.4 Qualidade e segurança dos ingredientes e produto final

A qualidade e segurança são objetivos em todos os ramos da indústria. Se, por um lado, estes fatores são responsáveis pela busca do aperfeiçoamento contínuo, por outro, asseguram a sobrevivência na competitividade entre os mercados. A qualidade de um produto, definida como sua adequação ao uso ao qual se destina, pode ser garantida por muitas medidas, as quais se resumem na aplicação de tecnologias seguras



a matérias-primas de boa qualidade (BERTOLINO, 2010; SILVA et al., 2010).

A qualidade das matérias-primas utilizadas para a fabricação de alimentos destinados a animais de estimação é tão importante quanto à eficiência de ingredientes e/ou nutrientes relacionados à saúde animal (CARCIOFI, 2008). Segundo Stawick (2003) os ingredientes são testados antes de serem utilizados na fabricação dos produtos para garantir a ausência de adulterantes ou problemas de qualidade que possam afetar a integridade do produto final. O produto final também é testado para determinar a segurança e ou o nível de qualidade.

A utilização de ferramentas como Boas Práticas de Fabricação (BPF) na produção de alimentos para animais de estimação garantem produtos finais como qualidade e segurança alimentar (BRASIL, 2007). Com a diversidade de composição dos alimentos para cães, as matérias-primas utilizadas bem como o produto final podem carrear vários tipos de contaminantes como microrganismos (bactérias e fungos), contaminantes sintéticos (pesticidas e metais pesados) e orgânicos (toxinas bacterianas e fúngicas) (DE SOUZA KOERICH et al., 2010).

Apesar da maioria desses alimentos passarem pelo processo de extrusão, onde a alta temperatura (100-120°C) é suficiente para a esterilização em relação a contaminação fúngica e bacteriana, a maioria dos problemas dos alimentos destinados aos animais está relacionada com a presença de fungos e de outros microrganismos que deterioram os alimentos, quando processados ou estocados inadequadamente (ALVES, 2003).

Deve haver cuidados no manejo desses alimentos nos estabelecimentos comerciais (agropecuárias e pet shops), assim também por parte dos proprietários dos animais, onde após abrirem as embalagens das rações, verifiquem o correto armazenamento, pois podem existir interações entre o ambiente e a ração quando esta não tem proteção adequada. Essa interação pode acarretar contaminação por esporos fúngicos, ácaros e sujidades leves (insetos, pelos de roedores e outros animais).

## 2.2 CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM ALIMENTOS PARA CÃES

A prática adotada para a qualidade higiênica dos alimentos é a determinação de organismos indicadores (SANTOS et al., 2000). De acordo com Andrade e Nascimento (2005) há um forte risco para a saúde desses animais no que se refere à contaminação por fungos e outros

microrganismos no alimento. A contaminação por agentes biológicos pode ocorrer desde a produção de grãos, a incorreta armazenagem da matéria-prima, processamento da ração, embalagem e armazenamento do produto final (DE SOUZA KOERICH, 2013).

### **2.2.1 Fungos**

A contaminação por fungos pode causar inúmeras perdas econômicas associadas à redução de nutrientes, da palatabilidade e a presença de micotoxinas, afetando tanto a saúde humana como a animal (SCUSSEL, 2002). Os fungos podem ter origem no campo (*Fusarium*) ou durante a armazenagem (*Aspergillus* e *Penicillium*). Os fungos de campo surgem na cultura durante os estágios finais de maturação, necessitam de umidade mais elevada para se proliferarem. Já os fungos de armazenagem, são menos exigentes quanto à umidade e surgem na pós-colheita (LORINI, 1998; SCUSSEL, 2000).

Esses fungos podem ser classificados como deteriorantes, ou seja, que provocam mudanças de coloração, redução do poder germinativo, alterações no odor e paladar dos grãos, depreciando sua qualidade, e fungos toxigênicos, ou seja, aqueles que são capazes de produzir micotoxinas (LAZZARI, 1997). Os fungos que produzem micotoxinas de importância veterinária incluem uma variedade de substratos, entre grãos e seus subprodutos, principalmente milho, trigo, soja e arroz, ingredientes geralmente utilizados na fabricação de rações para cães e gatos (SANTIN & BONA, 2009).

Segundo Brito et al. (2010) quantificar e qualificar o crescimento de fungos filamentosos é muito difícil quando se compara com a aplicação da técnica para bactérias e leveduras. Essas dificuldades residem, principalmente, nas características morfológicas desses microrganismos, pois suas hifas não se destacam facilmente do substrato, além de serem formadas por vários segmentos que podem transformar-se em colônias isoladas. Propágulos fúngicos constituem um indicador da condição higiênica sanitária dos alimentos comerciais para animais de estimação, não sendo recomendadas contagens acima de  $1 \times 10^4$  UFC/g (ABINPET, 2008).

### **2.2.2 Insetos, ácaros e pelos de roedores**

Alimentos industrializados para cães são constituídos por ingredientes à base de grãos, óleos de sementes e subprodutos de origem animal, que servem como principais fontes de carboidratos, gorduras e

proteínas. Estes produtos, pela sua composição, são atrativos aos insetos-praga que os infestam, causando perdas quantitativas e qualitativas significantes (FARONI, 2002; MACHADO et al., 2008).

A presença de insetos e ácaros nos alimentos para animais de estimação é considerada um indicativo de descuido com o controle higiênico-sanitário durante a colheita e armazenamento da matéria prima, bem como no processamento, incluindo, a eficiência no acondicionamento do produto final e sua comercialização (DE SOUZA KOERICH, 2013). As condições de armazenamento, tanto da matéria prima quanto do produto final, favorecem diretamente no aparecimento das sujidades leves, estando relacionadas com o grau de limpeza dos depósitos, umidade relativa e temperatura ideal para seu desenvolvimento (LORINI, 2002).

A exposição da ração ao ambiente é um fator importante que pode comprometer a qualidade do produto, pois proporciona o contato do alimento com insetos e ácaros (HINTON; MEAD, 1992). Os insetos podem atuar como vetores mecânicos de fungos e seu controle é medida importante na segurança e qualidade de grãos armazenados e alimentos destinados ao consumo animal (Figura 4) (PHILLIPS et al., 1993; AQUINO; POTENZA, 2013). Grãos sadios, material quebrado e infectado por fungos são substratos para desenvolvimento e multiplicação dos insetos (LORINI, 2002).

Dentre as 6.000 espécies conhecidas de ácaros, menos de 30 delas são conhecidas como pragas de grãos armazenados. Os alimentos secos para animais de estimação por conter um teor de umidade intermediário, favorece o crescimento de fungos, fonte de alimento para os ácaros de armazenamento (BRAZIS, 2011). Os ácaros aparecem quando as condições de estocagem não estão reguladas ou quando os subprodutos dos grãos não foram cuidadosamente manuseados. Sob condições normais de armazenagem, os grãos e subprodutos são pouco afetados pelos ácaros. O valor nutritivo da ração diminui com o aumento da infestação por ácaros, podendo até causar doenças em animais alimentados com produtos infestados (FARONI, 2002).

Outra sujidade de grande importância é a presença de pelos de roedores nos alimentos, este é um indicativo do contato desse animal em alguma etapa de obtenção e/ou produção da ração. Os roedores constituem sério problema em todas as fases de processamento, produção e armazenamento de gêneros alimentícios. Além da perda de alimento devido ao consumo por estes animais, normalmente ocorre à contaminação pela presença de seus pelos, fezes e/ou urina. Os roedores podem ser transmissores de doenças virais, fúngicas e bacterianas, sendo

a leptospirose a mais conhecida (FERREIRA, 2011; DE SOUZA KOERICH, 2013).



Figura 4. Inseto em alimento extrusado para cães do tipo Super-Premium.

### 2.2.3 Contaminantes orgânicos: micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos pelos fungos com potencial de toxicoses ao homem e aos animais. Quando ocorre a ingestão de micotoxinas por meio da alimentação contínua, os impactos causados por elas abrangem queda na produtividade animal, favorecendo a uma debilidade imunológica, apresentando propriedades alergênicas, teratogênicas, carcinogênicas e mutagênicas (COULOMBE, 1993; SCUSSEL, 2002; PITT, 2000). Os fungos toxigênicos, que produzem micotoxinas, estão presentes em grãos e seus subprodutos, principalmente milho, trigo, soja e arroz, amplamente utilizados na formulação de alimentos para cães e gatos (CAST, 2003; SIMAO; SCUSSEL, 2008).

A presença de fungos nos alimentos não significa necessariamente a presença de micotoxinas (PEREIRA et al., 2002). Entretanto, quando essas apresentam elevadas contagens fúngicas são consideradas como indicativo da presença de micotoxinas no alimento (FAO, 2004). Esses metabólitos secundários não possuem função fisiológica conhecida para o próprio fungo, mas têm importância para suas relações com o ambiente como, por exemplo, defesa do fungo frente à competição com outros microrganismos em resposta ao estresse sofrido pela planta (CAST, 2003).

Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Stachybotrys*, dentre eles destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que são considerados os de maior importância para alimentos e ração, por serem os mais encontrados e os maiores produtores de micotoxinas (HUSSEIN, BRASEL, 2001; PATERSON et. al., 2004; ROSA et al., 2006).

A maioria das micotoxinas são termoestáveis, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação (JOUANY, 2007). Ressalta-se com essa informação a importância da qualidade das matérias-primas, pois o processo de extrusão não é capaz de destruir esses compostos químicos. Além disso, devemos considerar que o contato com o alimento industrializado pelo cão é diário, sem variação da dieta, comprometendo a saúde em longo prazo.

As diferentes micotoxinas apresentam diferentes “órgãos-alvo”, como fígado, aparelho digestório, rins, aparelho reprodutor e sistema nervoso central, além de exercerem efeitos sobre a imunidade e coagulação sanguínea (SANTIN; BONA, 2009). As micotoxicoses já relatadas em cães envolvem as aflatoxinas, deoxinivalenol, ocratoxina, citrinina e zearalenona (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2012; RUMBEIHA, 2000). Os sinais clínicos variam muito e incluem vômito, depressão, polidipsia, poliúria, anorexia, icterícia e redução do crescimento (PATTERSON, 1977; ATUNGULU et al., 2018).

### *Aflatoxinas*

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas (AFLs) são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais, pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência. Embora 17 compostos, todos designados AFLs, tenham sido isolados, é um termo coletivo usado para designar um grupo de micotoxinas, as principais são: aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (MAIA; SIQUEIRA, 2007).

De acordo com Moss (1998) as AFLs são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* ssp., sendo os principais fungos produtores o *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Nos animais de estimação (cães, gatos, aves, peixes), o fígado é o principal órgão alvo. As AFLs também são imunossupressoras, nefrotóxicas, carcinogênicas e possuem efeito anticoagulante. Cães são extremamente sensíveis aos seus efeitos, sendo os animais jovens os mais afetados (MUZOLON, 2008; PATTERSON, 1977).

As rações que contêm concentrações acima de 60 µg/kg de AFB<sub>1</sub> já causaram súbito início de aflatoxicose em animais de estimação (BASTIANELLO et al., 1987). Em relação a efeito em longo prazo, as AFLs podem causar câncer. Entre as AFLs a AFB<sub>1</sub> é considerada a mais tóxica e com maior poder carcinogênico, além de ser a mais frequente em alimentos para animais (RUMBEIHA, 2000).

A evolução de métodos analíticos, de controle e de proteção dos grãos contra AFLs reduziu bastante a incidência da aflatoxicose em pequenos animais. Nos anos 90 um único episódio de aflatoxicose foi documentado nos Estados Unidos, situação em que vários cães consumiram uma ração contendo de 100 a 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$  por 3-4 meses (MUZOLON, 2008; DEVEGOWDA & CASTALDO, 2000). Hoje 100 países possuem legislação para a presença de AFLs em alimentos e rações para animais de produção, inclusive o Brasil, no entanto para animais de estimação são poucas as legislações (FAO, 2006).

### *Deoxinivalenol*

O deoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina, é uma toxina do tipo B dos tricotecenos produzidas por *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. avenaceum*, entre outras espécies (SCUSSEL, 2002). Esta toxina é resistente ao processo de moagem e aquecimento e, por isso, entra na cadeia alimentar de animais e humanos diretamente. É uma das micotoxinas consideradas mais importantes dos cereais (MOSS, 2002). Foi inicialmente detectada em 1972 no milho que causou vômito e recusa da alimentação em suínos. Posteriormente, informações importantes sobre a intoxicação em pequenos animais também foram publicadas (HUGHES et al. 1999).

Os sinais clínicos de toxicidade aguda de DON em animais de estimação incluem anorexia, regurgitação, vômito, irritação cutânea, diarreia, hemorragias, aborto (mamíferos) e até a morte (RUMBEIHA, 2000; MUZOLON, 2008). Hughes et al. (1999) demonstraram que o processo de extrusão não destrói o DON. Consequentemente a utilização de milho contaminado por DON resultará em sua presença na ração. Os pesquisadores expuseram cães a uma ração comercial contendo DON variando de 0 a 10 mg/kg. O achado mais significativo foi a recusa da alimentação pelos cães que receberam ração com mais de 4,5 mg/kg de DON.

### *Fumonisinias*

As fumonisinas (FBs) são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente por *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, além de *Alternaria alternata*. Das FBs identificadas, as  $\text{FB}_1$ ,  $\text{FB}_2$  e  $\text{FB}_3$  são as mais isoladas em alimentos naturalmente contaminados, sendo que a  $\text{FB}_1$  é quase sempre a mais abundante, representando cerca

de 70% da concentração total das FBs detectadas (SYDENHAM et al., 1991; MALLMANN et al., 2001).

As FBs são responsáveis pela leucoencefalomácia em equinos e coelhos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos, efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e apoptose no fígado de ratos (POZZI et al., 2001). Seu potencial para causar intoxicação é considerável, pois são micotoxinas geralmente encontradas no milho que fazem, na maioria das vezes, parte da formulação de rações para animais de estimação. Dados epidemiológicos também correlacionaram a ingestão de milho contaminado com *F. verticillioides* à neoplasia de esôfago em seres humanos, além de FBs serem hepatocarcinogênicas em ratos e camundongos. Frangos e perus também são sensíveis e apresentam redução no ganho de peso, diarreia e hepatotoxicidade (SMITH, 2007).

### *Ocratoxina A*

A ocratoxina A (OTA) corresponde a um metabólito de espécies de *Aspergillus e Penicillium*, principalmente por *A. ochraceus* e *P. verrucosum*, fungos capazes de crescer em climas e plantas diferentes (CHU, 2002). Sua contaminação pode ocorrer em todo o mundo em diversas culturas de alimentos, inclusive cereais, produtos que representam a fonte dietética mais importante desta micotoxina (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

As espécies de fungos responsáveis pela OTA são de armazenamento, mas podem também crescer no campo. Consequentemente, esses fungos têm potencial de produzir OTA em casa, após a compra da ração, se ela não for armazenada adequadamente (RUMBEIHA, 2000; MUZOLON, 2008). De acordo com Razzazi-Fazeli et al. (2001) há uma alta frequência na presença de OTA nos alimentos para cães e gatos.

Esta micotoxina demonstra efeitos principalmente nefrotóxicos mas também há efeitos teratogênicos, embriotóxicos, genotóxicos, neurotóxicos, imunossupressivos e carcinogênicos, sendo classificada como pertencente ao grupo 2B da *International Agency for Research on Cancer - IARC* (BOERMANS; LEUNG, 2007; IARC, 1993). Assim como em outras espécies, o rim é o primeiro órgão alvo da ocratoxicose em cães. Um estudo realizado por Szczech et al. (1973;1974) sobre a ocratoxicose em cães da raça Beagle, revelaram a alta sensibilidade dos cães à esta toxina. Os sinais observados foram perda de apetite, vômito, hipertermia, tonsilite, diarreia sanguinolenta, polidipsia, poliúria,

desidratação, paralisia e morte. Com a dose oral de 0,2 a 0,3 mg/kg, o óbito ocorreu dentro de 10 a 14 dias de intoxicação.

### *Zearalenona*

A zearalenona (ZON) é altamente termoestável, produzida por cepas de várias espécies do gênero *Fusarium*, incluindo *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, e *F. moniliforme*. Está associada principalmente com culturas de cereais e seus subprodutos. Ainda que esta seja considerada uma micotoxina de campo, há evidências de que esta micotoxina também possa ser produzida em grãos já colhidos (ALLDRICK; HAJŠELOVA, 2004).

ZON tem uma baixa toxicidade aguda oral, 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 embrioletal e redução da ninhada em animais, para humanos são poucos os dados disponíveis. A IARC concluiu que havia evidência limitada para avaliar a capacidade carcinogênica de ZON (IARC, 1993).

A exposição alimentar por 7 dias a 200µg/kg de peso corporal /dia de ZON foi suficiente para produzir mudanças patológicas no sistema reprodutivo de cães (GAJECKA et al., 20004). Em outro estudo, Golinsk e Novak (2004) observaram em cães a redução na fertilidade, alterações dos níveis séricos de progesterona e estradiol e redução do tamanho da ninhada.

A maioria dos estudos correlaciona os efeitos desta micotoxina sobre órgãos reprodutores periféricos, porém é importante destacar que estrógenos e fitoestrógenos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica em ratos, alterando o gene de expressão neural (TURCOTTE; HUNT; BLAUSTEIN, 2005).

## 2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES

A conservação dos alimentos pode ser prejudicada durante seu armazenamento inadequado sofrendo ação de fungos, umidade, calor, ar, infestação por insetos ou roedores. Por se tratar de um produto perecível, ficam sujeitos às variações de temperatura e umidade que se tornam prejudiciais a alimentação animal (SANTOS et al., 2002). Outros fatores são inerentes ao processo de fabricação desse produto como parâmetros



adequados de atividade de água (aw), teor de umidade e qualidade dos ingredientes.

## **Fatores externos**

### (a) Matérias-primas

Entende-se que a armazenagem dos ingredientes requer cuidados adequados para preservar a integridade do material, pois podem sofrer alterações em suas características durante o período de armazenamento. Quando em condições inadequadas fica vulnerável ao ambiente em que se encontra gerando riscos de perdas do produto (SANTOS et al., 2013).

A matéria-prima está sujeita às transformações, deteriorações e perdas devido a interações entre fenômenos físicos, químicos e biológicos quando armazenadas de forma incorreta. Exercem grande influência nesse ambiente os fatores temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio, microrganismos, insetos, roedores e pássaros. Nesse aspecto, cuidados especiais devem ser tomados nesse período (LORINI, 1998; SANTOS et al., 2011).

### (b) Produto final

A armazenagem do produto final requer cuidados para preservar de maneira correta as características nutricionais e a seguridade do alimento. Esses cuidados devem ser tomados não só por proprietários de cães como também pelos estabelecimentos comerciais (agropecuárias e pet shops). A maior ocorrência de problemas por inadequado armazenamento nestes alimentos relaciona-se com a presença de fungos e insetos, que além de deteriorar o alimento trazem graves consequências a saúde dos animais de estimação (PADOVEZ, 2014).

Os fabricantes desses alimentos devem fornecer instruções na embalagem aos que forem manusear o produto como informações sobre o modo de conservação adequado do alimento a fim de manter as propriedades nutricionais e prevenir a contaminação por microrganismos e pragas. Essas informações devem estar de acordo com o artigo 39 do anexo I do Decreto 6296/2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sobre o armazenamento e o transporte de produtos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2007).

As condições de armazenamento estão relacionadas ao grau de limpeza onde estão armazenadas, umidade relativa do ar (U.R) e a temperatura do ambiente (LORINI, 1998). A UR é relacionada com o

equilíbrio entre o alimento e o ambiente. Os grãos e produtos finais que possuem  $a_w$  e teor de umidade relativamente baixo quando expostos a uma alta UR tendem a absorver umidade (higroscópicos), favorecendo o crescimento de microrganismos (SCUSSEL, 2002).

De acordo com Northolt et al (1979), o crescimento fúngico ocorre numa faixa mais ampla de  $a_w$  (1,0 a 0,80), em comparação com a produção de micotoxinas (1,0 a 0,95). A temperatura tem notável influência sobre a  $a_w$ . Quando a temperatura é ótima, a  $a_w$  requerida para o crescimento pode ser baixa e, deve ser ótima nos extremos mínimos e máximos de temperatura (BULLERMAN et al., 1984).

Com relação à produção de micotoxinas, essas são formadas quando certas condições ambientais (UR e temperatura), além das características bioquímicas dos produtos que servem como substrato, são propícias para a sua produção (DE SOUZA KOERICH, 2013). Para produção de AFLs, por exemplo, a temperatura e UR ideal são acima de 27°C e 85%, respectivamente. O gênero *Fusarium* produz micotoxinas em temperaturas entre 20 a 26°C (ORSI et al., 2000).

O tipo de substrato é outro fator determinante na produção de micotoxinas, afetando tanto a qualidade como o tipo de metabólito tóxico produzido. A variabilidade na produção de toxinas em diferentes alimentos pode atribuir-se às características físicas e químicas do substrato. Os parâmetros físicos incluem disponibilidade de água, a qual determina a disponibilidade de oxigênio e de ar residual no produto, e a condutividade térmica, que influi sobre a temperatura nos grãos. Entre as características químicas, destacam-se os conteúdos de proteínas, gorduras, aminoácidos e minerais (BRITO et al., 2010).

## **Fatores internos**

### **(a) Umidade**

A melhor medida da concentração de água refere-se à medição de sua atividade ( $a_w$ ), ou seja, medição do teor de água livre no produto. Pode apresentar-se intimamente ligada às moléculas constituintes do produto, não podendo ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação, onde o metabolismo dos microrganismos é paralisado, não havendo desenvolvimento ou reprodução; ou pode encontrar-se livre, estando disponível para as reações físicas (evaporação), químicas (escurecimento) e microbiológicas, tornando-se a principal responsável pela deterioração do produto (SCOTT, 1957; BRITO et al., 2010).

A água define os procedimentos a serem adotados para a fabricação de extrusados, atuando como palatilizantes e melhorando a textura do alimento. No entanto, a aw é a principal responsável pela deterioração do produto, pois favorece o crescimento microbiológico (BONE; SHANNON, 1977). Dos microrganismos capazes de colonizar os grãos e produto final, os fungos são mais tolerantes a baixa aw (NORTHOLT et al., 1979). Alimentos que apresentam aw menor que 0,60 apresentam boa preservação, já que microrganismos dificilmente se propagam nestas condições (UBOLDI EIROA, 1981).

Análises de aw são muito importantes durante o processo de produção de uma ração extrusada, por meio destas análises pode-se controlar a reprodução microbiana, reações enzimáticas, oxidativas e hidrolíticas do alimento. Assim, é possível garantir maior qualidade, preservação e tempo de prateleira do produto comercializado (BRITO, 2009).

O controle de umidade nos alimentos processados deve ser mantido para prevenir a ação de microrganismo e evitar possíveis perdas de nutrientes. Durante o processamento dos extrusados a etapa de secagem é uma operação crítica, pois, não determina somente a qualidade da dieta, mas afeta o custo de produção. A umidade do extrusado está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar as características da dieta, portanto, a determinação é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos (MURAKAMI, 2010).

A umidade no alimento tem relação direta com a presença de microrganismos como fungos e bactérias, podendo ocorrer o desenvolvimento de micotoxinas. Quanto maior o teor de umidade, maior o aparecimento de fungos (SCUSSEL, 2002). Após o processo de extrusão do alimento animal, há redução da umidade de 25 % (antes da secagem) para teor de umidade final de 8 a 10 % no produto acabado. Neste nível de umidade, o crescimento de microrganismos é dificultado, porém fungos xerofílicos podem se desenvolver (CRANE et al., 2000; DE SOUZA KOERICH, 2013).

#### (b) Composição da matéria-prima

Muitas contaminações ocorrem mais em alimentos completos para animais de estimação quando comparados com as matérias primas utilizadas em sua elaboração, provavelmente em decorrência da composição química completa do substrato (SCUDAMORE et al., 1997).

As proteínas, gorduras e carboidratos são substratos ideais para o crescimento fúngico e bacteriano.

### (c) Oxidação lipídica

Os lipídeos desempenham pelo menos três funções em rações para carnívoros e devem ser observadas antes mesmo do início da formulação. Em muitas espécies, incluindo cães, o consumo de energia (níveis de energia da dieta) é o primeiro regulador do consumo de alimento (FRANÇA et al., 2011; ZORAN, 2002). São compostos por triglicerídeos, contendo uma mistura de ácidos saturados e insaturados de origem animal e vegetal, respectivamente. Os triglicerídeos de origem animal são conhecidos pela sua alta proporção de ácidos graxos saturados em comparação com os de origem vegetal (HUSSEIN, 2003).

A oxidação ocorre em alimentos com altos níveis de gordura, seja no ingrediente, como nas farinhas de carne, como no produto acabado. Ela ocorre quando há um armazenamento do produto por um longo período de tempo ou quando armazenados incorretamente. Esta oxidação pode tornar-se mais crítica quando há existência de peróxidos no alimento, pois leva a formação de mais radicais livres, acetonas, aldeídos e alcoóis. Isto pode tornar o alimento inadequado para animais que o consomem (LIMA, 2015).

A oxidação envolve a adição de um átomo de oxigênio ou a remoção de um átomo de hidrogênio das moléculas que constituem os alimentos. Os produtos desta reação, os peróxidos, também chamados radicais livres, são extremamente reativos, produzindo compostos responsáveis pelo mau odor e pela rancificação do alimento. Os compostos oxidados dos alimentos podem causar diversas doenças no organismo, tais como distúrbios cardiovasculares, tumores e envelhecimento acelerado (BORGES, SALGARELLO, GURIAN, 2003). A oxidação ocorre principalmente quando a ração é armazenada em locais com presença de luz, umidade, altas temperaturas e presença de oxigênio.

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras é uma determinação importante para a indústria *petfood*. É uma forma de controlar e garantir a qualidade das matérias-primas adquiridas, e controlar a qualidade dos produtos comercializados (OSAWA; GONÇALVES; RAGAZZI, 2008). Devido à preocupação em proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade, a indústria de alimentos para animais de estimação levou adoção de medidas que permitem limitar o fenômeno de oxidação durante as fases de processamento e armazenamento desses alimentos, a adição de

antioxidantes é a mais utilizada devido ao baixo custo, termo-resistência e ausência de toxicidade (BERSET; CUVELIER, 1996).

#### (d) Integridade da embalagem

Segundo Radtke (2011), a embalagem para o segmento de *petfood* passa a ser tão importante quanto o produto em si, garantindo barreiras eficazes contra a umidade, o odor, luz, oxigênio e gordura (Tabela 3).

O formato da embalagem e os materiais devem proporcionar uma proteção adequada ao produto, a fim de minimizar a contaminação e evitar danos. O que pode acontecer é a perfuração destes pacotes para uma melhor acomodação destes quando empilhados, por quem transporta ou no estabelecimento (pet shops e mercados).

Tabela 3. Funções das embalagens em alimentos para cães em relação a diferentes barreiras

Barreira	Desempenho
Umidade	Mantém crocância e maciez; Evita proliferação de ácaros.
Odor	Evita a atração de insetos e roedores em gôndolas de supermercado, pet shop e na casa do consumidor
Luz	Evita a degradação dos nutrientes (proteína, vitaminas e gorduras).
Oxigênio	Evita a oxidação das gorduras contidas nos alimentos; Aumenta o tempo de prateleira do produto.
Gordura	Evita a perda da palatabilidade dos alimentos.

## 2.4 LEGISLAÇÃO PARA CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM ALIMENTOS PARA CÃES

A legislação para contaminantes biológicos em alimentos para animais em todo o mundo por muito tempo se concentrou principalmente em animais de produção, com menos atenção às espécies de companhia. No entanto, o fortalecimento do vínculo humano-animal tem impulsionado a preocupação com o bem-estar desses animais, assim a qualidade e segurança dos alimentos destinados a eles fizeram com que trabalhos referentes à contaminação biológica em alimentos para animais de estimação tenham sido desenvolvidos.

#### (a) Fungos

De acordo com a Good Manufacture Practice (2005) tem sido demonstrado que os propágulos fúngicos constituem um indicador da condição higiênica sanitária das rações, sendo que as contagens não

devem exceder os valores de  $1 \times 10^4$  UFC/g. A legislação brasileira atual seja por parte da área da Agricultura ou da Saúde, não enquadram a contaminação fúngica em nenhum limite máximo tolerado, e consideram os fungos como simples agentes de deterioração (ABINPET, 2008; BRITO et al., 2010). No entanto, a presença destes fungos, especialmente fungos toxigênicos, pode ser um indicativo da contaminação por micotoxinas nos alimentos.

Apesar disso, muitos estudos têm sido realizados para identificar espécies de fungos presentes em alimentos para cães e gatos (BARBOSA et al., 2014; COPETTI, 2005; CURTIS et al., 2011; SCUDAMORE et al., 1997). Copetti (2005) isolou *Aspergillus* em 55,6 % dos alimentos comerciais para cães e gatos, seguido do *Eurotium* spp. (51,8 %), *Penicillium* spp. (44,4 %) e *Fusarium* spp. (33 %). Já Curtis et al. (2011) pesquisando fungos em amostras de rações para cães e gatos, detectaram a presença fúngica em 36 amostras de 50 analisadas (72%). Em estudo conduzido por Barbosa et al. (2014), em rações comercializadas para gatos, permitiram a classificação de 2 gêneros, *Aspergillus* e *Penicillium*. Em oito amostras de ração não se detectou presença fúngica. As amostras positivas apresentaram níveis de contaminação com contagem até  $2 \times 10^3$  UFC/g.

#### (b) Micotoxinas

Para micotoxinas, ingredientes e rações, o MAPA aprovou a Portaria n. 7 (MA/SNAD/SFA) de 09/11/88 (BRASIL, 1988) que define como limite máximo permitido de AFLs em  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ , para o somatório de AFLs ( $\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$ ). Não há regulamentação para limites máximos para micotoxinas em alimentos para animais de estimação, no entanto, o controle de qualidade das empresas pode ultrapassar o requisito mínimo regulamentar para garantir a segurança e eficácia de produtos para esses animais (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2012).

Na tabela 4, estão os limites máximos toleráveis de micotoxinas permitidas para animais de estimação, segundo o Manual do programa Integrado de Qualidade Pet (ANFALPET, 2008), assim como seus respectivos fungos produtores e ingredientes que se encontram.

Tabela 4. Fungos toxigênicos, ingredientes e limites máximos de micotoxinas em alimentos para animais de estimação.

Micotoxinas	Fungo	Ingrediente	Límite Máximo (µg/kg)
Aflatoxina (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	<i>A. flavus</i>	Amendoim	20
	<i>A. parasiticus</i>	Milho	
	<i>A. nomius</i>	Cereais	
Deoxinivalenol	<i>F. graminearum</i>	Trigo	1000
	<i>F. culmorum</i>	Cevada	
	<i>F. avenaceum</i>	Milho	
Fumonisinás (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> )	<i>F. verticillioides</i>	Milho	5000
	<i>F. proliferatum</i>		
	<i>F. nygamai</i>		
Ocratoxina A	<i>A. ochraceus</i>	Cevada	50
	<i>P. verrucosum</i>	Milho	
		Aveia Trigo	
Zearalenona	<i>F. culmorum</i>	Cereais	200
	<i>F. equiseti</i>		
	<i>F. graminearum</i>		
	<i>F. moniliforme</i>		

Adaptado de ANFALPET (2008), Scussel (2002)

### (c) Insetos, ácaros e pelos de roedores

Não há legislação específica para o cumprimento dos parâmetros microscópicos e presença de sujidades biológicas leves em alimentos destinados a animais de estimação. As sujidades biológicas leves identificadas em alimentos para cães como fragmentos de insetos, ácaros e pelos de roedores, são consideradas prejudiciais à saúde pelo fato de serem considerados importantes vetores mecânicos de contaminantes alimentares (fungos, vírus, bactérias) (DE SOUZA KOERICH, 2013).

Aliado a isso, a comercialização a granel desse alimento e a falta de cuidado por parte de comerciantes e de proprietários no armazenamento, propiciam ainda mais a contaminação por esses vetores, que podem estar presentes no ambiente. Para que essas contaminações sejam evitadas o MAPA estabeleceu conforme a Instrução Normativa nº 4, de 23/02/2007 (BRASIL, 2007b), as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal.

## 2.5 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS PARA CÃES

A indústria de alimentos para animais de estimação tem os mesmos riscos a respeito da contaminação das matérias-primas e produto final por

fungos e micotoxinas, como a indústria de alimentos para animais de produção. As matérias-primas utilizadas como cereais, farinhas e farelos, podem conter níveis altos de fungos e micotoxinas comprometendo o produto final e levando a um quadro de micotoxicoses nesses animais (BOERMANS e LEUNG, 2007; MOSS, 1998). Em relação a esses problemas, pesquisas têm sido realizadas a fim de testar métodos de descontaminação de alimentos com fungos e micotoxinas (KIM et al., 1999; MCDONOUGH et al., 2011; BEBER-RODRIGUES et al., 2014; SAVI et al., 2014; KREIBICH et al., 2016).

De acordo com Thenholm (2000) os métodos de descontaminação podem ser físicos, biológicos e químicos. Esses métodos de descontaminação visam à remoção da toxina sem comprometer a qualidade do alimento final.

#### *Descontaminação física*

É o método mais conhecido para remoção de fungos e micotoxinas, envolvem técnicas de processamento como peneiramento e lavagem, são os métodos mais indicados para os grãos (WILSON et al., 2004). O tratamento térmico também pode ser utilizado, entretanto, a maioria das micotoxinas são estáveis ao calor e não são eliminadas totalmente com este tratamento (MEISTER; SPRINGER, 2004). Há ainda a classificação dos grãos que é um tratamento físico de descontaminação por meio da eliminação de grãos quebrados, contendo esporos e a limpeza da superfície dos grãos sendo uma forma eficiente de reduzir as micotoxinas (BALZER et al., 2004).

#### *Descontaminação biológica*

Microrganismos, especialmente bactérias e leveduras, têm sido estudados quanto à sua potencialidade para degradar micotoxinas ou reduzir a sua biodisponibilidade (FUCHS et al., 2008, PELTONEN et al., 2001). Leveduras isoladas do intestino grosso e identificadas como o gênero *Trichosporon*, também mostraram potencial de desativação de ZON em alimentos para animais (MOLNAR et al., 2004).

Resultados com alta inibição na produção de AFLs utilizando microrganismos como: *Bacillus* spp (98%), *A. flavus* e *A. parasiticus* (90%) e *Trichoderma* spp (75%) foram demonstrados em estudo de Mallmann et al. (2006). Diante do exposto, alguns critérios devem ser seguidos para o estudo deste tratamento. A resistência do microrganismo frente à micotoxina precisa ser investigada, assim como, sua diferença de sensibilidade e seletividade (MADHYASTHA et al., 1994). Pesquisas



clínicas ainda são limitadas para verificar a eficiência de microrganismos para animais de estimação.

#### *Descontaminação química*

Os métodos químicos são aqueles que envolvem reações químicas ou processos químicos para a inativação de fungos e micotoxinas. Normalmente esses processos se referem à adição de substâncias químicas que proporcionam uma mudança na conformação da molécula, ou uma ligação. Estes métodos são os mais utilizados na indústria de alimentos, por serem mais rápidos e com custos mais baixos. Podem ser realizados por tratamento com atmosfera modificada (ozônio-O<sub>3</sub>, nitrogênio-N<sub>2</sub>, gás carbônico-CO<sub>2</sub>) e por meio de produtos químicos (compostos orgânicos e inorgânicos) (SAVI, 2014).

Os ácidos orgânicos foram bastantes estudos em relação à descontaminação e conservação, pois impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (AZEREDO, 2004). Outros processos químicos, muito utilizados na alimentação animal, são os adsorventes que reduzem a contaminação por micotoxinas. Estes adsorventes (zeolitas, bentonitas, argilas) podem se ligar à micotoxina, impedindo que sejam absorvidas pelo trato gastrointestinal do animal, sendo excretada pelas fezes (SILVA et al., 2013; HUWIG et al., 2001).

A ozonização também pode ser proposta como um método de descontaminação química para grãos contaminados com fungos e micotoxinas. Este gás é um oxidante poderoso reconhecido desde 1997 como uma substância geralmente reconhecida como segura - GRAS e aplicado na indústria de alimentos para a destruição ou a desintoxicação de substâncias químicas ou microrganismos. O O<sub>3</sub> atua mediante a oxidação progressiva de componentes celulares para destruir os microrganismos, impedindo seu crescimento e a formação da micotoxina (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004; SAVI et al., 2014).

Ainda como outra forma de descontaminação há o plasma a frio. O plasma é eletricamente matéria em estado gasoso que pode ser gerado pela descarga elétrica em pressão atmosférica e baixa temperatura, tornando este processo prático, barato e adequado para a descontaminação de produtos alimentares (RAGNI et al., 2010). Podem ser gerados à pressão atmosférica, facilitando a sua aplicação. Seu tratamento pode efetivamente inativar uma ampla gama de microrganismos, na superfície de alimentos frescos e processados, incluindo esporos fúngicos (FEICHTINGER et al., 2003; LEE et al., 2006).

### 2.5.1 Gás ozônio como método descontaminante

O ozônio é um alótropo triatômico ( $O_3$ ) composto por três átomos de oxigênio que se formam quando as moléculas de oxigênio se rompem devido à radiação ultravioleta e os átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio. Devido à maior estabilidade do oxigênio, a molécula de  $O_3$  sofre um processo de dissociação espontânea com o tempo resultando novamente na formação do oxigênio ( $O_2$ ) (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991). A decomposição não resulta em espécies nocivas, já que o mesmo é espontaneamente convertido em  $O_2$ , sendo seu uso seguro em alimentos. Por ser instável, requer que ele seja produzido no seu local de aplicação reduzindo assim gastos e perigos relacionados como seu transporte e estocagem (ARMOR, 1999; TATAPUDI; FENTON, 1994).

A produção comercial do ozônio é realizada pelo processo de descarga elétrica, também chamado de corona (USEPA, 1999). Este processo é constituído por dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000 V). O ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos. Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de  $O_2$ , começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do  $O_2$  e a conseqüente formação do  $O_3$  (CULLEN et al., 2009; USEPA, 1999) (Figura 5).

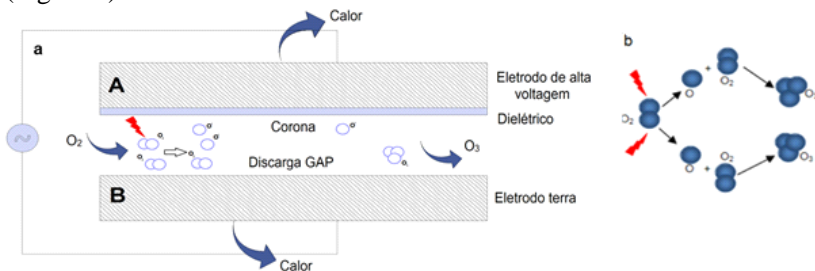


Figura 5. Gerador de ozônio (a) tipo descarga corona (USEPA, 1999) e (b) esquema de reação (CHRIST et al., 2015)

O gás  $O_3$  é um poderoso germicida, empregado em engenharia sanitária para a desinfecção da água potável e na remoção de sabores e odores indesejáveis. Também é um gás oxidante, que tem inúmeras aplicações na indústria alimentícia pelas vantagens que apresenta nas técnicas de preservação (SAVI et al., 2014). O  $O_3$  já se mostrou eficaz contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias (KIM;

YOUSEF, 2000; SHARMA et al., 2002), fungos (PALOU et al., 2002; PEREZ et al., 1999; KREIBICH et al., 2016) vírus e protozoários (CULLEN et al., 2009; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001). Além disso, também tem potencial para matar pragas de armazenagem (KELLS et al., 2001; MENDEZ et al., 2003), degradar micotoxinas (CULLEN et al., 2009; GIORDANO; NONES; SCUSSEL, 2012), pesticidas e resíduos químicos (ONG et al., 1996; HWANG; CASH; ZABIK, 2001; SAVI et al., 2014).

Na indústria alimentícia, o tratamento com O<sub>3</sub> vem sendo estudado com o intuito de melhorar a qualidade e evitar perdas quantitativas, devido à deterioração dos alimentos por fungos. O tratamento com gás O<sub>3</sub> tem demonstrado eficiência em reduzir contaminação por AFB<sub>1</sub> em figos secos (ZORLUGENÇ et al., 2008) e patulina em sucos de maçã (CATALDO, 2008). Pode desempenhar importante papel na qualidade de castanhas-do-Brasil, já que tem sido efetivo em inibir o crescimento fúngico e reduzir a contaminação por AFLs (SCUSSEL et al., 2011) e em amêndoas de cacau inoculadas com *A.flavus* (KREIBICH et al., 2016).

A eficácia do O<sub>3</sub> depende de vários fatores, incluindo a concentração aplicada, as características de cada alimento e os fatores ambientais em que se encontram (temperatura e umidade). Demonstra ser uma alternativa potencial que oferece vantagens para melhorar a qualidade e a produção dos alimentos. Neste sentido, vários estudos têm sido reportados na literatura quanto ao uso do gás O<sub>3</sub> para a inativação de bactérias e fungos (Tabela 5) e degradação de micotoxinas e pesticidas (Tabela 6) em alimentos.

Tabela 5. Aplicação de gás ozônio para inibição e inativação de bactérias e fungos em diferentes alimentos reportados na literatura.

Microrganismo	Amostra	Concentração	Tempo de exposição	de	Redução (log)	Referência
<b>BACTÉRIAS</b>						
<i>Escherichia. coli</i>	Pistache	0,1/0,5/1,0 ppm	360 min		3,5	Akbas & Ozdemir, 2006
<i>Bacillus. cereus</i>					3	
<i>E. coli</i>	Figo	0,1/0,5/1,0 ppm	360 min		1,4	Akbas & Ozdemir, 2008
<i>B. cereus</i>					2,9	
<i>Salmonella</i>	Orégao	2,8/ 5,3 mg/l	120 min		2,8-3,7	Torlak et al. 2013
<i>E.coli</i>	Alfafa	21 ppm	64 min		2,20	Sharma & Dermici, 2003
<b>FUNGOS</b>						
<i>Aspergillus flavus</i>	Milho	5 ppm	5 dias		100	Mason et a. 1997
<i>Fusarium verticillioides</i>						
<i>Penicilium citrinum</i>	Trigo	40/60 µmol/mol	30/60/120/180 min		100	Savi et al. 2014
<i>F.verticillioides</i>						
<i>F. graminearum</i>						
<i>A. flavus</i>						
<i>A. parasiticus</i>						
<i>A. flavus</i>	Castanha	10 mg/l	90 min		100	Scusset et al. 2011
<i>A. parasiticus</i>						
<i>A. flavus</i>	Castanha	10/14/31,5 mg/l	180/300 min		100	Giordano et al. 2012
<i>A. parasiticus</i>						
<i>A. flavus</i>	Figo	13,8 mg/l	7,5/15/30 min		100	Zorulgenç et al. 2008
<i>A. niger</i>						
<i>A. parasiticus</i>						
<i>Fusarium</i>	Cevada	11/26 mg/l	15/30/60 min		24 - 36	Kottapalli et al. 2005
<i>F. verticillioides</i>	Milho	50/100/200 ppm	60 min		100	Mylona et al. 2014
<i>A. flavus</i>	Trigo	40/60 µmol/mol	30/60/120/180 min		87,8	Savi et al. 2015
<i>P. citrinum</i>						
<i>Aspergillus</i>	Arroz	20/40 µmol/mol	1,6 min		99,9	Beber-Rodrigues et al. 2015
<i>Penicillium</i>						

Tabela 6. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando ozônio.

Contaminantes	Amostra	Concentração	Tempo de exposição	Redução (%)	Referência
<b>MICOTOXINAS</b>					
Aflatoxinas	Milho	47,8 ppm	1,8 min	30	McDonough et al. 2011
Aflatoxinas	Amendoim	6 $\mu\text{mol/mol}$	30 min	65,8	Chen et al. 2014
Aflatoxinas	Castanha	10 $\mu\text{mol/mol}$	90 min	100	Scussel et al. 2011
Deoxinivalenol	Trigo	60 $\mu\text{mol/mol}$	120 min	100	Savi et al. 2014
Fumonisininas	Milho	100/200 ppm	60 min	100	Mylona et al. 2014
<b>PESTICIDAS</b>					
Chlorpirifos etil,				92	
Tetradifon	Limão	10 ppm	5 min	59,9	Kusvuran et al. 2012
Clorotalonil				48,5	
Chlorpirifos etil,				100	
Tetradifon	Laranja	10 ppm	5 min	56,6	Kusvuran et al. 2012
Clorotalonil				40,4	
Fenitroton	Trigo	60 $\mu\text{mol/mol}$	180 min	69,4	Savi et al. 2015
Deltametrina	Trigo	60 $\mu\text{mol/mol}$	180 min	89,8	Savi et al. 2015
Fenexamida				68,5	
Ciprodinil	Uva	10 ppm	60 min	75,4	Karaca et al. 2012
Pirimetanil				83,7	

### 2.5.2 Plasma como método de descontaminação em alimentos

O plasma é o quarto estado da matéria e constitui cerca de 99% do universo. Esse termo se aplica a um gás ionizado composto por várias espécies atômicas, moleculares e iônicas, coexistindo com numerosas espécies reativas, incluindo elétrons, íons positivos e negativos, radicais livres, átomos e moléculas, e radiação eletromagnética (fótons UV e luz visível) (ALVES, 1995; BOURKE et al., 2018). Plasmas são geralmente classificados conforme seu nível de energia, temperatura e densidade iônica em plasmas de alta temperatura, plasmas térmicos e plasmas frios (plasma não-térmico ou em não-equilíbrio) (LIU; XU; WANG, 1999). O plasma térmico é caracterizado pelo equilíbrio termodinâmico entre os elétrons e as partículas pesadas do gás, havendo uma quase singular temperatura em cada ponto do espaço. Este tipo de plasma requer pressões mais altas ( $\geq 105$  Pa) e uma quantidade maior de energia para ser formado quando comparado ao não-térmico (FRIDMAN et al., 2007; BOURKE et al., 2017).

O plasma a frio (PF) tem como forte característica a ausência de equilíbrio termodinâmico. Os elétrons, dotados de alta energia e alta temperatura, devido a sua pequena massa não transferem quantidade de calor significativo às partículas pesadas do meio, gerando o não equilíbrio termodinâmico. Dessa forma os elétrons possuem temperatura muito

maior do que as partículas do meio. A temperatura do gás pode estar na temperatura ambiente, enquanto que a dos elétrons pode alcançar temperaturas de 104 – 105K (ISTADI, 2006). Nas tecnologias de plasma, o PF é o mais utilizado (Figura 6).

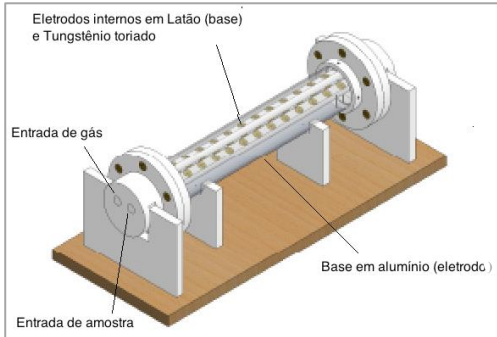


Figura 6. Esquema do reator de plasma a frio de descarga em barreira dielétrica, do tipo ponta plano com vários eletrodos.

Plasmas são utilizados hoje em dia para uma variedade de aplicações comerciais variando de tecnologia microeletrônica, processamento de materiais, monitores de tela plana, revestimentos anticorrosão, melhoria das propriedades de barreira em materiais de embalagem, tratamento de resíduos tóxicos, e esterilização de alimentos (HELHEL; OKSUZ; RAD, 2005; SCHNEIDER et al, 2005; CHU, 2007). A esterilização por plasma pode oferecer uma alternativa para métodos de desinfecção. Esse gás apresenta tratamento uniforme, podem executar a atividade a baixa temperatura e sem alteração do alimento (sabor, odor, estrutura), e finalmente, o plasma não requer produtos químicos, portanto, não deixam resíduos tóxicos (NIEMIRA, 2012; SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008; NIEMIRA; GUTSOL, 2010).

Os mecanismos pelos quais o PF inativa os microrganismos é causando danos às membranas celulares por radiação ultra-violeta (UV) (GALLAGHER et al., 2007). A UV também pode causar modificações no DNA e conseqüente replicação celular inadequada (BOLSHAKOV et al., 2004). A oxidação de membranas celulares e aminoácidos devido a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, incluindo oxigênio atômico, ozônio, óxido nítrico e dióxido de nitrogênio, é também um mecanismo importante de inibição microbiana mediada pelo plasma frio (LAROUSSE; LEIPOLD, 2004).

O plasma tem sido aplicado na indústria de alimentos para a descontaminação de matérias-primas agrícolas (maçãs, amêndoa, manga e melão) (NIEMIRA, 2008; PERNI et al., 2008; SCHNABEL et al., 2014), ovos (RAGNI et al., 2010) e queijo (SONG et al., 2009). Além disso, tem havido estudos recentes sobre o tratamento com plasma em pimenta preta e ervas (HERTWIG et al., 2014). Esta tecnologia também tem sido aplicada com sucesso para a esterilização superficial em materiais de embalagem (MIR; SHAH; MIR, 2016; MISRA et al., 2015, PANKAJ et al., 2015, SCHOLTZ et al., 2015).

Essa capacidade do plasma em trabalhar a baixas temperaturas tem aberto a possibilidade de usar a tecnologia para o tratamento de alimentos sensíveis ao calor (KORACHI et al., 2015; CULLEN et al., 2017). Em relação a trabalhos utilizando PF para descontaminação em alimentos, as bactérias foram as mais estudadas como observado na Tabela 7 (KIM et al., 2014; ZIUZINA et al., 2014; BERMUDEZ-AGUIRRE et al., 2013; GUROL et al., 2012; ROD et al., 2012; KIM et al., 2011; LEE et al., 2011; SONG et al., 2009). No entanto, trabalhos com fungos (DASAN et al., 2016; SUHEM et al., 2013; SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008; TROMPETER et al., 2002), micotoxinas (SICILIANO et al., 2016; OUF; BASHER; MOHAMED, 2015; PARK et al., 2007) e pesticidas (HEO et al., 2014; MISRA et al., 2014; BAI et al., 2009) também já foram realizados.

Tabela 7. Aplicação de plasma a frio para inibição e inativação de bactérias e fungos em diferentes alimentos reportados na literatura.

Microrganismo	Amostra	Reator	Tempo de exposição (min)	Redução (log)	Referência
<b>BACTÉRIAS</b>					
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ovo	DBD	90	4-5	Rowan et al. 2007
<i>L. monocytogenes</i>	Queijo fatiado	APP	2	1-5	Song et al. 2009
<i>L. monocytogenes</i>	Presunto fatiado	APP	2	1.73	Lee et al. 2011
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Bacon	APP	1,5	2-3	Kim et al. 2011
<i>E. coli</i> <i>S. Stanley</i>	Maçã	ARC	3	3,7	Niemira & Sites, 2008
<i>E. coli</i>	Amêndoas	DBD	0,5	1,8-5	Deng et al. 2007
<i>E.coli</i>	Manga Melão	APJ	0,08	3	Perni et al. 2008
<i>E.coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i>	Suco de laranja	DBD	0,41	5	Shi et al. 2011
<b>FUNGOS</b>					
<i>Aspergillus flavus</i>	Pimenta em pó	DM	20	2.5	Kim et al. 2014
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Avelãs	APF BP	5	4.50	Dasan et al. 2016
<i>A. flavus</i>	Barra de cereais	APJ	20	4	Suhem et al. 2013
<i>A. parasiticus</i> <i>Penicillium</i>	Grãos e cereais	SD	15	3	Selcuk et al. 2008

DBD: descarga de barreira dielétrica; APP: plasma a pressão atmosférica; APJ: jato de plasma a pressão atmosférica; DM: descarga micro-ondas; SD: selfie-design; APFBP: plasma em pressão atmosférica em leito fluidizado; ARC: descarga em arco



Tabela 8. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando plasma a frio.

Contaminantes	Amostra	Reator	Tempo de exposição (min)	Redução (%)	Referência
<b>MICOTOXINAS</b>					
Aflatoxinas	Avelã	DBD	12	70	Siciliano et al. 2016
Fumonissina*					
Ocratoxina A	Tâmaras	DAPACP	6-7,5	100	Ouf et al., 2015
Aflatoxina**	Amendoim	SD	12	90	Devi et al. 2017
<b>PESTICIDAS</b>					
Paration	Maçã	DBD	2	95,9	Heo et al. 2014
Azoxistrobina				69	
Ciprodinil				45	
Fludioxonil	Morango	DBD	1-5	71	Misra et al. 2014
Piriproxifeno				46	
Diclorvós	Milho	RF	2	100	Bai et al. 2009

DBD: descarga de barreira dielétrica; DAPACP: plasma frio de dupla pressão atmosférica; SD: selfie design; RF: plasma de radiofrequência \*FB<sub>2</sub>\*\*AFB<sub>1</sub>



## REFERÊNCIAS

ABECASSIS, J. et al. Influence of extrusion conditions on extrusion speed, temperature and pressure in the extruder and on pasta quality. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 247-253, 1994.

ABINPET. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**. São Paulo, SP, 2015. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/>> Acesso em: 22 nov. 2015.

ALLDRICK, A.J.; HAJŠELOVA, M. Zearalenone. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Org.). 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**, v. 38, n.5, p. 617-630, 2003.

ALVES, Nelson Aparecido. Utilização da ferramenta “Boas práticas de fabricação (BPF)” na produção de alimentos para cães e gatos. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ANDRADE, R.M.; NASCIMENTO, J.S. Presença de fungos filamentosos em ração para cães comercializadas na cidade de Pelotas-RS. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 72, n.2, p.10-12, 2005.

ARMOR, J.N. Striving for catalytically green processes in the 21st century. **Applied Catalysis A: General**, v.189, n.2, p. 153-162, 1999.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ANFALPET. Manual do programa integrado de qualidade pet. 2.ed. São Paulo: 2008. 238p.

AOAC.(2005). **Association Official Method of Analysis of AOAC internacional**. Thiex, NJW (E.d.). Official Methods of Analysis. 18.ed. Maryland: AOAC International.

AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195p.

BALZER, A. et al. The trichothecenes: the nature of toxins, natural occurrence in foods and feeds and ways of combating their occurrence. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 155, n.6, p. 299-314, 2004.

BARBOSA, I.P.; RODRIGUES, A.M.D.; MURATORI, M.C.S.; FERREIRA, M.D.S.; FILHO, F.C.C.; PEREIRA, M.M.G. Espécies fúngicas isoladas de ração para gatos comercializadas. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 15, Ed. 264, 2014.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York: Macmillan Publishing Company, 218p. 1986.

BASTIANELLO, S.S.; NESHIT, J.W.; WILLIAMS, M.C.; LANGE, A.L. Pathological findings in a natural outbreak of aflatoxicosis in dogs. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.54, p.635-640, 1987.

BEBER-RODRIGUES, M.; SAVI, G.D.; SCUSSEL, V.M. Ozone effect on fungi proliferation and genera susceptibility of treated stored dry paddy rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Food Safety**, v.35, p.59-65, 2015.

BERSET, C.; CUVELIER, M.E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidant power. **Sciences des Aliments**. n.16, p.219-245, 1996.

BERTOLINO, M. T. **Gerenciamento da qualidade na indústria alimentícia**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BOERMANS, H.J.; LEUNG, M.C.K. Mycotoxins and the petfood industry: toxicological evidence and risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.95-102, 2007.

BOLSHAKOV, A.A.; CRUDEN, B.A.; MOGUL, R.; RAO, M.; SHARMA, S.P.; KHARE, B.N.; MEYYAPPAN, M. Radio-frequency oxygen plasma as a sterilization source. **AIAA Journal**. v.42, p.823-832, 2004.

BONE, D.P.; SHANNON, E.L. Process for making a dry pet food have a hard component and a soft component. **United States Patent**. Fevereiro de 1977.

BORGES, F.M.; SALGARELLO, R.M.; GURIAN, T.M. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. In: **III SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO**. Colégio Brasileiro de Alimentação Animal, p. 21-60, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas e padrões de nutrição e alimentação animal**. Brasília: MA/SARC/DFPA, p.12, 200. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 14. mar de 2016.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 8, de 11 de outubro de 2002. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2002. seção 2, p.1-6.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 04, de 1 de Março de 2007a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao>. Acesso em: 02 Ago. de 2016.

BRASIL. MAPA. **Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2007b**.D.O.U., Brasília, 24 de fevereiro de 2007. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2016.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 30, de 05 de agosto de 2009. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1312271284>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRASIL. Decreto nº 6.296, de 11 de dezembro de 2007. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1197672218>>. Acesso em: 02 ago. 2016.

BRAZIS, P. The role of storage mites in canine atopic dermatitis. **Veterinary Focus**, v. 21, n.3, p.42-46, 2011.

BRITO, C.B.M., FELIX, A.P., JESUS, R. M., FRANÇA, M. I., KRABBE, E.L., OLIVEIRA, S.G., MAIORKA, A. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.150-155, 2010.

BULLERMAN, L.B. et al. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n.8, p. 637-646, 1984.

CARCIOFI, A.C. Proposta de normas e padrões nutricionais para a alimentação de cães e gatos. **In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO**, Campinas. Anais... Campinas, 2003. p.71-84.

CARCIOFI, A.C. Alimentos Industrializados para Cães e Gatos. In: 1º Ciclo de Educação Continuada em Medicina Veterinária, 2004, São Paulo. **Anais...**São Paulo, SP:FUMVET, 2004.p.22-32.

CARCIOFI, A.C. Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.28-41, 2008.

CARCIOFI, A.C.; TESHIMA, E.; BAZOLLI, R. S.; BRUNETTO, M.A.; VASCONCELLOS, R.S.; PEREIRA, G.T.; OLIVEIRA, L. D. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.10, n.2, p.489-500, 2009.

CARCIOFI, A.C. JEREMIAS, J.T. Progresso científico sobre nutrição de animais de companhia na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.35-41, 2010.

CASE, L.P., DARISTOTLE, L., HAYEK, M.G., RAASCH, M.F. **Canine and Feline Nutrition**.3th ed., St. Louis, MO, 542 pp, 2011.

CAST, Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems**. Ames: Task Force Report nº139, 199p., 2003.

CATALDO, F. Ozone decomposition of patulin - a mycotoxin and food contaminant. **Ozone: Science & Engineering**, v. 30, p.197-201,2008.

CHEEKE, P.R. Applied animal nutrition: feeds and feeding. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. p. 26-81.

CHU, P.K. Enhancement of surface properties of biomaterials using plasma-based technologies. **Surface and Coatings Technology**, v.201, p.8076–8082, 2007.

CHUANG, G. C.; YEH, A. Effect of screw profile residence time distribution and starch gelatinization of rice flour during single screw extrusion cooking. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 21-31, 2004.

CODEX ALIMENTARIUS. **Higiene dos alimentos** – texto básico. 3ª edição, revisado 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/codex\\_alimentarius.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/codex_alimentarius.pdf)> Acesso em: 25 de fev 2016.

Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. São Paulo: Sindrizações/Anfal. Campinas CBNA/SDR/MA.1998. 371p.

COPETTI, M.V. **Avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos e potencial micotoxigênicos de espécies selecionadas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CORBIN, J. E. Pet food technology.[S.l.: s.n.], 2003. 514.

COULOMBE, R.A. Biological action of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 880-891, 1993.

COSTA, D.; POETA, P.; SAENZ, Y. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.97-105, 2008.

COWELL, C. S. et al Making commercial pet food. In: HAND, M. et al. Small animal clinical nutrition, 4ed Kansas: Mark Morris Institute, p. 127-146, 2000.

CRANE, S.W.; GRIFFIN, R.W.; MESSENT, P.R. Introduction to commercial pet foods, in Hand, M.S.; Thatcher, C.D.; Remillard, R.L.,

et al (eds): **Small Animal Clinical Nutrition** (ed 4). Marceline, MO, Walsworth Publishing Company , p. 111-126, 2000.

CULLEN, P. J. et al., Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n.3-4, p. 125-136, 2009.

CURTIS, A. O.; BESS, F.; SILVEIRA F.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. Comparação de diferentes meios de cultivo para avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos. Disponível em:

<<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1115-2.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2016.

DASAN, B.G.; MUTLU, M.; BOYACI, I.H. Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. **International Journal of Food Microbiology**, p.50–59, 2016.

DE SOUZA KOERICH, K; SIMAO, V.; SCUSSEL, V.M. Evaluation of dogs na cats pathologies and their relation to mycotoxins. In: ANNUAL WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 35, 2010, Geneve. **Proceedings...** Geneve: WSAVA, 2010. p.100.

DE SOUZA KOERICH, K., SCUSSEL, V.M. Occurrence of dogs and cats diseases records in the veterinary clinics routine in South Brazil and its relationship to mycotoxins. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.2, p.129-134, 2012.

DE SOUZA KOERICH, Karina. **Rotulagem, qualidade e segurança biológica de alimentos para animais de companhia e seu impacto na saúde**. 2013. 232 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

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, n.2, p. 187-198, 2010.



EL-DESOUKY, T.A.; SHAROBA, A.M.A.; EL-DESOUKY, A.I.; EL-MANSY, H.A.; NAGUIB, K. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B1 and *Aspergillus flavus* fungal. **Journal Environmental Analytical Toxicology**. v. 2, p.128-133, 2012.

FARONI, L.R.D. Controle de ácaros e carunchos em pet food. **In:** FORUM PET FOOD, São Paulo, 2002.

FARREL, F. Effects of restricted dietary flavor experience before weaning on postweaning food preference in puppies. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**., v.8, p.191-198,1984.

FEICHTINGER, J. S. A.; WALKER, M.; SCHUMACHER, U. Sterilisation with low-pressure microwave plasmas. **Surface Coating Technology**,174:564-9, 2003.

FELIX, A.P., OLIVEIRA, S.G., MAIORKA, A. Fatores que interferem no consumo de alimentos em cães e gatos. **In:** Vieira, S. Consumo e preferência alimentar de animais domésticos. 1ed. Phytobiotics Brasil: Londrina. Cap. 3. p. 162-199, 2010.

FERREIRA, W.L.B. Controle integrado de roedores no armazenamento de grãos e alimentos. **In:** Manejo integrado de pragas pós-colheita. Maringá: Grãos Brasil, v.1, p. 97-132, 2011.

FRANÇA, J.; SAAD, F.M.O.B.; SAAD, C.E.P.; SILVA, R.C.; REIS, J, S. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.222-231, 2011.

FRIDMAN, G.; BROOKS, A.; BALASUBRAMANIA, N.; FRIDMAN, A.; GUTSOL, A.; et al. Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria. **Plasma Processes and Polymers** v.4, p.370–375, 2007.

FRIDMAN, G.; FRIEDMAN, A.; GUTSOL, A.B.; SHEKHTER, V.N.; VASILETS, A. Applied plasma medicine. **Plasma processes and Polymers**., 5, pp. 503–533, 2008.

FUCHS, S. et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n.4, p. 1398-1407, 2008.

GAJECKA, M.; JAKIMIUK, E.; POLAK, M.; OTROCKA-DOMAGALA, I.; JANOWSKI, T.; ZWIERZCHOWSKI, W.; OBREMSKI, K.; ZIELONKA, L.; APOZNANSKI, J.; GAJECKI, M. Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, 7, p.59-66, 2004.

GALLAGHER, M.K.; VAZE, N.; GANGOLI, S.; VASILETS, V.N.; GUTSOL, A.F.; MILOVANOV, T.N. Rapid inactivation of airborne bacteria using atmospheric pressure dielectric barrier grating discharge. **IEEE Trans. Plasma Sci.** v.35, p.1501-1510, 2007.

GEYTER, N.; MORENT, R. Nonthermal plasma sterilization of living and nonliving surfaces. **Review of Biomedical Engineering**. V.14: p.255-274, 2012.

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 Agriculture Science**. v.4 (8):p.1-10, 2012.

GLORIA, E.M.A.; GOES, F.C.S.; SILVA, T.M. Profile and levels of bioactive amines in adult and puppy dog food. In: Scussel, V.M.; Nones, J.; De Souza Koerich, K.; Santana, F.C. de O.; Beber, M.; Neves, L.S.D'e.; Manfio, D. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PET FOOD QUALITY & SAFETY & 14TH NATIONAL MYCOTOXIN MEETING, 14, 2010, Florianópolis. **Abstract Book...** Florianópolis: PET FOOD SAFE, 2010. p.52.

GOLINSKI, P.K.; NOWAK, T. Dietary origin of mycotoxins with estrogenic potential and possible health implications to female dogs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.7, p.337-341, 2004.

GOMES, A.M.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.R.S.; ASSIS, R.A. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através de PCR múltipla. **Ciência Rural**, p.1943-1947, v.38, n.7, 2008.

GRIFFIN, R. Palatability testing methods: parameters and analyses that influence test conditions. **Petfood Technology**, 1ed. Watt Publishing Co., Mt.Morris, IL, p.187-193, 2003.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 37, n.4, p. 453-460, 2004.

HAUCK, B. Extrusion cooking system **In: McELLINEY, R. R.** Feed manufacturing technology IV. Arlington:VA, p. 131-140, 1994.

HELHEL, S., OKSUZ, L., RAD, A.Y.,. Silicone catheter sterilization by microwave plasma; argon and nitrogen discharge international. **Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves**.v.26, p. 1613–1625, 2005.

HERTWIG, C.; REINEKE, K.; EHLBECK, J.; BELGIN ERDOG, B.; RAUH, C.; SCHLÜTE, O. Impact of remote plasma treatment on natural microbial load and quality parameters of selected herbs and spices. **Journal of Food Engineering**. 2014. [doi:10.1016/j.jfoodeng,2014.12.017].

HINTON, M.; MEAD, G.C. Bacterial pathogens in animal feed and their control. **World's Poultry Science Journal**. London, v.48, n.1, p.72-73, 1992.

HUGHES, D.M.; GAHL, M.J.; GRAHAM, C.H.; GRIEB, S.L. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. **Journal of Animal Science**, v.77, p.693-700, 1999.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, V.2, p.504-509, 2004.

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

HUSSEIN, H. S. Petfood technology. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Basic nutrient requirements for healthy adult dogs**. Washington: National Academic. p.2-13, 2003.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 2, p. 179-188, 2001.

HWANG, E.; CASH, J.N.; ZABIK, M.J. Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.49, n.6, 3127-3132, 2001

IARC. International Agency for Research of Cancer. **Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenona, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenon-X.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 56, p. 397-444, 1993.

INAN, F.; PALA, M.; DOYMAZ, I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. **Journal Stored Products Research**. v.43 (4), p.425-429, 2007.

ISTADI, N. A. S. A. Co-generation of synthesis gas and C2C hydrocarbons from methane and carbon dioxide in a hybrid catalytic-plasma reactor: A review. **Fuel**, v.85, p.577 – 592, 2006.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.342-362, 2007.

KELLS, S.A; MASON, L.J, MAIER, D.E; WOLOSHUK, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal Stored Products Research**. 2001, 37 (4):371-82.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**, v. 66, n.9, p. 1242-1252, 2001.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**, v. 65, n.3, p.521-528, 2000.

KRABBE, E.L.; LOIOLA, A. Perdas nutricionais durante a secagem do alimento extrusado. In: V SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2005. Campinas. Anais... Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2005, p. 115-120.

KREIBICH, H.H.; CHRIST, D.; MARIA, G.S.; SILVA, J.; SAVI, G.D.; SCUSSEL, V.M. Decontamination of Cocoa Beans (*Theobroma cacao*

L.) Inoculated with *Aspergillus flavus* by Ozone Gas **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**. v.6 n.3; p. 560-570, 2016.

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

LAROUSSE, F.; LEIPOLD, M. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. **Journal Mass Spectrom.**, 233, 81–86, 2004.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos, rações**. Ed. Do autor, Curitiba-PR, 134p, 1997.

LEE, K. P.K.; JU, W.T.; LEE, Y. Sterilization of bacteria yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. **Journal of Microbiology.**, 44, 3, p. 269-275, 2006.

LIMA, Daniele Cristina de. **CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

LIU, C. J.; XU, G. H.; WANG, T.; Non-thermal Plasma Approaches in CO<sub>2</sub> Utilization. **Fuel Processing Technology**. v.58, p.119 – 134, 1999.

LORINI, I. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT, 52p, 1998.

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

MACHADO, E.H.L.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G.; DEZOTTI, C.H. Frequência de insetos-praga em alimento industrializado para cães comercializado na cidade de Recife-PE. **Medicina Veterinária**, Recife, v.2, n.1, p.10-16, 2008.

MADHYASTHA, M.S. et al. Comparison of toxicity of different mycotoxins to several species of bacteria and yeast: Use of

*Bacillus brevis* in a disc diffusion assay. **Journal Food Protect**, v. 57, n.1, p. 48-53, 1994.

MAIA, P.P.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Aflatoxins in pet foods – a review. **Revista da FZVA**, v.14, n.1, p. 235-257. 2007.

MALLMANN, C. A. et al. Fumonisin B1 levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n.1, p.41-45, 2001.

MALLMANN, C.A. et al. **Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas**. Trabalho publicado nos anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 213-224, 2006.

MARTINS, M. S.; PONTIERI, C. F. Diferença dos segmentos: Standard, Premium e Super Premium. **Cães e Gatos: Pet Food**, São Paulo, n. 134, p.23-25, 2010.

MEISTER, U.; SPRINGER, M. Mycotoxins in cereals and cereal products-occurrence and changes during processing. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 78, n.3, p. 168-173, 2004.

MENDEZ, F. et al., Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n.1, p. 33-34, 2003.

MOLNAR, O. et al. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 661-671, 2004.

MOREAU, M. ET AL, Non-thermal plasma technologies: New tools for bio decontamination. **Biotechnology Advances**. v.26, p.610 – 617, 2008.

MOSS, M.O. Recent studies of mycotoxins. **Journal Applied Microbiology**., v. 84, p. 62-76, 1998.

MOSS, M.O. Mycotoxin review-2. *Fusarium*. **Mycologist**. v. 16, p.158-161, 2002.

MURAKAMI, F.Y. **Impacto da adição de água no processo de extrusão sobre a digestibilidade e propriedades físico-químicas da dieta para cães.** Curitiba - PR: Universidade Federal do Paraná, 2010. 40p. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Paraná, 2010.

MURRAY, S.M.; FLICKINGER, A.E.; PATIL, A.R. et al. In vitro fermentation characteristics of native and processed cereal grains and potato starch using ileal chyme from dogs. **Journal of Animal Science**, v.79, n.2, p.435-444, 2001.

MUZOLON, P. **Micotoxícoses em cães.** 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, n.6, p. 425-429, 2006.

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

NIEMIRA BA, GUTSOL A. Nonthermal plasma as a novel food processing technology. In **Nonthermal Processing Technologies for Food**, ed. HQ Zhang, G Barbosa-C´anovas, VM Balasubramaniam, P Dunne, D Farkas, J Yuan, pp. 271–88. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2010.

NORTHOLT, M. D. *et al.* Penicilic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **Journal Food Protection**., v. 42, p. 476-484, 1979.

NRC.NACIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats.** Washington; National Academies, 2006.398 p.

ONG, K.C. et al. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. **Food Chemistry**, v. 55, n.2, p. 153-160, 1996.

ORSI, R.B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisin in freshly harvested and stored hybrid. **Journal Stored Products Research**, v. 36, p. 75-87, 2000.

OSAWA, C.C.; GONÇALVES, L.A.G.; RAGAZZI, S. Evaluation of the quality of pet foods using fast techniques and official methods. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V.28, p.223-230, 2008.

ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENÇ, B.; ZORLUGENÇ, F.K.L. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal Food Engineering**. v.75 (3), p.396-399, 2006.

PALOU, L. et al. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, p. 39-48, 2002.

PATERSON, R. R. M.; VENANCIO, A.; LIMA, N. Solutions to Penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**. 155(7):507- 513, 2004.

PATTERSON, D.S.P. Toxin-producing fungi and susceptible animal species. In: WYLLIE, T.D., MOREHOUSE, L.G. **Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Micotoxicosis Vol 1**. New York: Marcel Dekker Inc, 1977, p. 156-158.

PELTONEN, K. et al. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2152-2156, 2001.

PERNI, S.; LIU, D.W.; SHAMA, G.; KONG, M.G. Cold Atmospheric Plasma Decontamination of the Pericarps of Fruit. **Journal of Food**, v.71, p.302-308, 2008.

PEREIRA, M.M.G., CARVALHO, E.P., PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *aspergillus flavus* e *aspergillus parasiticus*. **B. CEPPA**, 20(1):2002.



PEREZ, A.G. et al., Effect of ozone treatment on postharvest strawberry quality. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 47, n.4, p. 1652–1656, 1999.

PETBR. **A força dos nutrientes**. 2013. Disponível em: <<http://www.petbrasil.com.br>>. Acesso em: 20 out. 2015.

PHILLIPS, T.W.; JIANG, X. L.; BURKHOLDER, W.E.; PHILLIPS, J.K.; TRAN, H.Q. Behavioral responses to food volatiles by two species of stored – product coleoptera, *Sitophilus oryzae* (Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae). **Journal of Chemical Ecology**, v.9, n.4, p.723-734, 1993.

PITT, J.L. **The genus *Penicillium* and its teleomorphics states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press, 634p. 1979.

POZZI, C.R. et al. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. **Mycopathologia**, v. 151, n.1, p. 21-27, 2001.

RAGNI, L.; BERARDINELLI, A.; VANNINI, L.; MONTANARI, C.; SIRRI, F.; GUERZONI, M.E. Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. **Intl. J. F. Engineering**, 100(1), p.25- 32, 2010.

RAPER, K.B; FENNEL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 686.p. 1965.

RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; GRAJEWSKI, J.; SZCZPANIAK, K.; KÜBBERHEISS, A.; IBEN, I. Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.**, v.85, p.212- 216, 2001.

RIAZ, M. N. Extrusion basics. In: KVAMME, J. L.; PHILLIPS, T. D. **Pet Food technology**. Illinois Mt Morris, p. 347-360, 2003.

ROKEY, G.J.; PLATTNER, B., DE SOUZA, E.M. Feed extrusion process description. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p. 510-518, 2010.

ROKEY, G.J., PLATTNER B., SOUZA E. M. Descrição do processo de extrusão do alimento. In: IV Congresso Internacional e XI Simpósio sobre nutrição de animais de estimação - CBNA. São Paulo – SP, Maio de 2012.

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

RUMBEIHA, W.K. Clinical implications of mycotoxicosis in companion animals. **Technical Symposium on Mycotoxin**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

SAAD, F.M.O.B.; DUARTE, A.; SAAF, C.E.P. et al. **Aspectos técnicos-comerciais e avaliação da qualidade de alimentos para cães e gatos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 105p.

SÁ-FORTES, C.M.L. Formulação de rações para cães. In: ZOOTECA, Campo Grande-MS, 2005.

SANTIN, E.; BONA, T.D.M.M. Micotoxicoses em cães e gatos: é ou não um problema no Brasil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, 1., SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 8., 2009, Campinas. Anais... Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p.71-78, 2009.

SANTOS, E.J.; CARVALHO, E.P.; SANCHES, R.L. et al. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no estado de Minas Gerais para produção de ração animal. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.425-433, 2000.

SANTOS, J.M.; RAMIREZ, P.; BAPTISTA, J.A.A.; HENRIQUE, M.R.; OLIVEIRA, P.C. (2013). **Armazenagem de rações secas: estudo de caso pet shop**. Disponível em: [http://www.fatecguaratingueta.edu.br/fateclog/artigos/Artigo\\_51.PDF](http://www.fatecguaratingueta.edu.br/fateclog/artigos/Artigo_51.PDF). Acesso em: 22 fev. 2016.

SAVI, G.D.; PIACENTINI, K.C.; SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* growth inhibition and mycotoxin degradation of stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.).

**Journal of Food Processing and Preservation.** v. 39 (6), p.940-948, 2015.

SCHNABEL, U.; NIQUET, R.; SCHULUTER, O.; EHLBECK, J. Decontamination and sensory properties of microbiologically contaminated fresh fruits and vegetables by microwave plasma processed air (PPA). **Journal of Food Processing and Preservation.** 2014

SCHNEIDER, J., BAUMGARTNER, K.M., FEICHTINGER, J., KRUGER, J., MURANYI, P., SCHULZ, A., WALKER, M., WUNDERLICH, J., SCHUMACHER, U. Investigation of the practicability of low-pressure microwave plasmas in the sterilisation of food packaging materials at industrial level. **Surface and Coatings Technology.** v.200, p.962–966, 2005.

SCOTT, W.J. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C. **Australian Journal of Biological Sciences.** 6:549–556. 1953.

SCUDAMORE, K.A. et al. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. **Food Additives and Contaminants.** v.14, p.175–186, 1997.

SCUSSEL, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos I.** Ed VMS, Florianópolis-SC, 328p, 2000.

SCUSSEL, V.M. Fungos em Grãos Armazenados. In: LORRINI I.; MIKE, L; SCUSSEL, V.M. Armazenagem de Grãos. Ed. Biogeneziz, Cap.9, Campinas, SP, 938p, 2002.

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.

SEIXAS, J.R.C.; ARAÚJO, W.A.; FELTRIN, C.A. et al. Fontes protéicas para alimentos pet. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 3., 2003, Campinas. Anais... Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal Campinas, 2003. p.97-116.

SELCUK, M.; OKSUZ, L.; BASARAN, P. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. **Bioresource Technology**.v. 99, p.5104–5109, 2008.

SHARMA, R.R. et al., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat Treatment. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.3, p. 447–451, 2002.

SILVA, J.R.; LIMA, D.C.; LOWNDES, F.G.; DOMINGUES, L.P.; MAIORKA, A.L.; OLIVEIRA, S.G. Efeito da inclusão de *yucca schidigerana* digestibilidade e características de fezes de cães. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2013, Campinas. Anais... Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2013.

SILVA, C.V. da; BARROS, F.; SOUZA, C.F.V. Qualidade Nutricional De Rações Secas Para Cães Adultos Comercializadas Em Lajeado-Rs. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 4, n. 2, p.153-160, 2010.

SIMAO V.; SCUSSEL VM. Qualidade na produção de rações e ingredientes para pets. In: SCUSSEL V.M., DA ROCHA, M.W., LORINI, I., SABINO, M., ROSA C.A DE R., CARVAJAL, M.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II**. Florianópolis: ABMAG; 2008.

SONG, H.P.; KIM, B.; CHOE, J.H.; JUNG, S.; MOON, S.Y, CHOE, W. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. V. 26, p.432-436, 2009.

SOUSA, D. F., PEDROZA, L. G., SA, F. C., SILVA, JEREMIAS, J. T., ROBERTI FILHO, F. O., CARCIOFI, A. C., Efeito do Processamento na Recuperação do Extrato Etéreo de Rações Extrudadas para Gatos. In: IV Congresso Internacional e XI Simpósio sobre nutrição de animais de estimação - CBNA. Campinas – SP, Maio de 2012.

SMITH, G.W. Fumonisin. In: GUPTA, R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, p. 983-998, 2007.

SOUZA E. Importância do condicionador na produção de extrusados. **In:** II Congresso Internacional e IX Simpósio sobre nutrição de animais de estimação - CBNA. Campinas – SP, Maio de 2010.

SPEARS, J. K., and G. C. FAHEY, Jr. Resistant starch as related to companion animal nutrition. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**. 87:p.787.–791, 2004.

STAWICK, B. Microbiological and chemical testing. **In:** KVAMME, J.L.; PHILLIPS, T.D. (Eds.) Petfood technology. Mt Morris: Watt, p.490-499, 2003.

SUGIARTO, A. T.; ITOA, S.; OHSHIMAA, T.; SATOA, M.; SKALNY, J. D.; Oxidative decoloration of dyes by pulsed discharge plasma in water. **Journal of Electrostatics**. V.58, p.135 – 145, 2003.

SYDENHAM, E.W., GELDERBLOM, W.C.A., THIEL, P.G., et al. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1 a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.2014-2018, 1991.

SZCZECH, G.M.; CARLTON, W.W.; TUIITE, J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. I. Clinical and clinic pathological features. **Veterinary Pathology**, v.10, p.135-154, 1973a.

SZCZECH, G.M.; CARLTON, W.W.; TUIITE, J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, v.10, p.219-231, 1973b.

SZCZECH, G.M.; CARLTON, W.W.; HINSMAN, E.J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. III. Terminal renal ultrastructural alterations. **Veterinary Pathology**, v.11, p.385- 406, 1974.

TARDIN, A. C. Dietas com alta proteína e gordura na alimentação de cães e gatos. **In:** SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO E ALIMENTOS PARA CÃES E GATOS, 2002, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2002. p. 37–46.

TATAPUDI, P.; FENTON, J. M. Electrochemical oxidant generation for waster water treatment. **In:** SEQUEIRA, C.A.C. **Environmental Oriented Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, p. 103-130, 1994.

THENHOLM, L.C.L. Binding agents: to reduce the toxicity of mycotoxins in feed. In: SCUSSEL, V.M. **Atualidade em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Florianópolis: VMS, p.177-185, 2000.

TURCOTTE, J. C.; HUNT, P. J. B.; BLAUSTEIN, J. D. Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progesterin receptors and sexual behavior in female rats. **Hormones and Behavior**. v. 47 p. 178–184, 2005.

UBOLDI EIROA, M.N. Atividade de água: influência sobre o desenvolvimento de microrganismos e métodos de determinação em alimentos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos - Bol. ITAL**, Campinas - SP, V. 18, n° 3, p.353- 383. Julho/Setembro, 1981.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**, 1999. Disponível em: <[http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf)>. Acesso em: 30 mai. 2016.

VON WOEDTKE, T.; REUTER, S.; MASUR, K.; WELTMANN, K.D. Plasmas for medicine. **Phys. Rep. Rev. Sect. Phys. Lett.**, 530 (2013), 291–320, 2013.

WELTMANN, K.D.; BRANDENBURG, R.; VON WOEDTKE, T.; J.; EHLBECK, R.; FOEST, R.; STIEBER, M.; KINDEL, E. Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs) **Journal of Physics D: Applied Physics.**, 41, 2008

WILLARD, T. Choosing and sourcing the best ingredients. In: KVAMME, J.L.; PHILLIPS, T.D. (Eds.) **Petfood technology**. Mt Morris: Watt, 2003. p.76-81.

WILSON, S.C. et al. An investigation into techniques for cleaning mould-contaminated home contents. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 1, n.7, p. 442-447, 2004

ZORAN, D.L. The carnivore connection to nutrition in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.221, n.11, p.1559, 2002.

ZORLUGENÇ, B. et al., 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, n. 12, p. 3593-3597, 2008.





**3 CAPÍTULO 2**  
**ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES**  
**COMERCIALIZADOS A GRANEL E EM EMBALAGEM**  
**FECHADA: CONTAMINAÇÃO POR ORGANISMOS VIVOS**



## **ALIMENTOS EXTRUSADOS PARA CÃES COMERCIALIZADOS A GRANEL E EM EMBALAGEM FECHADA: CONTAMINAÇÃO POR ORGANISMOS VIVOS**

### **RESUMO**

Foram avaliadas a presença de sujidades leves (insetos, ácaros e pelos de roedores) e contaminação fúngica em alimentos extrusados para cães comercializados a granel e em embalagem fechada, bem como as condições ambientais de comercialização e integridade das embalagens. Ao total foram analisadas 50 amostras (25 a granel e 25 em embalagem fechada), 34% tiveram alguma sujidade detectada, sendo 30% delas em alimentos comercializados a granel. A principal sujidade encontrada foi fragmentos de insetos, 40% nas amostras a granel e 8% em embalagem fechada. Em relação à contagem total de fungos, 48% das amostras vendidas a granel apresentaram contaminação, em contrapartida com as embalagens fechadas que apresentaram apenas 28%. Como esperado, as amostras comercializadas a granel obtiveram um maior conteúdo de umidade (mc) (6,63 a 15,35%) em relação as embalagens fechadas (6,32 a 10,77%) ( $p < 0,05$ ). Já para a atividade de água (aw) não houve diferença significativa entre as duas condições de armazenagem durante a comercialização. Dos 16 comércios visitados, 4 tinham condições higiênicas sanitárias baixas com alimentos expostos ao ambiente, acesso a outros animais e local empoeirado. Com relação a integridade, todas as embalagens estavam intactas, sem perfurações e bem vedadas. Condições ambientais inadequadas, como as observadas nos alimentos a granel, associadas à falta de boas práticas de comercialização, contribuem para o aumento da presença de vetores, como roedores e insetos, além de receberem maior umidade do ambiente favorecendo a presença de fungos.

### **1. INTRODUÇÃO**

Dentre os alimentos para cães, destacam-se as rações secas extrusadas, nas quais o processo de produção com alta temperatura ( $\pm 120^\circ\text{C}$ ) seguido de secagem ( $90$  a  $180^\circ\text{C}$ ) são os principais parâmetros para a redução do conteúdo de umidade (mc), atividade de água (aw) e consequentemente a contaminação microbiológica (KRABBE, 2009).

Esses parâmetros no alimento extrusado podem afetar características da dieta e estão relacionados com a sua estabilidade, qualidade e segurança. O alimento deve ter mc e aw finais de 6% até 10% e 0,6 a 0,8, respectivamente, aumentando a vida de prateleira e fazendo com que não haja crescimento fúngico (BRITO et al., 2010; TRAN et al.,

2014; SILVA et al., 2016). Por isso, suas determinações são uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise desses alimentos, pois são as principais técnicas para prevenir ou retardar o crescimento de colônias de fungos (toxigênicos ou não) e conseqüentemente a deterioração dos alimentos (SCUSSEL, 2002; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; LIMA et al., 2013).

Apesar disso, as condições em que esses alimentos podem ser vendidos afetam os valores de umidade e, assim, modificam a qualidade e a segurança (ROOS, 2001; JOUANY, 2007; KRABBE, 2009). A deterioração por fungos é um indicador de baixa condição higiênico-sanitária de alimentos comerciais para animais de estimação e a carga total acima de  $1 \times 10^4$  UFC/ g não é recomendada (ABINPET, 2008).

Outro fator importante que afeta seriamente esses alimentos é a presença de sujidades leves como insetos, ácaros e roedores. A presença desses contaminantes é considerada um indicativo de falta de controle sanitário durante a colheita e armazenamento da matéria-prima, as condições durante processamento, bem como a eficiência no acondicionamento do produto final e sua comercialização (Lorini, 2002; DE SOUZA KOERICH & SCUSSEL, 2013).

A exposição da ração ao ambiente é um fator importante que pode comprometer sua qualidade, pois propicia o contato do alimento com insetos, ácaros e roedores (HINTON & MEAD, 1992; MACHADO et al., 2008). No que se refere às condições de venda de alimentos extrusados para animais, existe um hábito irregular de vendê-los a granel, especialmente para cães e gatos, em pequenas porções retiradas de sacos abertos (15 a 20 kg) que permanecem nas lojas durante dias até o fim do seu conteúdo.

A comercialização de alimentos vendidos dessa maneira permite a contaminação de organismos vivos, que podem estar presentes no ambiente, prejudicando a saúde do animal (SUBRAMANYAM, 2003). Apesar da legislação de sujidade leve para alimentos humanos (BRASIL, 2014), não existe um específico em alimentos para animais de estimação. No entanto, o comércio de alimentos destinados a animais de estimação (cães e gatos) através da violação da embalagem original do produto e do fracionamento do conteúdo em porções menores (a granel) é irregular perante as exigências técnicas e regulamentares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, órgão responsável pela regulamentação e fiscalização do setor de produtos destinados à alimentação animal no Brasil (BRASIL, 2007).

Considerando a falta de legislação e de informação, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de sujidades leves e a carga total

fúngica em alimentos extrusados para cães, vendidos a granel e em embalagem fechada, e sua relação com as condições ambientais de comercialização e integridade das embalagens.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: 50 amostras de alimentos comerciais extrusados para cães, sendo 25 comercializados a granel e 25 em embalagens fechadas.

Meios micológicos e reagentes: ágar batata dextrose, Kyma (Americana, Brasil) cloranfenicol, Sigma (São Paulo, Brasil) e ácido clorídrico, óleo mineral, isopropanol, Neon (São Paulo, Brasil).

Equipamentos e outros materiais: balança semi-analítica, Kern (Balingen, Alemanha), capela de fluxo laminar, Veco (Campinas, Brasil); stomacher, Marconi (Piracicaba, Brasil); estufa microbiológica, Quimis (Diadema, Brasil); contador de colônias, Phoenix (Araraquara, Brasil); bloco de aquecimento, Tecnal (Piracicaba, Brasil); cabine ultravioleta, Dist (Florianópolis, Brasil); Aqualab 4TE, Decagon (São José dos Campos, Brasil); Microscópio estereoscópico, modelo MZ-16, Wetzlar, (Berlim, Alemanha) acoplado a câmera de vídeo, modelo Image Pro-Express. Frasco armadilha Wildman (Erlenmeyer-2 L com haste metálica e tampa de borracha), Dist (Florianópolis, Brasil); Funil de Buchner (13 cm de diâmetro); peneiras granulométricas, 200 Mesh, Bertel (São Paulo, Brasil) e papel de filtro, nº4, Whatman (Maidston, Inglaterra).

Coleta e preparação de amostras: as amostras foram coletadas randomicamente em agropecuárias, pet shops e mercados, na região da Grande Florianópolis: Florianópolis, São José, Palhoça, Biguaçu). Cada amostra foi moída em moinho Romer e partes representativas de 50, 25 e 5 g foram separadas para análise de sujidades leves, carga fúngica total e umidade (mc e aw), respectivamente.

Análise de sujidades leves: foi realizada de acordo com o método AOAC internacional (2005) de flutuação (art.970.71). O método consiste em extrair a sujidade (insetos - inteiros ou fragmentos, larvas, ácaros e pelos de roedores) através da hidrólise ácida (ácido clorídrico) da amostra e da separação com base nas propriedades lipídicas-hidrofóbicas das estruturas, com posterior filtração e microscopia estereoscópica para análise do material isolado.

Carga total fúngica: as amostras trituradas foram transferidas assepticamente para sacos de polietileno onde adicionou-se água peptona (0,1%), seguida de homogeneização. De cada amostra diluída, os volumes foram inoculados em superfície de meio de cultura PDA contendo cloranfenicol (100 mg/l), depois incubados em estufa microbiológica ( $25 \pm 1$  °C, 7 dias) (Silva et al., 2010). Após esse período, as colônias desenvolvidas foram contadas e expressas em unidade formadora de colônias por g (UFC/g).

Determinação de umidade: mc - foi determinado de acordo com o método gravimétrico AOAC (2005) (art. 31.1.02). Cada amostra homogeneizada (2 g) foi colocada em um cadinho de porcelana e seca em estufa (105°C por 8 horas) até peso constante. O resultado foi determinado pela média dos resultados individuais,  $\pm$  desvio padrão relativo (DPR) e a aw - obtida por medida de porção de cada amostra (5 g) no aparelho Aqualab (25°C).

Condições de comercialização: as condições de venda e ambientais de cada amostra ao serem compradas foram avaliadas da seguinte forma: disposição dos produtos; limpeza do local, ventilação, ar condicionado; distância dos pisos, paredes e janelas; acesso de pessoas e animais; e aplicação de controle de pragas (insetos e roedores). A integridade das embalagens fechadas – com relação a presença de perfurações e eficiência de vedação dos pacotes foi analisada.

Análise estatística: os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, além disso, foi realizado o teste T-Student, para comparação dos dois grupos (a granel e embalados) em relação a umidade e carga total de fungos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Sujidades leves**

Alimentos industrializados para cães são constituídos por ingredientes à base de grãos, óleos e subprodutos de origem animal, que servem como principais fontes de carboidratos, gorduras e proteínas. Estes produtos, pela sua composição, são atrativos aos insetos e pragas que os infestam, causando perdas quantitativas e qualitativas

significantes, além de reduzirem a segurança (Haine; Pronata, 1982; Subramanyam et al., 2003; Machado et al., 2008). Os dados sobre sujidades leves, foram separados pelo total detectado, condições de venda (a granel e embalado) e pelos tipos identificados.

Em relação a sujidades leves totais, das 50 amostras analisadas, 34% tiveram alguma sujidade detectada, do total 32% tinham apenas um tipo de sujidade por amostra. No entanto, mais de um tipo de sujidade (inseto e pelo de roedor), estavam presentes em uma mesma amostra, sendo indicativo que o alimento foi exposto a roedores. A Figura 1 mostra as condições de venda e os tipos de sujidades que foram encontrados nas amostras de alimentos extrusados para cães.

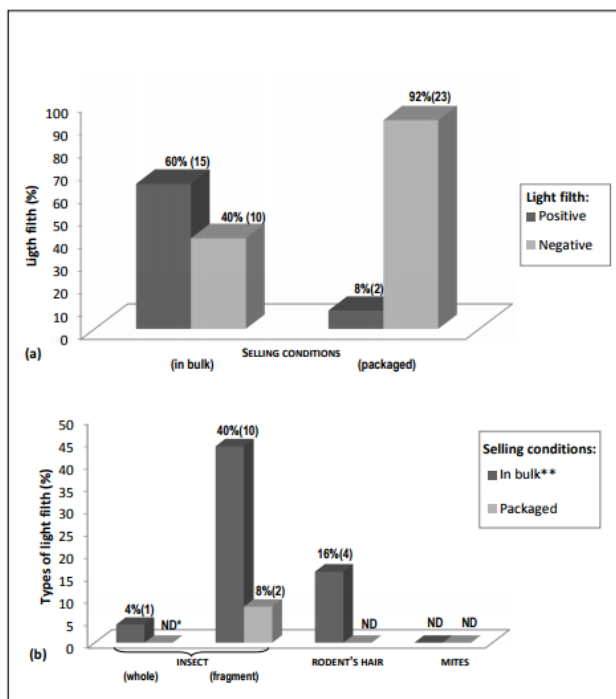


Figura 1. Porcentagem de sujidades leves detectadas em alimentos extrusados para cães vendidos a granel e em embalagem fechada: (a) total detectado e (b) tipos identificados em amostras \*ND: não detectado \*\*embalagens abertas

Já para as sujidades leves encontrada por condições de venda foram detectadas sujidades em ambas as condições, sendo 60% e 8% em alimentos vendidos a granel e em embalagem fechada, respectivamente

(Figura 1.a). A principal sujidade detectada foram fragmentos de insetos, tanto no alimento a granel (40%) quanto embalado (8%) (Figura 1.b). Essa contaminação pode ocorrer durante o processamento do alimento ou durante a armazenagem da matéria-prima. Em relação a insetos inteiros, sua presença foi detectada apenas nas amostras a granel (4%). Importante enfatizar e, é bastante preocupante, a presença de pelos de roedores, onde foram detectados em 16% (4) nas amostras vendidas a granel. Isso indica a exposição dos alimentos à urina e / ou fezes desses animais (portadores importantes da leptospirose canina). Em contraste, os ácaros, que são responsáveis por reações alérgicas em animais de estimação, não foram detectados em nenhuma amostra. A Figura 2 mostra diferentes insetos e pelos de roedores detectados nas amostras.



Figura 2. Diferentes sujidades leves detectadas em alimentos extrusados para cães comercializados (a) a granel: (a.1) inseto inteiro; (a.2) fragmento de inseto; (a.3) pelo de roedor e (b) embalagens fechadas: (b.1) e (b.2) fragmentos de inseto.

Considerando que a maior presença de sujidades foi encontrada em alimentos vendidos a granel, pode-se dizer que a exposição desse alimento ao ambiente, junto com condições higiênicas baixas e a falta de aplicação de boas práticas, permite o contato com organismos vivos, como insetos, ratos e outros animais de estimação que transitam pela loja e podem carrear bactérias. Embora uma quantidade menor de sujidades tenha sido detectada nas amostras de embalagem fechadas (8%), mostrando a eficácia da embalagem para segurança do produto, a contaminação nesse caso pode ocorrer durante seleção e armazenamento das matérias-primas, assim como durante o processamento do alimento



(falta de limpeza dos equipamentos), viabilizando a contaminação no produto final (Lorini, 2002).

Os dados deste estudo corroboram com os relatados por outros autores (BOESE, CHICOWICZ, 1995; HINTON; MEAD, 1992; LORINI, 2002; Sousa et al., 2005; DE SOUZA KOERICH, 2013). De Souza Koerich et al. (2010) investigaram a contaminação de sujidades leves em alimentos secos extrusados para cães comercializados a granel e registraram em 94% das amostras algum tipo de sujidade, especialmente fragmentos de insetos (87,5%). Embora os autores não tenham comparado alimentos a granel com embalados, eles registraram que os alimentos a granel em exposição às condições ambientais das lojas, comprometeram a qualidade e a segurança do produto. Além disso, Sousa et al. (2005) relataram maior quantidade de insetos infestando alimentos para cães, também vendidos a granel. Em um estudo de microscopia estereoscópica em alimentos para cães extrusados, Silva et al (2016) detectaram fragmentos de insetos, embora em pequena quantidade, em alimentos comercializados embalados, mostrando que a contaminação também ocorre durante o armazenamento das matérias-primas ou processamento. A higiene e a implementação de boas práticas de fabricação durante a produção, armazenamento e comercialização de alimentos são importantes ferramentas para garantir a qualidade (LAZZARI, 1997).

A legislação brasileira não estabelece limites para sujidades leves em alimentos para cães. No entanto, um alimento com alto índice de sujidade pode indicar sua exposição a baixas condições sanitárias durante o processamento e comercialização afetando a saúde dos animais que o consomem. Se comparado os dados atuais com a legislação para alimentos humanos (materiais macro e microscópicos nocivos), as sujidades leves identificadas nos alimentos para cães devem ser consideradas prejudiciais também à sua saúde, pelo fato de serem vetores mecânicos para contaminantes como fungos, vírus e bactérias (BRASIL, 2014).

### 3.2 Contagem total de fungos e umidade

Os fungos são capazes de crescer em todos os tipos de alimentos como cereais, frutas, vegetais, gorduras e seus produtos. O desenvolvimento desses microrganismos pode resultar em diferentes deteriorações dos alimentos - produzindo aromas, descoloração, toxinas, podridão e formação de propágulos patogênicos ou alérgicos (FILTENBORG et al., 1996; COPETTI, 2005).

A avaliação da contagem total de fungos tem sido um bom indicador de condições sanitárias de alimentos comerciais para animais de estimação. Os danos causados por fungos geralmente estão relacionados a perdas nutricionais de matérias-primas e à deterioração de produtos finais (DE SOUZA KOERICH, 2013). Os alimentos expostos ao meio ambiente também favorecem a absorção de umidade aumentando  $m_c$  e  $a_w$ , contribuindo assim para o crescimento fúngico. Com relação à carga total de fungos presentes nas amostras de alimentos para cães, este estudo mostrou que alimentos vendidos a granel tinham alto número de amostras positivas (48%) quando comparadas aos embalados (28%), conforme Tabela 1. Os níveis de contaminação variaram de 1 a  $4 \times 10^4$  UFC/g, com os níveis mais altos detectados nos alimentos a granel, expostos à absorção de umidade do ambiente, corroborando com pesquisas anteriores (MACHADO et al., 2008; DE SOUZA KOERICH, 2013). É importante ressaltar que no Brasil não existe limite de contagem fúngica estabelecido oficialmente para alimentos destinados a animais de estimação. A ABINPET (2008), uma associação que orienta os produtores de alimentos para esses animais, recomenda que a carga total não exceda  $1,0 \times 10^4$  UFC/g. Todas as amostras analisadas estavam abaixo do limite recomendado pela ABINPET.

Como esperado, as amostras vendidas a granel apresentaram maior  $m_c$  (6,63 a 15,35%) do que as embaladas (6,32 a 10,77%) ( $p < 0,05$ ). Em relação a  $a_w$ , variou de 0,4529 a 0,7763 e 0,4426 a 0,6896, para as amostras a granel e embaladas, respectivamente (Tabela 1) e não diferiram entre si. O  $m_c$  e  $a_w$  dos alimentos extrusados podem afetar suas características e estão relacionados à estabilidade, qualidade e segurança. Vários estudos relacionaram o desenvolvimento de fungos com armazenamento incorreto com alta umidade e temperatura (PASANEN et al., 1990; ANDRADE; LEISTNER, 1994; NASCIMENTO, 2005; BRITO et al., 2010; GIRIO et al., 2012).

Tabela 1. Contagem total fúngica e umidade em alimentos extrusados para cães vendidos a granel e em embalagem fechada

Alimento extrusado		Contagem total <sup>a</sup> (UFC/g)	Umidade	
Venda	Estatística		conteúdo <sup>b</sup> (%)	aw <sup>c</sup>
<i>A granel*</i>				
Total positivo/total		12/25	NA <sup>d</sup>	NA
Variação		0,1x10 <sup>2</sup> -0,4x10 <sup>2</sup>	6,63-15,35	0,4529-0,7763
Média		2x10	9,20	0,5688
SD <sup>e</sup>		1,1874	1,88	0,07
RSD <sup>f</sup> %		129,0689	20,46	12,45
<i>Embalagem fechada</i>				
Total positivo/total		07/25	NA	NA
Variação		0,1x10 <sup>2</sup> - 0,2x10 <sup>2</sup>	6,32-10,77	0,4426-0,6896
Média		1x10	7,99	0,5353
SD <sup>e</sup>		0,589	1,42	0,055
RSD <sup>f</sup> %		157,95	17,74	10,27

<sup>a</sup>Contagem total fúngica <sup>b</sup>conteúdo de umidade <sup>c</sup>atividade de água <sup>d</sup>não aplicável, edesvio padrão; <sup>f</sup>desvio padrão relativo

### 3.3 Condições ambientais e de venda

Quanto ao ambiente das lojas e características de condições de venda, de onde as amostras a granel e embaladas foram coletadas, os parâmetros investigados foram os seguintes: o local de armazenamento de alimentos (longe do chão/paredes/janelas, em prateleiras, empilhadas no chão), longe da luz solar e do contato de proprietários e animais, temperatura do ambiente (ventilação/ar condicionado), entre outros. Os dados estão na Tabela 2 e na Figura 3.

(a) Condições ambientais do local: das lojas com venda de alimentos a granel visitadas 25% apresentaram condições ambientais baixas de higiene como piso sujo, ambiente empoeirado, sem ventilação e animais no local. O alimento exposto a esse ambiente, com acesso a outros animais e sem qualquer proteção, contribui para a alta contaminação de sujidades leves, absorção de umidade e crescimento fúngico comprometendo a qualidade e segurança (MAGAN; ALDRED, 2007). Em relação ao controle de pragas, este foi observado em todos os estabelecimentos pesquisados.

Já para os locais com venda de embalagem fechada, os dados mostraram que em todas as lojas pesquisadas que vendiam alimentos embalados, estes estavam dispostos em prateleiras e protegidos da luz solar. Em 25% das lojas o alimento estava perto de paredes e e 31,5% longe, evitando assim a umidade. Importante enfatizar que apenas 12,5% das lojas não vendiam alimentos a granel. Observou-se que, nas lojas com alimentos embalados, havia mais foco na limpeza do ambiente.

(b) Condições de venda: em 25% das lojas visitadas o alimento a granel estava exposto na própria embalagem em cima de paletes (sem proteção de retenção), expostos ao meio ambiente e com acesso a outros animais. Outra maneira registrada, estava na própria embalagem, no entanto, mantida dentro de caixas de madeira com uma abertura superior com tampa, evitando assim o contato com o meio ambiente e animais. Em 12,5% dos comércios visitados, o alimento foi encontrado sem a embalagem original, vendido diretamente em caixas de madeira com abertura superior.

Com relação aos alimentos comercializados em embalagens fechadas, estes podem ser armazenados por um longo período de tempo (aproximadamente 12 meses) e, por esta razão, tanto o local de armazenamento quanto o material em que os alimentos são embalados devem receber atenção especial dos fabricantes, comércio e proprietários desses animais. A embalagem para alimentos secos extrusados para cães deve ter barreira contra a luz, gordura, umidade e gases, tudo para garantir propriedades nutricionais e manter o alimento protegido contra microrganismos (LIMA, 2015). O formato e os materiais devem fornecer proteção adequada do produto para minimizar a contaminação e evitar danos. O que pode acontecer é a perfuração desses pacotes para melhor acomodação desses alimentos quando empilhados, por aquele que transporta ou no estabelecimento (mercado de varejo) (DE SOUZA KOERICH, 2013). Em relação à integridade das embalagens, todas as amostras pesquisadas não apresentaram perfurações e estavam bem seladas; evitando a entrada de insetos, aumento de umidade e esporos de fungos, garantindo qualidade e segurança ao consumidor final.

Tabela 2. Condições de venda dos alimentos comercializados para cães - vendidos a granel e em embalagem fechada no mercado

Venda	Alimento extrusado Condições de armazenagem	Lojas	
		N	(%)
<i>A granel</i>			
[A]	Alimento na sua embalagem original <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protegido por caixa de vidro aberta</li> <li>• Longe da luz solar, mas próximo a paredes</li> <li>• Pouca ventilação, sem uso de ar-condicionado, local limpo</li> </ul>	2	12,5
[B]	Alimento na sua embalagem original <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exposto ao ambiente</li> <li>• Em cima de pallets, próximo a parede</li> <li>• Acesso de animais ao alimento</li> <li>• Baixa condição de higiene</li> <li>• Pouca ventilação, sem janelas e ar-condicionado</li> </ul>	4	25
[C]	Alimentos em caixa de madeira <ul style="list-style-type: none"> <li>• Longe de luz solar e paredes</li> <li>• Local com ventilação, se ar-condicionado</li> </ul>	2	12,5
<i>Embalagem fechada</i>			
[A]	Embalagens dispostas em prateleiras <ul style="list-style-type: none"> <li>• Longe de parede e luz solar</li> <li>• Sem comercialização a granel</li> <li>• Janelas e portas próximas, ar-condicionado, ambiente limpo</li> </ul>	5	31,5
[B]	Embalagens dispostas em prateleiras <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perto de paredes, longe da luz solar</li> <li>• Janelas fechadas, ar-condicionado, ambiente limpo</li> </ul>	3	18,75
<b>Total visitado</b>		<b>16</b>	

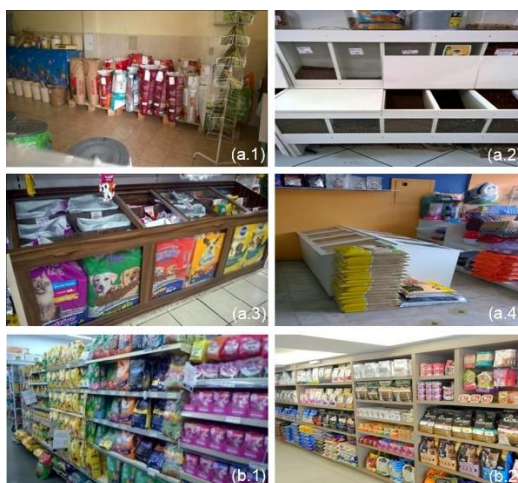


Figura 3. Características de condições de venda, de amostras (a) granel e (b) embalagens fechadas.

#### **4. CONCLUSÃO**

A venda a granel pode gerar riscos à nutrição saudável dos animais, uma vez que o alimento fica em contato com o ar, luz e exposto ao acesso de roedores, insetos e vulnerável a contaminação fúngica. Todos esses fatores comprometem a estabilidade de nutrientes e podem alterar o sabor e o odor originais e permitir a contaminação do produto. As condições ambientais inadequadas, como as observadas nos alimentos comercializados a granel, juntamente com a falta de boas práticas de venda, contribuem para o aumento da umidade e presença de carreadores de fungos como roedores e insetos. Diferente das condições dos alimentos comercializados em embalagens fechadas, onde todos os pacotes estavam intactos, sem perfurações e bem selados.

## REFERÊNCIAS

ABINPET. 2008. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Manual do programa integrado de qualidade pet - PIQPET. 2.ed. São Paulo.

AQUINO, S; POTENZA, M.R. Análise da microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 80, p.243-247, 2013.

ANDRADE, R.M; NASCIMENTO, J.S. Presença de fungos filamentosos em ração para cães comercializadas na cidade de Pelotas – RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, n. 72, p. 10-12, 2005.

AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg (MD).

BOESE, J.L; CHICOWICZ, S.M. Extraneous materials: Isolation. In: Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16ed. Arlington, V.A. AOAC, n.16, p.1-47, 1995.

Brazil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 31 de março, 2014.

Brazil. MAPA. Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2007. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.

BRITO, C.B.M; FÉLIX, A.P; JESUS, R.M; FRANÇA, M.I; OLIVEIRA, S.G; KRABBE, E.L; MAIORKA, A. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, n.159, p.150–155, 2010.

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

COPETTI, M.V. **Avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos e potencial micotoxigênicos de espécies selecionadas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DE SOUZA KOERICH, K; SIMAO, V; SCUSSEL, V.M. 2010. Evaluation of dogs and cats pathologies and their relation to mycotoxins. In: ANNUAL WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 2010, Geneve. Anais [...] Geneve: WSAVA, 2010. p.100.

DE SOUZA KOERICH, K; SCUSSEL, V.M. Dogs and birds dryfood fumonisin FB1 and FB2 contamination and their relation to ingredients and packaging characteristics. **Research Journal of Biological Sciences**, n.8, p.22-29, 2013.

FILTENBORG, O; FRISVAD, J.C; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, n. 33, p. 82-85, 1996.

GIRIO, T.M.S; NADER FILHO, A; ROSSI JUNIOR, O.D. Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel. **Ars Veterinaria**, n.28, p.36-40, 2012.

GREDILHA, R; SAAVEDRA, P.R; GUERIM, L; LIMA, A.F; SERRA-FREIRE, N.M. Ocorrência de *Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus, 1758 (Coleoptera:Ccujidae) e *Necrobia rufipes* De Geer, 1775 (Coleoptera:Cleridae) infestando rações de animais domésticos. **Entomología y Vectores**, n.12, p. 95-103, 2005.

HAINES, C.P; PRONATA, R.J. Survey on insects and arachnids associated with stored products in some parts of Java. In: WORKSHOP ON GRAINS POST-HARVEST RESEARCH AND DEVELOPMENT PROGRAMME, 1989, Laguna. **Anais** [...] Laguna: Teter; 1982, p.17-48.



HINTON, M; MEAD, G.C. Bacterial pathogens in animal feed and their control. **World's Poultry Science Journal**, n. 48, p. 72-73, 1992.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, n.137, p. 342-362, 2007.

KRABBE, E.L. Controle da atividade de água e produção de alimentos secos e semi-úmidos. In: I CONGRESSO INTERNACIONAL E VIII SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - CBNA. 2009, Campinas – SP. **Anais [...]**. Campinas: CBNA, 2009.

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

LEISTNER, M; AGUILERA, J.M; CHIRIFE, J. Combined methods for the preservation of foods: in Latin America and the CYTED-D project. **Journal of Food Engineering**, n. 22, p. 433-444, 1994.

LIMA, D.C. **Conservação de alimentos extrusados para cães**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

LIMA, D.C; FELIX, A.P; SILVA, J.R; ANTICO, L.P; GARBELLOTTI, A; OLIVEIRA, S.G. Estabilidade da atividade de água em alimentos extrusados para cães e gatos. In: V CONGRESSO INTERNACIONAL E XII SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - CBNA. 2013. Campinas – SP. **Anais [...]**. Campinas: CBNA, 2013.

LORINI, I. **Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados**. In: Lorini, Miike, Scussel, Armazenagem de Grãos. Cap. 7, Ed. Biogeneziz, Campinas SP, p.381-397, 2002.

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

PHILLIPS, T.W; JIANG, X.L; BURKHOLDER, W.E; PHILLIPS, J.K; TRAN, H.Q. Behavioral responses to food volatiles by two species of stored – product coleoptera, *Sitophilus oryzae* (Curculionidae) and

*Tribolium castaneum* (Tenebrionidae). **Journal of Chemical Ecology**, n.9, p.723-734, 1993.

ROOS, Y.H. **Water activity and plasticization**. Food Shelf Life Stability: chemical, biochemical and microbiological changes. United States of America, 1991.

SCUSSEL, V.M. Fungos em grãos armazenados. In: Qualidade de arroz na pós-colheita (I. Lorini and M.C. Elias, eds.) p. 79, UFPEL, Abrapós, Pelotas, RS, 2002.

SILVA, J.R; SOARES, C.E; KREIBICH, H.H; PEREIRA, M.N; MARIA, G.S; RUNTZEL, C.L; SCUSSEL, V.M. Ozone gas effect on water activity conditions during extruded food storage and fungi spores inactivation. In: CONTROLLED ATMOSPHERE AND FUMIGATION ON STORAGE PRODUCTS. 2016. India. **Anais [...]**. India, New Dehli, p.235.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H; SANTOS, R.F.S; GOMES, R.A.R **Manual de métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. (4.ed), p. 624 São Paulo, Varela, 2010.

SOUSA, J.M. Monitoramento de insetos em grãos de milho e feijão e em rações comercializadas em Recife, PE. **Revista Brasileira de Armazenamento**, n.30, p.186-191, 2005.

SUBRAMANYAM, R.B. et al. Stored-product insects associated with a retail pet store chain in Kansas. **Journal of Economic Entomology**, n.96, p.1958-1966, 2003.

TRAN, Q.D; HENDRIKS, W.H; VAN DER POEL, A.F. Effects of extrusion processing on nutrients in dry pet food. **J. Sci. Food Agric.**, n. 88, p.1487-1493, 2014.

**4 CAPÍTULO 3**  
**EFEITO ANTIFÚNGICO DO GÁS OZÔNIO EM ALIMENTOS**  
**EXTRUSADOS CONTAMINADOS COM *Aspergillus flavus* PARA**  
**CÃES**



# EFEITO ANTIFÚNGICO DO GÁS OZÔNIO EM ALIMENTOS EXTRUSADOS CONTAMINADOS COM *Aspergillus flavus* PARA CÃES

## RESUMO

A descontaminação de esporos de *Aspergillus flavus* inoculados em alimentos extrusados (tipo Standard e Super-Premium), através do ozônio (O<sub>3</sub>) gasoso, foi investigada em diferentes concentrações (40 e 60 µmol/mol) e tempos (30, 60 e 120 min) de exposição. A eficiência antifúngica do gás, umidade e estabilidade lipídica foram avaliadas antes e após os tratamentos. O O<sub>3</sub> reduziu os esporos de *A. flavus* dos alimentos extrusados, nos dois tipos ( $p < 0,05$ ). A maior redução (98,3%) foi observada para ambos os tipos de alimentos, quando o gás foi aplicado por 120 min, independentemente da concentração de O<sub>3</sub>. Quanto ao índice de umidade e peróxido, não houve diferença, antes ou após a aplicação do gás para todas as condições dos tratamentos. O gás O<sub>3</sub> pode ser um método eficiente para o controle da contaminação de esporos durante a comercialização de alimentos extrusados em sacos abertos expostos ao meio ambiente.

## 1. INTRODUÇÃO

A relação entre seres humanos e animais de estimação nunca esteve tão próxima, o que levou os proprietários de animais a procurarem alimentos que, além de satisfazer suas necessidades nutricionais, também proporcionam longevidade, bem-estar e saúde (BOERMANS e LEUNG., 2007; SILVA et al., 2016). A tecnologia de extrusão é comumente aplicada em ração seca comercial e é considerada um processo de alta temperatura ( $\pm 150^{\circ}\text{C}$ ) e curta duração (1-2 min), combinado com pressão (37 atm) e umidade (30%) (KRABBE, 2009; SPEARS E FAHEY, 2004; TRAN, HENDRIKS e VAN DER POEL 2008).

Um dos fatores de risco para a segurança alimentar dos animais é a presença de fungos e contaminação por toxinas. Isso pode ocorrer a partir da matéria-prima usada na produção de ração seca (principalmente grãos - arroz, milho, trigo, soja), o próprio processamento ou armazenamento do produto final. No entanto, depois que a embalagem é aberta em casa, ou mesmo durante a comercialização de porções em sacos abertos, essa contaminação também pode ocorrer (DE SOUZA KOERICH et al., 2013; LEUNG, DIAZ-LLANO e SMITH, 2006; SANTIN et al., 2000).

É importante enfatizar que a temperatura alcançada durante o processo de extrusão, é eficaz para que os esporos de fungos presentes na mistura de ingredientes brutos sejam destruídos. Apesar disso, a maneira como o alimento é comercializado (selado ou em sacos abertos) pode promover a contaminação por fungos (SILVA et al., 2016). A venda de alimentos a granel, praticada no Brasil e em outros países, pode causar contaminação por esporos presentes no ar, além do aumento de umidade promovido pelo ambiente, permitindo o crescimento desses microrganismos (DE SOUZA KOERICH e SCUSSEL, 2013).

A contaminação por fungos pode levar a perdas econômicas associadas à redução de nutrientes e palatabilidade. Além disso, a presença de micotoxinas também afeta a saúde animal e humana (SAVI, PIACENTINI e SCUSSEL, 2015). O *Aspergillus flavus* é um contaminante de alimentos para animais e humanos, sendo este fungo filamentosos o principal e mais relatado em alimentos para animais de estimação (MOSS, 1998; RUMBEIHA, 2000; SCUSSEL, 2017). Este fungo também é responsável pela produção de aflatoxinas (AFLs: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>). Os sinais de seus efeitos tóxicos dependem do grau de contaminação dos alimentos e também do tempo de exposição, quantidade de alimento ingerido pelo animal e seu estado nutricional (MALLMANN, 2001; GAZZOTTI et al., 2015). Os cães são extremamente sensíveis a este grupo de toxinas, sendo o fígado o seu principal alvo (MUZOLON, 2008). Assim, é necessário controlar ou reduzir a contaminação toxigênica por *A. flavus*.

Vários estudos sobre descontaminação de fungos têm sido relatados utilizando o ozônio (O<sub>3</sub>) como agente oxidante em diferentes alimentos, como frutas (OZKAN, SMILANICK, e KARABULUT, 2011; ZOERLUNGENÇ et al., 2008), grãos (BEBER-RODRIGUES, SAVI, e SCUSSEL, 2015; CHRIST et al., 2017; SAVI, PIACENTINI E SCUSSEL 2015), cacau (KREIBICH et al. 2016) e castanha do Brasil (GIORDANO, NONES E SCUSSEL, 2012). Entretanto, em alimentos processados, há poucos estudos, especificamente sobre queijo (CHRIST, SAVI e SCUSSEL, 2016; SERRA et al., 2003), e nenhum sobre alimentos extrusados.

A Food and Drug Administration dos EUA classificou o O<sub>3</sub> como seguro (GRAS) (Food and Drug Administration de 1982) para ser usado em água engarrafada e processamento de alimentos (GRAHAM, 1997). Além disso, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 1996) reconhece as características potentes de desinfecção do O<sub>3</sub>.

As condições de venda de alimentos para animais deixam muito a desejar em alguns países. Pequenas porções em sacos abertos (15/20 kg) que permanecem na loja por dias contribuem para o desenvolvimento e crescimento fúngico. Este trabalho investigou a possibilidade de utilizar uma forma de pré-tratamento para criar um efeito duradouro sobre o produto, neste caso a exposição ao O<sub>3</sub> gasoso. O trabalho aqui apresentado estudou a descontaminação em alimentos extrusados inoculados com *A. flavus* afim de garantir maior proteção no armazenamento e distribuição do produto.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**Amostra:** foram utilizados alimentos secos para cães extrusados, de tipo Standard (composição variável e baixo custo) e Super Premium (formulação balanceada, ingredientes de alta qualidade e digestibilidade, alto custo). Embalagens de 6 kg.

**Cepa fúngica:** *A. flavus* obtido da coleção de micologia do Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

**Equipamento:** gerador de gás O<sub>3</sub>, descarga corona (5 a 60 µmol/mol), Interzone (Jundiaí, SP, Brasil); removedor de impurezas, Ouro Peças (Alvorada, RS, Brasil); medidor de vazão, Protec (São Paulo, SP, Brasil). Para os testes micológicos, os equipamentos necessários foram os seguintes: autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brasil); stomacher, Marconi (Piracicaba, SP, Brasil); incubadora microbiológica e cabine de exaustão, Quimis (Diadema, SP, Brasil); capela de fluxo laminar, Veco (Campinas, SP, Brasil); Câmara Neubauer, HBG (Jacareí, SP, Brasil) e Aqua-Lab, modelo 4TE, Decagon Devices (São José dos Campos SP, Brasil). Microscópio eletrônico de varredura, JEOL (Peabody, MA, EUA), revestidor de ouro (Au), modelo SCD500, Leica (Leider, IL, EUA) e estereoscopia, Opticam (São José dos Campos, SP, Brasil). Silos piloto (n = 7), 250 × 100 mm (comprimento × diâmetro, respectivamente) feito de policloreto de vinil, contendo duas aberturas (inferior: para entrada de gás e superior: para saída de gás) e tampa.

**Meios de cultura e produtos químicos:** ágar dextrose de batata (PDA) e peptona, Himedia (Curitiba, PR, Brasil); cloranfenicol, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA); tiossulfato de sódio, sódio sulfato, ácido acético, hexano e clorofórmio, Neon (São Paulo, SP, Brasil).

Inoculação dos fungos nas amostras: uma solução de Tween 80 (contendo  $6 \times 10^3$  esporos/ml de *A. flavus*) foi previamente preparada, os esporos foram contados através da câmara de Neubauer e pulverizados (10 ml) em porções de alimentos extrusados (25 g cada), e então deixados para secar assepticamente.

Grupos de silos: os silos foram preenchidos com o alimento extrusado (200 g) para a aplicação de gás O<sub>3</sub>. Eles foram divididos em dois grupos principais - controle (GC: não tratado com gás) e tratados (TGI e TGII para concentrações de 40 e 60 µmol/mol, respectivamente, n = 2) e três tempos de exposição (30, 60 e 120 min, n = 2).

Aplicação de gás O<sub>3</sub>: o procedimento foi realizado de acordo com Giordano, Nones e Scussel (2012) com pequenas modificações. Primeiramente, a bomba de ar comprimido (conectada a um removedor de impurezas do ar) levou o gás O<sub>3</sub> (previamente calibrado a atingir concentrações de 40 e 60 µmol/mol) para os silos, através da abertura de entrada uma vazão de 1 L/min) e deixe fluir por três tempos de exposição (30, 60 e 120 min). O GC recebeu apenas ar ambiente. A medição da concentração de gás O<sub>3</sub> foi obtida pelo teste de titulação de iodo, a partir da saída do gerador O<sub>3</sub>. O gás foi borbulhado numa solução de iodeto de potássio (50 mL) e acidificado com ácido sulfúrico 1 N (2,5 ml) a pH abaixo de 2,0. A solução foi titulada com tiossulfato de sódio 0,005N usando uma solução de amido como indicador (APHA 1999; CHRIST, SAVI e SCUSSEL, 2016). As amostras foram coletadas assepticamente para análise (carga total de fungos, umidade mc/aw e índice de peróxido) após 48 h do tratamento com gás.

Análise para verificar o efeito do gás O<sub>3</sub>: carga total de fungos: amostras, antes e depois dos tratamentos com O<sub>3</sub>, tiveram a carga total de esporos fúngicos testada pela técnica de enumeração (Silva et al. 2010). Resumidamente, CG e cada amostra TG (TGI e TGII) (25 g) coletada foi adicionada de peptona a 0,1% (225 ml) sob condições estéreis, agitadas em um agitador rotativo (2 min) e as diluições (10-1, 10-2, 10-3 e 10-4) preparadas. Alíquotas de cada diluição (0,1 ml) foram espalhadas (n = 2) na superfície do PDA contendo cloranfenicol (100 mg/l) e incubadas por 7 dias a 28°C. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g). Umidade (mc) foi determinada pelo método gravimétrico 31.1.0232 da AOAC (2005). A atividade de água (aw) foi obtida medindo cada amostra no aparelho AquaLab a 25°C (n = 3)



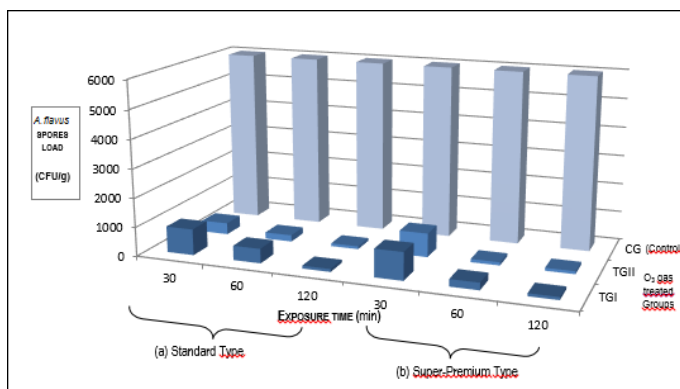
(Decagon, 2007). Índice de peróxido foi realizado de acordo ao método BCAF (1998), onde 50 g de amostra foram adicionado a 10 g de sulfato de sódio e 150 ml de clorofórmio. Depois de agitar, filtrou-se usando um papel filtro e 25 ml foram colocados em cápsula de porcelana que permaneceu em aquecimento até a evaporação, e depois foi armazenado em um forno por até 40 min a 105°C. Então, 37 ml de ácido acético foram adicionados e colocados por 1 min na ausência de luz. Finalmente, 30 ml de água foram adicionados e titulados com solução de tiosulfato de sódio usando 1% de solução de amido como indicador.

Análise estatística: os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA). Os resultados foram apresentados como média e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Efeito do gás $O_3$ na carga total de esporos de *A. flavus*

Observou-se que o  $O_3$  reduziu eficientemente a carga de esporos de *A. flavus* em alimentos extrusados. Variando de 85,0 a 98,3% para o alimento Standard e de 84,0 para 98,3% para o Super Premium. A maior redução (98,3%), de  $6 \times 10^3$  (após a inoculação dos esporos) para  $1 \times 10^2$  UFC/g (após 48h), foi observada para ambos os tipos de alimentos ao aplicar esse gás durante 120 min, independentemente da concentração de  $O_3$  (40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$ ). As menores reduções (84,0 e 85,0%) foram no tempo de exposição de 30 min e concentração de 40  $\mu\text{mol/mol}$ , nos tipos Standard e Super-Premium, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Efeito da aplicação de ozônio ( $O_3$ ) (concentração: 40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$ ; tempo de exposição: 30, 60 e 120 min) na inativação de esporos de *Aspergillus*

*flavus* em alimentos secos extrusados contaminados: (a) Standard e (b) tipos Super-premium [Grupos: CG (Controle), TGI (40  $\mu\text{mol} / \text{mol}$ ) e TGII (60  $\mu\text{mol}/\text{mol}$ )].

Os resultados corroboram com Kreibich et al. (2016), que relataram redução de *A. flavus* na concentração de  $\text{O}_3$  de 60  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  em cacau (*Theobroma cacao* L.), embora em maior tempo de exposição (180 min). Semelhante ao presente estudo, Savi et al. (2015) mostraram que a carga de *A. flavus* começou a reduzir em 40  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  (30 min), porém alcançando uma inativação total em 60  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  após 180 min. Com relação aos alimentos processados, um estudo avaliou a eficácia do  $\text{O}_3$  no meio ambiente e na superfície do queijo curado, na concentração de 3-10  $\mu\text{mol}/\text{mol}$ , o que resultou em uma redução de 96% dos fungos do ar em salas de maturação. A aplicação de menores concentrações de  $\text{O}_3$  (0,2 a 0,3  $\mu\text{mol}/\text{mol}$ ) foi suficiente para obter uma redução significativa dos esporos, sem modificação das características sensoriais da superfície do queijo (GIBSON, ELLIOT e BECKETT, 1960; SERRA et al., 2003).

A inativação de microrganismo por  $\text{O}_3$  ocorre em um processo complexo, onde o gás atinge vários diferentes constituintes celulares (esporos, membranas celulares e citoplasma) (HUNT e MARINAS, 1997; CHRIST, SAVI e SCUSSEL, 2016). A maioria dos estudos de descontaminação por  $\text{O}_3$  em alimentos (principalmente em grãos) relatou seus efeitos na contagem total de fungos, com o objetivo de reduzir ou inativar qualquer colônia de fungos ou carga de esporos presentes nos alimentos (CHRIST et al. 2017; MCDONOUGH et al. 2011 SAVI et al., 2014; SAVI, PIACENTINI e SCUSSEL 2015). Este é o primeiro estudo de contaminação em alimentos altamente ricos em carboidratos, processados por extrusão e com lipídios.

### **Efeitos do gás $\text{O}_3$ na umidade dos extrusados e na estabilidade lipídica**

#### Umidade:

Em relação aos parâmetros de mc e aw registrados antes e após os tratamentos com o gás (Grupos: GC, TGI e TGII), os dados não mostraram diferenças entre eles ( $p > 0,05$ ), para as concentrações de gás (40 e 60  $\mu\text{mol} / \text{mol}$ ) ou para o tempo de exposição (30, 60 e 120 min), ou para as condições aplicadas (Tabela 1). Isso aconteceu provavelmente porque o revestimento lipídico de ração pode controlar a liberação e a absorção de umidade, agindo como uma barreira.

Os resultados de umidade no presente estudo corroboram com os encontrados por Silva et al. (2016), que aplicaram concentrações de gases e tempos de exposição semelhantes para verificar o comportamento da umidade, sem diferença entre os tratamentos. Os autores também relataram um mc de 8,85%, antes da aplicação de O<sub>3</sub>, e 7,99% depois. O mesmo ocorreu para aw (0,628 a 0,580). Aplicando as condições de O<sub>3</sub> no presente estudo, os parâmetros mc e aw permaneceram abaixo do máximo recomendado, sendo seguro para evitar o crescimento fúngico.

A aplicação de gás para controlar os parâmetros de umidade também foi relatada por diferentes autores em alimentos não processados (BEBER-RODRIGUES, SAVI e SCUSSEL 2015; GIORDANO et al. 2014; KREIBICH et al. 2016). Beber-Rodrigues et al. (2015) registraram os efeitos do O<sub>3</sub> na microbiota de arroz e na distribuição de umidade (mc e aw), para aumentar a segurança durante o armazenamento desse cereal. Das três diferentes concentrações de O<sub>3</sub> (10, 20 e 40 µmol / mol) aplicadas por apenas 1,6 min da vazão de gás O<sub>3</sub> ao longo de 30 min de repouso, o mc e o aw apresentaram pequenas reduções de 12,03 a 11,61% e 0,670 a 0,630, respectivamente.

Por outro lado, aplicando o fluxo de O<sub>3</sub> a longo prazo em castanha-do-brasil com casca, os parâmetros de umidade foram reduzidos (3,97%), que manteve as condições de armazenamento e evitou o crescimento de fungos, inclusive melhorando a crocância da castanha do Brasil (GIORDANO e SCUSSEL, 2008). A aplicação de O<sub>3</sub>, nas concentrações e tempos aplicados no presente estudo, manteve os parâmetros de umidade estabelecidos como seguros pela indústria para ração seca extrusada, uma vez que o mc e o aw devem ser menores que 10% e 0,60. Assim, a aplicação inibiu o crescimento de microrganismos (KRABBE 2009; ROKEY, PLATTNER e DE SOUZA 2010; SILVA et al. 2016; TRAN, HENDRIKS e VAN DER POEL 2008). É importante enfatizar que a redução excessiva desses parâmetros pode afetar a palatabilidade dos alimentos para esses animais e não deve ser inferior a 7% e 0,40 (mc e aw, respectivamente) (BRITO et al. 2010).

#### Lipídios:

A maioria dos alimentos extrusados para cães é submetido a aplicações de óleo, gordura e palatilizantes pós-extrusão (RIAZ 2003; ROKEY, PLATTNER e DE SOUZA 2010). Eles são geralmente adicionados na camada externa do croquete (revestimento), pois ficam mais atraentes para os animais (FÉLIX et al. 2010). Além disso, eles também desempenham funções importantes na alimentação dos cães, como fonte de energia, ácidos graxos essenciais, *flavor* e controlador de

umidade, agindo como uma barreira, o que dificulta a liberação e a absorção de umidade.

Os alimentos extrusados para cães têm classificações diferentes de acordo com sua qualidade e digestibilidade do ingrediente. Eles podem ser simples, como Standard, ou conter ingredientes diferenciados com alto valor digestível, como os tipos Super-Premium. O percentual lipídico em alimentos extrusados do tipo Standard é menor (9%) do que o tipo Super Premium (15%), distribuído no revestimento e no interior da ração (CARCIOFI et al. 2009).

Portanto, é importante verificar se o gás  $O_3$  afeta a qualidade lipídica. No presente estudo, felizmente, o gás não afetou a estabilidade lipídica da amostra (Tabela 1). Os dados foram mantidos semelhantes, antes e depois de todos os tratamentos com  $O_3$  (concentração e variações de tempo) comparados com o controle (CG). Embora esses tipos de alimentos tenham um revestimento de óleo adicional, e o  $O_3$  sendo um gás oxidativo, nenhuma alteração foi detectada.

Estudos semelhantes com castanha-do-brasil com casca (alta em lipídios - 60-70%), não mostraram nenhuma mudança na estabilidade do óleo do alimento após uma aplicação de  $O_3$  (10  $\mu\text{mol/mol}$ ) por 90 min (SCUSSEL et al. 2011). Savi et al. (2014) relataram que os resultados de peroxidação lipídica não mostraram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre o grupo controle e as amostras de trigo tratadas com  $O_3$  (60  $\mu\text{mol/mol}$  por 180 min).

O uso de  $O_3$  gasoso em grãos de cacau também não afetou a estabilidade lipídica. A análise foi repetida após 30 dias de armazenamento, e as amostras não apresentaram desenvolvimento de rancidez (KREIBICH et al. 2016).

Tabela 1. Efeito do tratamento do gás ozônio em alimentos extrusados de dois tipos Standard e Super-Premium - umidade e índice de peróxido

Alimento seco extrusado		Tratamento gás O <sub>3</sub> <sup>a</sup>		Umidade (média) <sup>b</sup>				Índice de peróxido	
Tipo	Grupo	Conc. (μmol/mol)	Tempo exposição (min)	mc <sup>c</sup>		a <sub>w</sub> <sup>d</sup>			
				AT <sup>e</sup> (%)	Variacão (%)	AT	Variacão (%)		
STANDARD (mc: 9,85% a <sub>w</sub> : 0,5402)*	TGI <sup>f</sup>	40	30	9,89	-0,4	0,5497	-0,95	N <sup>g</sup>	
			60	10,00	-1,5	0,5455	-0,53	N	
			120	10,10	-2,5	0,5501	-0,99	N	
	TGI <sup>h</sup>	60	30	9,90	-0,5	0,5510	-1,08	N	
			60	9,95	-1,0	0,5545	-1,43	N	
			120	10,01	-1,6	0,5498	-0,96	N	
	CG <sup>i</sup>	NA <sup>j</sup>	30	9,77	0,8	0,5326	0,76	N	
			60	9,90	-0,5	0,5363	0,39	N	
			120	9,83	0,2	0,5362	0,40	N	
	SUPER-PREMIUM (mc: 8,98% a <sub>w</sub> : 0,5602)*	TGI	40	30	8,69	2,9	0,5599	0,03	N
				60	8,75	2,3	0,5588	0,14	N
				120	8,67	3,1	0,5578	0,24	N
TGH <sup>i</sup>		60	30	8,98	0,0	0,5540	0,62	N	
			60	8,88	1,0	0,5565	0,37	N	
			120	8,71	2,7	0,5561	0,41	N	
CG		NA	30	8,97	0,1	0,5601	0,10	N	
			60	8,99	-0,1	0,5587	0,15	N	
			120	8,91	0,7	0,5592	0,10	N	

<sup>a</sup>ozônio; <sup>b</sup>depois de 48hours [Groups: CG and TGs (n=2)]; <sup>c</sup>conteúdo de umidade; <sup>d</sup> atividade de água; <sup>e</sup>após tratamento ;<sup>g</sup>negativo; <sup>f</sup> O<sub>3</sub> grupo tratamento - 40 μmol/mol; <sup>h</sup> grupo tratado - 60 μmol/mol; <sup>i</sup>grupo controle (somente ar); <sup>j</sup>NA não aplicável \* umidade antes tratamento

### Características da superfície da amostra e a efetividade do gás O<sub>3</sub>

Com relação às características principais da superfície do alimento extrusado, elas desempenham um papel importante na eficácia do gás O<sub>3</sub>, especialmente a presença de poros (produzidos durante a extrusão) e o revestimento lipídico (adicionado após a extrusão). A figura 2 mostra as características do extrusado.

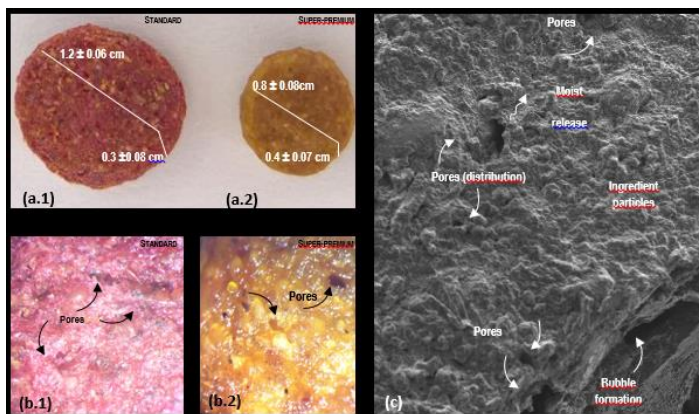


Figura 2. Características comerciais de alimentos secos extrusados de cada tipo: (a) dimensões de ração; (b) distribuição dos poros da superfície (por estereoscopia - 400x) e (c) variabilidade do diâmetro dos poros (por microscopia eletrônica de varredura - 3.000x) [1 - Padrão e 2 - Super-Premium].

Revestimento lipídico - a partir dos dados obtidos, é possível sugerir que o teor de cobertura lipídica e total de gordura / óleo das amostras Super-Premium e Standard (lipídios: 12,25 e 8,16%, respectivamente) ofereceu resistência à penetração de gás O<sub>3</sub>, portanto, não afetando o conteúdo interno, nem o índice de peróxido. Apesar disso, as embalagens abertas estão sujeitas a contaminação por esporos, seja na casa do proprietário do animal ou durante a comercialização na loja, podem ser um problema, como relatado por Silva et al. (2016). De fato, durante a extrusão, a mistura de ingredientes torna-se mais densa, produzindo bolhas, levando à formação de poros (MURAKAMI, 2010). É importante enfatizar que os poros são mantidos cobertos por alguns dos lipídios de revestimento, interferindo assim no gás O<sub>3</sub> para alcançar as camadas internas da ração e a liberação de umidade. No entanto, para a

contaminação de esporos em embalagens pós-abertas nas lojas durante a comercialização, esse gás mostrou-se eficiente.

### **Alimentos extrusados para cães vendidos a granel**

No que diz respeito às condições de venda de alimentos para animais nas lojas, em alguns países existe um hábito inadequado de vender a granel a partir de grandes sacos abertos (15/20 kg). Essas embalagens permanecem abertas nos estabelecimentos durante dias, como mostra a Figura 3. Os alimentos expostos ao ambiente, além de favorecer a absorção de umidade, também contribuem para o crescimento dos fungos. A avaliação da carga do fungo tem sido um bom indicador das condições sanitárias dos alimentos comerciais para animais. Os danos causados por fungos geralmente estão relacionados a perdas nutricionais de matérias-primas e deterioração dos produtos finais (DE SOUZA KOERICH e SCUSSEL 2013).

Silva et al. (2017) relataram para carga total de fungos, encontrando um número maior de amostras positivas (48%) em alimentos extrusados para cães comercializados a granel, quando comparados aos embalados (28%). Os níveis de contaminação variaram de 1 a  $4 \times 10$  UFC/g, com os maiores teores nos alimentos a granel (sacos abertos) expostos à umidade do ambiente. Como esperado, os autores relataram que as amostras de alimentos extrusados a granel atingiram valores mais altos de mc (6,63 a 15,35%) do que os embalados (6,32 a 10,77%). Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os alimentos comercializados a granel e embalados.

A umidade do alimento extrusado pode afetar suas características e está relacionada à estabilidade, qualidade e segurança. Portanto, suas determinações são uma das medidas mais importantes para prevenir ou retardar o crescimento de fungos e, conseqüentemente, a deterioração dos alimentos. Vários estudos relacionaram o desenvolvimento de fungos a um armazenamento incorreto em alta umidade e temperatura (BRITO et al. 2010; GIORDANO, NONES e SCUSSEL, 2012). O uso de gás  $O_3$  em lojas com venda de alimentos a granel para animais, ajudaria reduzir a contaminação e o desenvolvimento de fungos durante o período de venda desses alimentos.



Figura 3. Alimento seco extrusado para cães vendidos em pequenas porções (a granel) em sacos abertos em lojas de animais - hábito praticado em vários países.

#### 4. CONCLUSÃO

O tratamento com gás  $O_3$  mostrou sua eficácia sobre esporos de *A. flavus* nas condições de 40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$  por 120 min. Os parâmetros de umidade antes e após os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre eles, mantendo os alimentos dentro dos parâmetros seguros estabelecidos pela indústria para evitar o crescimento de fungos. O mesmo ocorreu com a estabilidade lipídica. De acordo com o presente estudo, é possível inferir que o gás  $O_3$  teve um efeito positivo na inativação de *A. flavus* em alimentos de cães e pode ser um procedimento promissor, com potenciais aplicações na área de venda de alimentos.



## REFERÊNCIAS

APHA - American Public Health Association. 1999. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 16. ed. Washington, DC: American Public Health Association.

BEBER-RODRIGUES, M; SAVI, G.D; SCUSSEL, V.M. Ozone Effect on Fungi Proliferation and Genera Susceptibility of Treated Stored Dry Paddy Rice (*Oryza sativa* L.). **Journal Food Safety**, n.35, p.59-65, 2015.

BOERMANS, H.J; LEUNG, M.C. Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. **International Journal Food Microbiology**, n. 119, p.95–102, 2007.

Brazilian Compendium of Animal Feeding. 1998. São Paulo: SINDIRAÇÕES/ANFALPET. Campinas CBNA/SDR/MA. 371p.

BRITO, C.B.M; FELIX, A.P; JESUS, R. M; FRANÇA, M. I; KRABBE, E.L; OLIVEIRA, S.G; MAIORKA, A. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, n.159, p.150-155, 2010.

CARCIOFI, A.C; TESHIMA, E; BAZOLLI, R.S; BRUNETTO, M.A; VASCONCELLOS, R.S; PEREIRA, G.T; OLIVEIRA, L.D. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, n. 10, p.489-500, 2009.

CHRIST, D; SAVI, G.D; SCUSSEL, V.M. Effectiveness of Ozone Gas in Raw and Processed Food for Fungi and Mycotoxin Decontamination – a Review. **Journal Chemistry Biology and Physical Science**, n.6, p. 326-348, 2016.

CHRIST, D; KREIBICH, H.H; VALMORBIDA, R; SAVI, G.D; SILVA, J.R; SCUSSEL, V.M. Antifungal Properties of Ozone Gas in Stored Naturally Contaminated Dry Maize (*Zea mays* L.) Grains. **Scholars Journal of Engineering and Technology**, n.5, p.146-152, 2017.

DE SOUZA KOERICH, K; SCUSSEL, V.M. Dogs and Birds Dry Food Fumonisin FB1 and FB2 Contamination and Their Relation to Ingredients and Packaging Characteristics. **Research Journal of Biological Sciences**, n. 8, p. 22-29, 2013.

FAO-Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Fresh Water Fish Processing and Equipment in Small Plants** (P. Bykowski and D. Dutkiewicz, eds.), p. 59, Corporate DOC Depository, Rome, Italy, 1996.

FDA-United States Food and Drug Administration. **GRAS status of ozone**. Fed. Regist. 47, 50209–50210, 1982.

FELIX, A.P; OLIVEIRA, S.G; MAIORKA, A. **Fatores que interferem no consumo de alimentos em cães e gatos**. In: Vieira, S. Consumo e preferência alimentar de animais domésticos. 1ed. Phytobiotics Brasil: Londrina. Cap. 3. p. 162-199, 2010.

GAZZOTTI, T; BIAGI, G; PAGLIUCA, G; PINNA, C; SCARDILLI, M; GRANDI, M; ZAGHINI, G. Occurrence of Mycotoxins in Extruded Commercial Dog Food. **Animal Feed Science and Technology**, n.202, p.81–89, 2015.

GIBSON, C.A; ELLIOT, J.A; BECKETT, D.C. Ozone for controlling mold on Cheddar cheese. **Canadian Dairy and Ice Cream Journal**, n.14, p. 24–28, 1960.

GIORDANO, B.N.E; SAVI, G.D; PIACENTINI, K; KREIBICH, H.H; SCUSSEL, V.M. Effect on Consumers Sensory Acceptance of Brazil Nuts Ozone Gas Treated for Fungi Control During Storage. Paper presented at 11<sup>th</sup>, **International Workshop Conference on Stored Product Protection**, Chiang Mai, Thailand, 2014.

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**, n. 4, p.1–10, 2012.

GIORDANO, B.N.E; SCUSSEL, V.M. Influência do Ozônio no Conteúdo de Umidade da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa* H.B.K). **Revista de Ciências da Vida**, n, 28, p.160-162, 2008.

GRAHAM, D.M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, n.51, p. 72–75, 2007.

KELLS, S.A; MASON, L.J; MAIER, D.E; WOLOSHUK, C.P. Efficacy and Fumigation Characteristics of Ozone in Stored Maize. **Journal Stored Productions Research**, n.37, p.371-382, 2011.

KRABBE, E.L. Controle da atividade de água e produção de alimentos secos e semi-úmidos. In: I CONG. INTERNACIONAL E SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO – CBNA. 2009. **Anais [...]**. Campinas – SP.

KREIBICH, H.H; CHRIST, D; MARIA, G.S; SILVA, J.R; SAVI, G.D; SCUSSEL, V.M. Decontamination of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) Inoculated with *Aspergillus flavus* by Ozone Gas. **Journal Chemistry Biology Physical Science**, n.6, p.560-570, 2016.

LEUNG, M.C; DIAZ-LLANO, G; SMITH, T.K. Mycotoxins in Pet Food: a Review of World-wide Prevalence and Preventative Strategies. **Journal Agriculture Food Chemistry**, n.54, p.623-635, 2006.

MALLMANN, C. A. Fumonisin B<sub>1</sub> Levels in Cereals and Feeds from Southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 68, p. 41-45, 2001.

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 Stored Product Research**, n.47, p.249-254, 2011.

MOSS, M.O. Recent Studies of Mycotoxins. **Journal Applied Microbiology**, n.84, p. 62-76, 1998.

MURAKAMI, F. **Impacto da adição de água no processo de extrusão sobre a digestibilidade e propriedades físico-químicas da dieta para cães**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MUZOLON, P. **Micotoxicoses em cães**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

OZKAN, R; SMILANICK, J.L; KARABULUT, O.A. Toxicity of Ozone Gas to *Conidia* of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* and *Botrytis cinerea* and Control of Gray Mold on Table Grapes. **Postharvest Biology and Technology**, n. 60, p. 47–51, 2011.

PITT, J.I. Toxigenic Fungi and Mycotoxins. **British Med. Bul.** n.56, p.184-192, 2000.

RIAZ, M.N. Extrusion basics. In: Kvamme, J. L.; Phillips, T. D. **Pet Food technology**. Illinois Mt Morris, p. 347-360, 2003.

ROKEY, G.J; PLATTNER, B; DE SOUZA, E.M. Feed extrusion process description. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.39, p. 510-518, 2010.

RUMBEIHA, W.K. Clinical implications of mycotoxicosis in companion animals. **Technical Symposium on Mycotoxin**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

SANTIN, E; MAIORKA, A; ZANELLA, I; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp na Avicultura Comercial. **Ciência Rural**, n.31, p.185- 190, 2000.

SAVI, G.D; PIACENTINI, K.C; BITTENCOURT, K.O; SCUSSEL, V.M. Ozone Treatment Efficiency on *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Degradation and its Effects on Whole Wheat Grains (*Triticuma estivum* L.) **Quality and Germination. Journal Stored Product Research**, n.59, p.245-253, 2014.

SAVI, G.D; PIACENTINI, K.C; SCUSSEL, V.M. Ozone Treatment Efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* Growth Inhibition and Mycotoxin Degradation of Stored Wheat Grains (*Triticuma estivum* L.). **Journal Food Process Preservation**, n.39, p.940-948, 2015.

SCUSSEL, V.M. **Fungos em Grãos Armazenados**. In: Lorini I.; Miike, L; Scussel, V.M. Armazenagem de Grãos. Ed. Biogenexiz, Chap.2, Campinas, SP, 938p, 2017.

SERRA, R; ABRUNHOSA, L; KOZAKIEWICZ, Z; VENÂNCIO, A; LIMA, N. Use of Ozone to Reduce Molds in a Cheese Ripening Room. **Journal of Food Protection**, n.66, p.2355-2358, 2013.

SILVA, J.R; SOARES, C.E; KREIBICH, H.H; PEREIRA, M.N; MARIA, G.S; RUNTZEL, C.L; SCUSSEL, V.M. Ozone gas effect on water activity conditions during extruded food storage and fungi spores inactivation. In: CONTROLLED ATMOSPHERE AND FUMIGATION ON STORAGE PRODUCTS. 2016. India. **Anais [...]**. India, New Dehli, p.235.

SILVA, J.R; PEREIRA, M.N; ESCATOLIN, L.C; FREIRE, I.S.F; SCUSSEL, V.M. Contagem Fúngica e Umidade em Alimentos Extrusados para Cães Comercializados sob Diferentes Condições de Armazenagem. In: CONGRESSO MEDVEP DE ESPECIALIDADES VETERINÁRIAS.2017. Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba, Paraná.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A; TANIWAKI, M.H; SANTOS, R.F.S; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4.ed, São Paulo, Varela, 2010.

SPEARS, J.K; FAHEY, G.C. Resistant Starch as Related to Companion Animal Nutrition. **Journal AOAC International**, n.87, p.787-791, 2004.

TRAN, Q.D; HENDRIKS, W.H; VAN DER POEL, A.F.B. Effects of extrusion processing on nutrients in dry pet food. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.88, p.1487-1493, 2008.

ZOERLUNGENÇ, B; KIROGLUZORLUGENÇ, F; OZTEKIN, 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**, n.46, p.3593-3597, 2008.



**5 CAPÍTULO 4**  
**PLASMA A FRIO E OZÔNIO COMO TECNOLOGIAS NÃO**  
**TÉRMICAS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO**





## **PLASMA A FRIO E OZÔNIO COMO TECNOLOGIAS NÃO TÉRMICAS EM ALIMENTOS: UMA REVISÃO**

### **RESUMO**

Garantir a segurança dos alimentos e estender sua vida de prateleira são os objetivos da indústria. A crescente demanda do mercado consumidor por produtos de alta qualidade revela a necessidade da utilização de tecnologias, que ofereçam seguridade na produção e que ainda proporcionem mínimas alterações na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos. O processamento não térmico evita as perdas de qualidade dos alimentos, como perda de sabor, aparência, cor e qualidade nutricional, além de promover a descontaminação de microrganismos, micotoxinas e pesticidas. O plasma a frio (PF) e o ozônio (O<sub>3</sub>) são tecnologias promissoras entre os tratamentos não térmicos. Essa revisão tem como objetivo relatar o uso do PF e O<sub>3</sub> em alimentos, bem como suas características, mecanismos de descontaminação e as diferenças entre as duas tecnologias.

### **1. INTRODUÇÃO**

Problemas relacionados a contaminação em alimentos continuam a ser uma preocupação significativa (SIVAPALASINGAM et al. 2004; FAO, 2005; FDA, 2008). Garantir alimentos seguros e de qualidade é uma das tarefas mais complexas. A indústria alimentícia atingiu novos níveis de inovação para garantir a segurança dos produtos, impulsionada pelo crescimento da população e pelos regulamentos governamentais para produzir alimentos sem contaminantes microbiológicos e compostos tóxicos (pesticidas e micotoxinas) (RODRIGUES et al., 2003).

Além disso, a crescente demanda do mercado consumidor por produtos de alta qualidade revela a necessidade da utilização de tecnologias, que ofereçam seguridade na produção, aumentando sua vida útil, e que ainda proporcionem mínimas alterações na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (HOOVER, 1997; GUO; HUANG; WANG, 2015).

Uma série de tecnologias não térmicas tem sido testadas em indústrias de alimentos para melhorar a qualidade, ao mesmo tempo que garante a segurança microbiológica do produto (PRABHA et al., 2015). O uso de processos de descontaminação de superfície não-térmica é desejável para uma variedade de aplicações de processamento, em particular para aqueles em que é importante manter a qualidade e os atributos nutricionais dos produtos alimentares, muitas vezes

prejudicados pelo aquecimento excessivo alterando o valor nutricional, no sabor ou cor do produto (MIR; SAH; MIR, 2016).

Além de preservar as características do alimento, as novas tendências em tecnologia possuem seguridade para o meio ambiente, revelando preocupação com o equilíbrio entre a produção e o consumo de alimentos (COSTA; DELIZA; ROSENTHAL, 1999).

Em relação a isso, o plasma a frio (PF) e o ozônio (O<sub>3</sub>) vem sendo utilizados em uma variedade de alimentos para processos de segurança microbiológica e química. Essa revisão tem como objetivo apresentar uma visão geral sobre o PF e o O<sub>3</sub>, bem como as possíveis aplicações destas duas tecnologias no que tange a descontaminação de microrganismos e compostos químicos em alimentos. Os mecanismos de degradação desses compostos e a inativação de microrganismos sob efeitos dessas tecnologias também é discutido em conjunto com as vantagens para garantir a segurança de alimentos, bem como contribuir para a produção sustentável dos mesmos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo constitui-se de uma revisão da literatura especializada, no qual realizou-se uma consulta através de busca no banco de dados Scopus e PubMed. A pesquisa dos artigos foi realizada entre fevereiro a junho de 2018. A busca nos bancos de dados foi realizada utilizando as palavras-chave plasma a frio, ozônio, descontaminação, alimentos, microrganismos, pesticidas e micotoxinas.

Os critérios de inclusão para os estudos encontrados foram a descontaminação por plasma a frio e ozônio em alimentos em relação a microrganismos e compostos químicos (pesticidas e micotoxinas).

Logo em seguida, buscou-se estudar e compreender os principais parâmetros e forma de aplicação empregados nos estudos encontrados, bem como o mecanismo pelo qual essas duas tecnologias são eficientes para descontaminação em alimentos.

## **3. PROCESSOS NÃO-TÉRMICOS EM ALIMENTOS**

Os processos não térmicos vêm ganhando notória importância como tecnologia eficiente para substituir ou complementar os tratamentos térmicos tradicionais (esterilização, pasteurização e branqueamento). Comparados com os processos térmicos, os processos não térmicos oferecem as vantagens de baixa temperatura de processamento e a retenção de nutrientes e de sabor semelhante ao produto fresco, enquanto eliminam esporos de microrganismos, resíduos químicos e toxinas

(VEGA-MERCADO et al., 1997; COSTA; DELIZA;ROSENTHAL, 1999).

Além disso, os consumidores exigem produtos alimentícios, que contenham menos conservantes e outros conteúdos químicos. Assim, há uma necessidade de produzir produtos minimamente processados de alta qualidade sem colocar a saúde dos consumidores em risco. O desenvolvimento de novas tecnologias de descontaminação que asseguram um alto nível de descontaminação é essencial para as indústrias alimentares.

As tecnologias não térmicas, como a irradiação, luz ultravioleta, luz pulsada, processamento de alta pressão e ultra-som são consideradas alternativas promissoras (ZIUZINA et al. 2014; DASAN;MUTLU;BOYACI, 2016). Entre estas, as tecnologias do PF e O3 são tendências inovadoras para tratamento em alimentos.

## **4. PLASMA A FRIO**

### **4.1 Características**

O plasma é o quarto estado da matéria e constitui cerca de 99 % do universo. Esse termo se aplica a um gás ionizado composto por várias espécies atômicas, moleculares e iônicas, coexistindo com numerosas espécies reativas, incluindo elétrons, íons positivos e negativos, radicais livres, átomos e moléculas, e radiação eletromagnética (fótons UV e luz visível) (ALVES, 1995; BOURKE et al., 2018). É formado a partir da excitação de um gás ou mistura de gases mediante aplicação de uma pressão e energia, podendo ser esta última mecânica, térmica, nuclear ou a mais comum por via corrente elétrica (MISRA et al., 2014).

São geralmente classificados conforme seu nível de energia transferida, em plasmas térmicos e plasmas não-térmicos (plasma a frio ou em não-equilíbrio) (LIU; XU;WANG, 1999). O plasma térmico pode ser gerado aquecendo o gás a altas temperaturas, que podem exceder vários milhares de Kelvins, no qual todas as espécies químicas elétricas constituintes e íons existem em um equilíbrio termodinâmico. Este tipo de plasma requer pressões mais altas e uma quantidade maior de energia para ser formado quando comparado ao não-térmico (FRIDMAN et al., 2007; BOURKE et al., 2017).

Já o PF tem como forte característica a ausência de equilíbrio termodinâmico. Os elétrons, dotados de alta energia e alta temperatura, devido a sua pequena massa não transferem quantidade de calor significativo às partículas pesadas do meio. Dessa forma os elétrons possuem temperatura muito maior do que as partículas do meio, e a

temperatura do gás permanece na temperatura ambiente (SHÜLTER et al., 2013; ISTADI, 2006). Nas tecnologias de plasma, o PF é o mais utilizado.

Quanto a aplicação, plasmas são utilizados atualmente para uma variedade de aplicações comerciais variando de tecnologia microeletrônica, processamento de materiais, monitores de tela plana, revestimentos anticorrosão, melhoria das propriedades de barreira em materiais de embalagem, tratamento de resíduos tóxicos (limpeza de águas residuais, poluição do ar e reciclagem de materiais não degradáveis) e esterilização de alimentos (NIEMIRA, 2012; HELHEL; OKSUZ; RAD, 2005; SCHNEIDER et al, 2005; CHU, 2007).

A esterilização por plasma pode oferecer uma alternativa para métodos de desinfecção. Esse gás apresenta tratamento uniforme, pode executar a atividade a baixa temperatura e sem alteração do alimento (sabor, odor, estrutura) (BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2013; CHOI et al., 2017), e finalmente, o plasma não requer produtos químicos, portanto, não deixam resíduos tóxicos (SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008; NIEMIRA; GUTSOL, 2010). Devido sua variedade de utilização e objetivos, existem diferentes tipos de reatores.

#### **4.2 Reatores para geração de plasma a frio**

A geração de PF ocorre em reatores, que pode ser por correntes elétricas - contínuas ou alternadas, radiofrequência e micro-ondas - induz a quebra das moléculas do gás. O processo gera elétrons acelerados por um campo elétrico, formando o PF (NIEMIRA, 2012). Os tipos de fontes elétricas podem ter características diversas, dependendo do tipo de tensão aplicada e especificidade do reator (ISTADI, 2006).

Além dos tipos de fonte elétrica, a geração do PF pode ocorrer a vácuo (1Pa), por pressão moderada (100 Pa) ou por pressão atmosférica (100 kPa). O PF gerado a baixa pressão, além de necessitar de um sistema de vácuo, geralmente trabalha com elevadas temperaturas e não pode tratar diretamente um material em uma região pontual, diferentemente do PF a pressão atmosférica (Niemira, 2012; Phan et al., 2017). Assim, grande atenção tem sido dada à tecnologia de plasma gerado a pressão atmosférica, sendo este o mais utilizado (Fridman; Chirokov; Gutasol, 2005; Tendero et al., 2006).

Quanto aos gases mais utilizados para a formação de PF, são o oxigênio, argônio, nitrogênio, hélio e dióxido de carbono, usados isoladamente ou uma mistura de dois ou mais gases. A ionização do gás no interior do reator, pode ser total, parcial ou fracamente ionizado,

fatores que dependerão do tipo de reator, tensão elétrica aplicada e gás utilizado (PANKAJ et al., 2014).

Os reatores de PF geralmente são construídos em diferentes geometrias empregando sistemas de eletrodos de alta tensão (ponta ou fio). Os tipos mais comuns são: jato de plasma, descarga em barreira dielétrica, descarga corona e descarga em micro-ondas (PHAN et al., 2017).

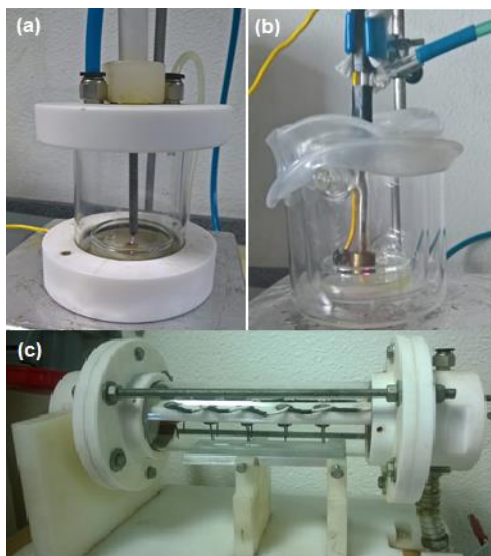


Figura 1. Diferentes reatores de plasma a frio: (a) tipo ponta-plano (um eletrodo); (b) jato de plasma e (c) descarga em barreira dielétrica (ponta-plano) com vários eletrodos.

### 4.3 Aplicação de plasma a frio na área de alimentos

O PF tem uma variedade de aplicações para a indústria alimentar, incluindo a descontaminação em alimentos como carnes, produtos lácteos, frutas e vegetais, granulares / particulados (grãos, ervas e especiarias) e sementes germinadas. Esta tecnologia também tem sido aplicada com sucesso para a esterilização superficial em materiais de embalagem (MIR; SHAH; MIR, 2016; MISRA et al., 2015, PANKAJ et al., 2015, SCHOLTZ et al., 2015).

Essa capacidade do PF em trabalhar a baixas temperaturas tem aberto a possibilidade de usar a tecnologia para o tratamento de alimentos sensíveis ao calor (KORACHI et al., 2015; CULLEN et al., 2017). Os atuais métodos de descontaminação térmica são conhecidos por induzir

mudanças na composição química do leite e produtos lácteos, por exemplo (MIR; SHAH; MIR, 2016; SEGAT et al., 2015). Usando as vantagens do PF, este sistema foi testado quanto à sua capacidade de descontaminar esses alimentos.

Em relação a trabalhos utilizando PF para descontaminação em alimentos, as bactérias foram as mais estudadas (KIM et al., 2014; ZIUZINA et al., 2014; BERMUDEZ-AGUIRRE et al., 2013; GUROL et al., 2012; ROD et al., 2012; KIM et al., 2011; LEE et al., 2011; SONG et al., 2009). No entanto, trabalhos com fungos (DASAN et al., 2016; SUHEM et al., 2013; SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008; TROMPETER et al., 2002), micotoxinas (SICILIANO et al., 2016; OUF; BASHER; MOHAMED, 2015; PARK et al., 2007) e pesticidas (HEO et al., 2014; MISRA et al., 2014; BAI ET al., 2009) também já foram realizados.

*Inativação em bactérias:* o PF já foi utilizado para descontaminação em bactérias como a *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, principais patógenos responsáveis por intoxicação alimentar (YONG et al., 2015; GUROL et al., 2012; SONG et al., 2009). Alimentos acometidos por esses microrganismos e que são sensíveis ao calor, são beneficiados pelo plasma.

Estudo em queijo fatiado demonstrou que o PF foi capaz de reduzir *L.monocytogenes*. Os parâmetros do processo considerados foram a potência (75, 100, 125 e 150 W) e o tempo de exposição ao plasma (60, 90 e 120 s). A redução microbiana aumentou com o aumento da potência e do tempo de exposição ao plasma. Após 120 s tratamentos a 75, 100 e 125 W, as células viáveis de *L. monocytogenes* foram reduzidas em 1.70, 2.78 e 5.82 log (SONG et al., 2009). Já Yong et al. (2015), além de observarem a redução de *E. coli*, *S. typhimurium*, e *L. monocytogenes* em queijo fatiado, constataram também o aumento considerável no tempo de armazenamento pós tratamento.

Em leite, Gurol et al. (2012) avaliaram a capacidade do PF em descontaminar *E. coli* com diferentes teores de gordura. O plasma foi aplicado em intervalos de tempo de 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 20 min. Uma redução significativa de 54% na população de células de *E. coli* após 3 min foi observada independentemente do teor de gordura do leite. O tratamento não causou alterações significativas nos valores de pH e cor de amostras de leite cru. Nenhuma célula viável foi detectada após 1 semana do tratamento e permaneceu assim durante o período de armazenamento de 6 semanas.

Além dos produtos lácteos, a redução bacteriana por PF já foi avaliada em carnes (bovinas, suínas e frangos), frutas (maçã, melão, tomate, manga, blueberries, morango e figo), vegetais (alface, cenoura, espinafre e batata), cereais (arroz e trigo) e especiarias (pimenta em pó, orégano e páprica) (LACOMBE et al., 2015; MIR et al., 2015; SARANGAPANI et al., 2015; BERMUDEZ-AGUIRRE et al., 2013; FROHLING et al., 2012; ROD et al., 2012; MOON et al., 2009; CRITZER et al., 2007).

*Inativação em fungos:* trabalhos com a utilização de PF como agente descontaminante em fungos nos alimentos, foram publicados em menor quantidade, quando comparado aos estudos envolvendo bactérias (Tabela 1). Os alimentos mais estudados foram a oleaginosas (pistache, amêndoas, amendoim e avelãs), tâmaras e em sementes de fruta e grãos (tomate, trigo, feijão, aveia, soja, cevada, milho e centeio), já em relação aos fungos os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais testados.

Dasan et al. (2016) investigaram a descontaminação de fungos inoculados (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*) em superfícies de avelãs por PF. Reduções significativas de 4,50 log (UFC/g) em *A. flavus* e 4,19 log (UFC/g) em *A. parasiticus* foram alcançados após 5 minutos de tratamentos 655 W. Não foram observadas também crescimento na carga de *A. flavus* e *A. parasiticus* durante o armazenamento das avelãs tratadas com plasma, enquanto nas amostras de controle os fungos continuaram a crescer em condições de armazenamento (30 dias a 25°C).

Em barras de cereais de arroz, Suhem et al. (2013) estudaram o efeito do tratamento com PF para inibir o crescimento de *A. flavus*. O tratamento foi aplicado na superfície das barras de cereais com potência de 40W e tempo de exposição de 20 min, reduzindo aproximadamente 4 log UFC/g e impedindo também o crescimento do fungo na superfície das barras por pelo menos 20 dias.

Já em sementes de grãos e leguminosas, além da redução de *A. parasiticus* e *Penicillium* spp. os autores observaram que as qualidades alimentares (índice de glúten, umidade, tempo de cozimento) de trigo e feijão não foram afetadas com o uso do plasma na potência de 300 W e tempos de exposição de 5-20 min, assim como as taxas de germinação das sementes, indicando que o PF é um processo viável para esses alimentos (SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008).

Tabela 1. Inativação de microrganismos em alimentos usando plasma a frio.

Microrganismo	Amostra	Reator	Tempo de exposição (min)	Redução (log)	Referência
<b>BACTÉRIAS</b>					
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ovo	DB D	90	4-5	Rowan et al. 2007
<i>L. monocytogenes</i>	Queijo fatiado	APP	2	1-5	Song et al. 2009
<i>L. monocytogenes</i>	Presunto fatiado	APP	2	1,73	Lee et al. 2011
<i>Escherichia coli</i>	Bacon	APP	1,5	2-3	Kim et al. 2011
<i>Salmonella typhimurium</i>					
<i>E. coli</i>	Maçã	AR C	3	3,7	Niemira & Sites, 2008
<i>S. Stanley</i>					
<i>E. coli</i>	Amêndoas	DB D	0,50	1,8-5	Deng et al. 2007
<i>E. coli</i>	Manga Melão	APJ	0,08	3	Perni et al. 2008
<i>E. coli</i>					
<i>Staphylococcus aureus</i>					
<i>Candida albicans</i>	Suco de laranja	DB D	0,41	5	Shi et al. 2011
<b>FUNGOS</b>					
<i>Aspergillus flavus</i>	Pimenta em pó	DM	20	2.5	Kim et al. 2014
<i>A. flavus</i>					
<i>A. parasiticus</i>	Avelãs	APF BP	5	4,50	Dasan et al. 2016
<i>A. flavus</i>	Barra de cereais	APJ	20	4	Suhem et al. 2013
<i>A. parasiticus</i>					
<i>Penicillium</i>	Grãos e cereais	SD	15	3	Selcuk et al. 200

DBD: descarga de barreira dielétrica; APP: plasma a pressão atmosférica; APJ: jato de plasma a pressão atmosférica; DM: descarga micro-ondas; SD: selfie-design; APFBP: plasma em pressão atmosférica em leito fluidizado; ARC: descarga em arco

*Degradação de micotoxinas:* micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por vários fungos toxigênicos, que frequentemente contaminam os alimentos e podem resultar em doenças humanas apresentando propriedades alergênicas, teratogênicas, carcinogênicas e mutagênicas. A produção intensiva de alimentos está contribuindo para manuseio, transporte e armazenamento incorretos dos alimentos, resultando em níveis maiores de contaminação por micotoxinas (HOJNIK et al., 2017; SCUSSEL, 2002; PITT, 200).

Processos para descontaminação de micotoxinas em alimentos foram bastante estudadas e vão desde tratamento térmico até irradiação. No entanto, a tecnologia do PF, também está sendo utilizada para este fim. Siciliano et al. (2016) avaliaram a redução de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>,



AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) em avelãs. Após 12 min na potência de 1000 W, obteve-se a redução na concentração de aflatoxinas totais e AFB<sub>1</sub> superior a 70%. As aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> foram mais sensíveis aos tratamentos plasmáticos em comparação com as aflatoxinas B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>, respectivamente.

Wang et al. (2015) testaram a utilização de PF direto na aflatoxinas B<sub>1</sub>. Foi revelado que a AFB<sub>1</sub> poderia ser efetivamente degradada pelo plasma em uma exposição de 300 W por 10 min resultando em uma taxa de degradação de até 88,3%. A mesma resposta positiva foi obtida por Devi et al. (2017), nas amostras de amendoim cru contendo AFB<sub>1</sub>, tratadas com plasma de 40 W e 60 W durante 12 e 15 min, foram observadas mais de 70% e 90% de redução desse composto tóxico, respectivamente.

Em tâmaras, Ouf et al. (2015) avaliaram a descontaminação de fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) e Ocratoxina (OTA). A micotoxina FB<sub>2</sub> não foi detectada após 6 min de tratamento com PF, enquanto a OTA não foi detectada após 7,5 min. Provando que a tecnologia tem potencial para ser um método promissor para a descontaminação de micotoxinas em alimentos.

*Degradação de pesticidas:* os pesticidas em práticas agrícolas beneficiaram a produtividade das culturas, no entanto, trouxe problemas ambientais e de saúde humana em escala global (MISRA et al., 2014). A toxicidade e a carcinogenicidade dos pesticidas estão bem estabelecidas, juntamente com as doenças crônicas em humanos causadas por resíduos desses compostos nos alimentos.

A utilização do plasma em frutas e vegetais *in natura* para a redução ou remoção de pesticidas é um método relativamente novo (PASQUALI et al., 2016). Pesticidas com ação antifúngica (azoxystrobin, cyprodinil e fludioxonil), inseticidas (paraoxon, dichlorvos, omethoate) e larvicidas (pyriproxyfen) em amostras de morango, milho e maçã foram estudadas em relação a descontaminação por PF (BAI et al., 2009; HEO et al., 2014; MISRA et al., 2014).

A degradação total de paraoxon e omethoate em grãos de milho foi observada após 120 s de tratamento a potência de 120 W utilizando gás oxigênio para formação de PF (BAI et al., 2009). Heo et al. (2014) também relataram que a média da concentração de paraoxon em maçãs frescas foi reduzida em 95,9% após o tratamento com PF utilizando ar puro.

Em morangos cobertos com pesticidas, Misra et al. (2014) testaram aplicação do plasma e após 5 min de tratamento, a concentração de azoxystrobin, cyprodinil, fludioxonil e piriproxifeno diminuiu em 69%,

45%, 71% e 46%, respectivamente. O produto final da via de degradação do pesticida fludioxonil identificado foi um ácido carboxílico que possui baixa toxicidade e risco à saúde.

É claramente afirmado que a otimização das variáveis do PF incluindo tempo de tratamento, aplicação de energia, frequência, área de contato do eletrodo, gap de vazão, distância da fonte de plasma, tipo de gás de descarga, pressão e vazão de gás juntamente com a embalagem do material impactou a descontaminação de pesticidas (PANKAJ et al., 2014; PHAN et al., 2017).

Tabela 2. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando plasma a frio.

Contaminantes	Amostra	Reator	Tempo de exposição (min)	Redução (%)	Referência
<b>MICOTOXINAS</b>					
Aflatoxinas	Avelã	DBD	12	70	Šiciliano et al. 2016
Fumonisina*	Tâmaras	DAPACP	6-7,5	100	Duf et al., 2015
Ocratoxina A	Amendoim	SD	12	90	Devi et al. 2017
Aflatoxina**					
<b>PESTICIDAS</b>					
Paration	Maçã	DBD	2	95,9	Heo et al. 2014
Azoxistrobina	Morango	DBD	1-5	69	Misra et al. 2014
Ciprodinil				45	
Fludioxonil				71	
Piriproxifeno				46	
Diclorvós	Milho	RF	2	100	Bai et al. 2009

DBD: descarga de barreira dielétrica; DAPACP: plasma frio de dupla pressão atmosférica; SD: selfie design; RF: plasma de radiofrequência \*FB<sub>2</sub>\*\*AFB<sub>1</sub>

#### 4.4 Mecanismos de descontaminação

Os mecanismos pelo qual o PF inativa os microrganismos e degrada micotoxinas e pesticidas, se deve a vários mecanismos sinérgicos, incluindo interação química direta da membrana celular com espécies reativas do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS), como O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, OH, NO, NO<sub>2</sub> e partículas carregadas, danos de componentes celulares dos microrganismos como as membranas, DNA e proteínas, causadas pela geração de radiação ultravioleta (UV) e agentes ativos biocidas (NIEMIRA, 2012a; MISRA et al., 2016; PHAN et al., 2017). Além disso, há a formação de luz UV, que contribui para a inativação dos microrganismos. O fóton UV pode penetrar até a profundidade de apenas um micrômetro, e juntamente com o plasma observou-se que este

penetrou até a profundidade de 10 micrômetros, sendo eficiente para destruição de bactérias e fungos (BOUCHER et al., 1980).

O ROS e RNS são os principais agentes bactericidas e fungicidas (MISRA et al., 2016). O processo de inativação desses microrganismos pelo PF começa com a interação entre esses agentes ativos e a superfície das células do microrganismo, causando sua ruptura celular (BOUKER et al., 2018). Essas espécies reativas degradam componentes específicos, como a parte lipídica e o peptidoglicano, devido à formação de peróxidos, ânions e superóxidos que podem quebrar as ligações estruturalmente importantes (PARVULESCU et al., 2012; MISRA et al., 2016; PHAN et al., 2017).

Em relação aos microrganismos, geralmente, o grau de inativação microbiana do PF é afetado pelo tipo e população inicial de microrganismos, o meio de inativação, a composição do gás para a geração do plasma e sua taxa de fluxo, bem como estado fisiológico das células (SONG et al., 2009; PHAN et al., 2017). A inativação bacteriana e fúngica em alimentos pelo PF é fortemente dependente não apenas do gás formador de plasma, mas também dos fatores intrínsecos como atividade de água, textura, teor de proteína, gordura e pH (LACOMBE et al., 2015; LEE et al., 2015).

Da mesma forma que acontece com os microrganismos, as micotoxinas quando expostas às ROS e RNS produzidas no plasma, são decompostas direta ou indiretamente através de processos químicos secundários em produtos de reação menos tóxicos (HOJNIK et al., 2017). Já para os pesticidas, a sua degradação é principalmente dependente da energia média do elétron e da produção de espécies reativas (BAI et al., 2010; MISRA et al., 2016). As moléculas de pesticidas são primeiramente dissociadas pela grande energia do plasma e então, essa energia também produz radicais livres, como OH, O<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que têm um potencial de oxidação consideravelmente alto para iniciar a degradação do pesticida (BAI et al., 2010; JIANG et al., 2014). Consequentemente, a ligação química do pesticida pode ser quebrada de forma eficaz e forma compostos menos tóxicos ou não prejudiciais (PHAN et al., 2017).

## 5. OZÔNIO

### 5.1 Características

O ozônio é um alótropo triatômico (O<sub>3</sub>) composto por três átomos de oxigênio que se formam quando as moléculas de oxigênio se rompem devido a radiação ultravioleta e os átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio (MOHAMMADI et al. 2017). Devido a maior estabilidade do oxigênio (O<sub>2</sub>), a molécula de

O<sub>3</sub> sofre um processo de dissociação espontânea com o tempo resultando novamente na formação do O<sub>2</sub> (LANGLAIS; RECKHOW;BRINK, 1991;MENNAD et al. 2010).

A decomposição não resulta em espécies nocivas já que o mesmo é espontaneamente convertido em O<sub>2</sub>. Por ser instável, requer que ele seja produzido no seu local de aplicação reduzindo assim gastos e perigos relacionados como seu transporte e estocagem (ARMOR, 1999; TATAPUDI; FENTON, 1994).

Como um agente oxidante muito reativo, o O<sub>3</sub> provou eficácia contra um amplo espectro de organismos vivos e compostos químicos, incluindo bactérias (KIM; YOUSEF, 2000; SHARMA et al., 2002; XU, 1999), fungos (PALOU et al., 2002; PEREZ et al., 1999) vírus e protozoários (CULLEN et al., 2009; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; RESTAINO et al., 1995). Além disso, também tem potencial para matar pragas de armazenagem (KELLS et al., 2001; MENDEZ et al., 2003), degradar micotoxinas (CULLEN et al., 2009), pesticidas e resíduos químicos (HWANG; CASH; ZABIK, 2001; ONG et al., 1996).

A formação de O<sub>3</sub> pode ocorrer naturalmente e livremente na estratosfera através da interação da radiação UV solar com o O<sub>2</sub> molecular quanto artificialmente através da reação de descarregadores elétricos ou radiação ionizante, sendo o aparelho de descarga corona, o mais conhecido e utilizado em diferentes processos alimentares (CHRIST; SAVI; SCUSSEL, 2016; MENAD et al. 2010. USEPA, 1999).

### **5.2 Aparelhos para geração de gás ozônio**

A produção comercial do O<sub>3</sub> é realizada pelo processo de descarga elétrica, também chamado de corona (USEPA, 1999). Este processo é constituído por dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000 V). O O<sub>3</sub> então é gerado pela passagem de ar ou O<sub>2</sub> puro entre esses eletrodos. Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de O<sub>2</sub>, começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do O<sub>2</sub> e a conseqüente formação do O<sub>3</sub> (CULLEN et al., 2009;USEPA, 1999).

Existem diferentes tipos, tamanhos e ozonizadores de capacidade de geração O<sub>3</sub>, desde laboratório (tamanhos pequenos e de baixas capacidades) até unidades de armazenamento (tamanhos grandes e de alta capacidade) para uma ampla gama de aplicações.Suas capacidades podem variar de 125 g / h até 10 kg / h com controles eletrônicos e alarmes (CHRIST; SAVI; SCUSSEL, 2016; MCDONOUGH et al., 2011).

### **5.3 Aplicação de gás ozônio na área de alimentos**

O  $O_3$  é um poderoso agente oxidante e desinfetante (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004; KEELS et al., 2001; MCKENZIE et al., 1998; MENDEZ et al., 2003) capaz de participar de um grande número de reações com compostos orgânicos e inorgânicos (ALMEIDA; ASSALIN; ROSA, 2004; KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002). Pode reagir com a maioria dos compostos contendo ligações duplas, como C=C, C=N, N=N, etc., mas não com grupos funcionais contendo ligações simples, como C-C, C-O, O-H, etc (GOGATE; PANDIT, 2004). O gás  $O_3$  é um eficiente germicida, empregado em engenharia sanitária para a desinfecção da água potável e na remoção de sabores e odores indesejáveis. Também é um gás oxidante, que tem inúmeras aplicações na indústria alimentícia pelas vantagens que apresenta nas técnicas de preservação.

Na indústria de alimentos, o tratamento com  $O_3$  vem sendo estudado com o intuito de melhorar a qualidade e evitar perdas, devido a deterioração dos alimentos por microrganismos. A utilização do gás já demonstrou eficiência em bactérias e fungos, principais microrganismos deteriorantes em alimentos, além de degradar micotoxinas e pesticidas, contaminantes de interesse na indústria e segurança de alimentos.

*Inativação em bactérias:* o  $O_3$  é relatado em alimentos contra bactérias como a *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*; *Staphylococcus* (KIM; YOUSEF, 2000; SHARMA et al., 2003; 2004; SARRON; COCHET; GADONNA-WIDHEM, 2013; TORLAK; SERT; ULCA, 2013). Os efeitos de diferentes tratamentos com gás  $O_3$  (0,1, 0,5 e 1,0 ppm) na descontaminação de pistache inoculado com *E. coli* e *B. cereus* foram estudados por Akbas e Ozdemir (2006). Numa concentração de 1.0 ppm durante 360 minutos, as contagens de *E. coli* e *B. cereus* em pistache inteiro sofreram reduções de 3.5 e 3 log/UFC, respectivamente.

Os mesmos autores avaliaram o efeito da ozonização na redução de *E. coli* e *B. cereus* em figos secos em concentrações de  $O_3$  de 0,1, 0,5 e 1,0 ppm durante 360 minutos em amostras inoculadas. As concentrações de 0.1 e 0.5 ppm por 360 minutos resultaram em reduções de 0,9 e 1,4 log/UFC na população de *E. coli* e 2,7 e 2,9 reduções na população de *B. cereus*, respectivamente. A 1,0 ppm por 360 minutos, redução de 3,5 log/UFC foram obtidas para ambas as bactérias. Não foram observadas mudanças significativas nas propriedades físico-químicas (cor, pH e umidade) e na qualidade sensorial (doçura, rancidez, aroma e aparência) dos figos secos tratados com  $O_3$ , quando comparados com as amostras não tratadas (AKBAS e OZDEMIR, 2008).

Em estudo com orégano, a redução de *Salmonella* foi de 2,8 e 3,7 log/UFC nas concentrações de 2,8 e 5,3 mg/L respectivamente, durante 120 min (TORLAK; SERT; ULCA, 2013). Redução de *E.coli* inoculados em brotos de alfafa também foram observadas após 64 min em concentração de 21 ppm (SHARMA e DERMICI, 2003).

Em relação a trabalhos utilizando o gás O<sub>3</sub> como descontaminante em bactérias, mostra que esse gás é eficaz na redução da concentração microbiológica de vários alimentos, e seguro quanto as características sensoriais.

*Inativação em fungos:* assim como o plasma, trabalhos com a utilização de gás O<sub>3</sub> como agente descontaminante de fungos em alimentos, foram publicados em menor quantidade, quando comparado ao foco em bactérias. No entanto, os dados são suficientes para concluir que o O<sub>3</sub> é eficiente na descontaminação destes microrganismos.

Segundo Christ et al. (2016) esses estudos mostram diferenças de tratamento, tais como: se aplicadas em alimentos contaminados naturalmente (MCKENZIE et al., 1998; DWARAKANATH et al., 2007; DIAO et al., 2013; LUO et al., 2014) ou inoculados (MCDONOUGH et al., 2011; EL-DESOUKY et al., 2012; SAVI et al., 2014; SAVI et al., 2015; KREIBICH et al., 2016). As concentrações do gás, o tempo de exposição versus os níveis de contaminação dos alimentos e o grupo de alimentos (cereais, legumes, nozes e frutas) também são detalhados, incluindo a porcentagem de redução de contaminantes.

Estudos com Castanha-do-Brasil de Giordano et al. (2010) e Scussel et al. (2011), mostraram redução total da contagem de fungos após tratamento com O<sub>3</sub> em 31 µmol/mol (30 min) e 10 µmol/mol (90 min), respectivamente. Em grãos de trigo contaminados artificialmente, Savi et al. (2015) encontraram resultados significativos de descontaminação por ozônio gasoso. O crescimento de *A. flavus* foi reduzido significativamente após 30 min de exposição com gás O<sub>3</sub> em concentrações de 40 e 60 µmol/mol quando comparado ao grupo controle, o que representou 80,7 a 87,8% de inibição de esporos. Entretanto, somente a exposição de O<sub>3</sub> a 60 µmol/mol inibiu totalmente o crescimento de *A. flavus* após 180 min.

Em grãos de arroz armazenados e naturalmente contaminados, Beber-Rodrigues et al. (2015) observou uma redução de 99,9% na carga total de fungos após tratamento com gás O<sub>3</sub> nas concentrações de 20 e 40 µmol/mol, durante 1,6 min. A Tabela 3 mostra os dados de inativação microbiológica em alimentos após o uso do gás O<sub>3</sub>.

Tabela 3. Inativação de microrganismos em alimentos usando ozônio.

Microorganismo	Amostra	Concentração	Tempo de exposição	Redução (log)	Referência
<b>BACTÉRIAS</b>					
<i>Escherichia coli</i>	Pistache	0,1/0,5/1,0 ppm	360 min	3,5	Akbas & Ozdemir, 2006
<i>Bacillus cereus</i>				3	
<i>E. coli</i>	Figo	0,1/0,5/1,0 ppm	360 min	1,4	Akbas & Ozdemir, 2008
<i>B. cereus</i>				2,9	
<i>Salmonella</i>	Orégano	2,8/ 5,3 mg/l	120 min	2,8-3,7	Torlak et al. 2013
<i>E.coli</i>	Alfafa	21 ppm	64 min	2,20	Sharma & Dermici, 2003
<b>FUNGOS</b>					
<i>Aspergillus flavus</i>	Milho	5 ppm	5 dias	100	Mason et a. 1997
<i>Fusarium verticillioides</i>					
<i>Penicilium citrinum</i>	Trigo	40/60 µmol/mol	30/60/120/180 min	100	Savi et al. 2014
<i>F.verticillioides</i>					
<i>F. graminearum</i>	Castanha	10 mg/l	90 min	100	Scussel et al. 2011
<i>A. flavus</i>					
<i>A. parasiticus</i>	Castanha	10/14/31,5 mg/l	180/300 min	100	Giordano et al. 2012
<i>A. flavus</i>					
<i>A. parasiticus</i>	Figo	13,8 mg/l	7,5/15/30 min	100	Zorlugenç et al. 2008
<i>A. flavus</i>					
<i>A. niger</i>	Cevada	11/26 mg/l	15/30/60 min	24 - 36	Kottapalli et al. 2005
<i>A. parasiticus</i>					
<i>Fusarium</i>	Milho	50/100/200 ppm	60 min	100	Mylona et al. 2014
<i>F. verticillioides</i>	Trigo	40/60 µmol/mol	30/60/120/180 min	87,8	Savi et al. 2015
<i>A. flavus</i>					
<i>P. citrinum</i>	Arroz	20/40 µmol/mol	1,6 min	99,9	Beber-Rodrigues et al. 2015
<i>Aspergillus</i>					
<i>Penicillium</i>					

*Degradação de micotoxinas:* devido à preocupação da presença desses metabólitos nos alimentos, métodos utilizando O<sub>3</sub> para sua degradação foram estudados. Chen et al. (2014) avaliaram a descontaminação de aflatoxinas (AFLs) em amendoim, os autores observaram uma redução de 65,8% do composto na concentração de O<sub>3</sub> de 6 µmol/mol durante 30 min.

Já para as Castanhas-do-Brasil houve uma redução de 100% de AFLs a uma concentração de 10 µmol/mol durante 90 min (SCUSSEL et al., 2011). Em grãos de milho a redução de 100% de fumonisinas (FBs) foi alcançada com a concentração de 200 ppm por 60 min (MYLONA et al., 2014).

Savi et al. (2014) mostraram que os níveis de deoxinivalenol (DON) diminuiram nos grãos de trigo, quando expostos ao tratamento com O<sub>3</sub>. A exposição ao O<sub>3</sub> durante 120 min na concentração 60 µmol/mol, reduziram significativamente os níveis de DON.

*Degradação de pesticidas:* a aplicação de O<sub>3</sub> em alimentos é promissora para a qualidade e segurança alimentar, pois além de demonstrar eficiência em reduzir a contaminação por bactérias, fungos e micotoxinas, também apresenta efeitos na remoção de resíduos de pesticidas em alimentos. Em estudos recentes, o O<sub>3</sub> já foi utilizado para a remoção de resíduos de pesticidas em vegetais e frutas (GABLER et al., 2010; IKEURA; KOBAYASHI; TAMAKI, 2011; IKEURA; HAMASAKI; TAMAKI, 2013; KUSVURAN et al., 2012). Em 2012, Kusvuran et al. avaliaram a eficiência de O<sub>3</sub> aquoso em frutas armazenadas e obtiveram resultados significantes com 5 min de exposição de limão e laranja (armazenadas a 20°C) na concentração de 10 ppm. Os resíduos de pesticidas em limão foram reduzidos em 92, 59,9 e 48,5% para chlorpirifos etil, tetradifon e clorotalonil, já para laranja, foram reduzidos em 100, 56,6 e 40,4%, respectivamente.

Por outro lado, o O<sub>3</sub> gasoso foi eficiente na degradação de pesticidas quando aplicado em uvas na concentração de 10 ppm por 60 min, reduzindo 68,5, 75,4 e 83,7% dos fungicidas fenexamida, ciprodinil e pirimetanil (KARACA; WALSE; SMILANICK, 2012). A ação do O<sub>3</sub> para redução dos compostos químicos, tais como as micotoxinas e pesticidas, pode levar a formação de subprodutos das reações de degradação, resultante da ozonólise. No entanto, a toxicidade de muitos destes subprodutos, tem sido reduzida quando comparada ao composto original.

O O<sub>3</sub> pode degradar totalmente o composto ou causar modificações químicas, reduzindo sua atividade biológica, isto irá depender da estrutura química a ser degradada (CULLEN et al., 2009; DIAO et al., 2013; TIWARI et al., 2010).



Tabela 4. Degradação de micotoxinas e pesticidas em alimentos usando ozônio.

Contaminantes	Amostra	Concentração	Tempo de exposição	Redução (%)	Referência
<b>MICOTOXINAS</b>					
Aflatoxinas	Milho	47,8 ppm	1,8 min	30	McDonough et al. 2011
Aflatoxinas	Amendoim	6 µmol/mol	30 min	65,8	Chen et al. 2014
Aflatoxinas	Castanha	10 µmol/mol	90 min	100	Scussel et al. 2011
Deoxinivalenol	Trigo	60 µmol/mol	120 min	100	Savi et al. 2014
Fumonisinás	Milho	100/200 ppm	60 min	100	Mylona et al. 2014
<b>PESTICIDAS</b>					
Chlorpirifos etil,	Limão	10 ppm	5 min	92	Kusvuran et al. 2012
Tetradifon				59,9	
Clorotalonil	Laranja	10 ppm	5 min	48,5	Kusvuran et al. 2012
Chlorpirifos etil,				100	
Tetradifon				56,6	
Clorotalonil				40,4	
Fenitrotion	Trigo	60 µmol/mol	180 min	69,4	Savi et al. 2015
Deltametrina	Trigo	60 µmol/mol	180 min	89,8	Savi et al. 2015
Fenexamida	Uva	10 ppm	60 min	68,5	Karaca et al. 2012
Ciprodinil				75,4	
Pirimetanil				83,7	

#### 5.4 Mecanismos de descontaminação

O principal meio pelo qual o O<sub>3</sub> esteriliza os alimentos é pela oxidação progressiva dos componentes celulares dos microrganismos. Ele atua inicialmente na membrana celular, em que ocorre a oxidação dos glicolípídeos, glicoproteínas e aminoácidos, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise (KHADRE, YOUSEF, KIM, 2001; SILVA et al., 2011). Segundo Christ et al. (2016), alguns autores concluem que o O<sub>3</sub> molecular é o principal inativador do microrganismo, outros destacam os subprodutos reativos da decomposição do O<sub>3</sub> como responsável pela atividade antimicrobiana.

O efeito da exposição direta ao gás O<sub>3</sub> em fungos toxigênicos foi realizada por Savi & Scussel (2014), a exposição de 60 ppm por 90 min em *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *P. citrinum*, *A. parasiticus* e *A. flavus*, causou alterações morfológicas durante a formação da estrutura fúngica (conídios e hifas), resultando em rupturas da membrana celular fúngica e redução do crescimento. Os mesmos autores relataram que a exposição ao gás O<sub>3</sub> mostrou um aumento na produção de ROS nas hifas tratadas, provavelmente relacionado a um estresse químico causado pelo gás O<sub>3</sub>.

Em relação a seu mecanismo de descontaminação de compostos tóxicos (micotoxinas e pesticidas), ocorre devido a sua ação oxidativa no seu local de toxicidade específico. Inclui ainda a abertura de anéis aromáticos, levando à degradação total ou causando modificações

químicas, reduzindo assim a toxicidade para níveis baixos ou tornando-se nula, dependendo da estrutura química a ser degradada (CHRIST, SAVI, SCUSSEL, 2016; DIAO et al., 2013; TIWARI et al., 2010).

## **6. EFEITOS DO PLASMA FRIO E OZÔNIO NAS CARACTERÍSTICAS DOS ALIMENTOS**

### **6.1 Plasma**

Poucos estudos têm abordado a aceitabilidade organoléptica de produtos alimentícios tratados com plasma, e aqueles que o fazem estão primeiramente focados no impacto da aparência visual (BOURKE et al., 2018). Bermúdez-Aguirre et al. (2013) observaram que não houve redução significativa na cor de cenoura, tomate e alface expostos ao PF.

Firmeza, cor da superfície e antocianinas foram testadas em blueberries. Observou-se que tratamentos com plasma a 549 W durante 60s resultaram em reduções significativas na firmeza, embora tenha sido demonstrado que as colisões entre as frutas e o recipiente contribuíram significativamente para o amaciamento. Uma redução significativa nas antocianinas foi observada após 90s. As medidas de cor da superfície foram significativamente impactadas após 120s (LACOMBE et al., 2015).

Um dos poucos estudos que incluiu o consumo do produto não encontrou diferença na aceitabilidade pela aparência, cor, sabor, aroma e textura. Todas as qualidades sensoriais testadas de fragmentos de lula, exceto a textura, diminuíram não significativamente pelo tratamento com PF por 0 e 3 min. A textura dos fragmentos tratados com plasma torna-se mais crocante, e isso pode ser devido a uma leve perda de umidade. No entanto, os escores gerais de aceitação para esse alimento permanecem inalterados após o tratamento com PF (CHOI et al., 2017). Os mesmos autores avaliaram ainda a peroxidação lipídica com o aumento da exposição do alimento ao PF.

O aumento de peroxidação lipídica também foi encontrado por Thirumdas et al. (2014) em nozes com o aumento da exposição ao PF. Isto pode ser porque os radicais são capazes de oxidar moléculas lipídicas e resultaram em aumento no valor de peróxido (MISRA et al., 2016).

Em estudo com arroz marrom, Thirumdas et al. (2016) observou a redução significativa no tempo de cozimento de 29,1 para 21,1 min após o tratamento com o PF (40 e 50 W) por 5 a 10 min. Para os parâmetros de textura a dureza reduziu de 40,47N para 30,09N. Em relação aos valores nutricionais, a aplicação de PF não alterou a proteína bruta, lipídeos, cinzas e carboidratos desse alimento.

## 6.2 Ozônio

A respeito do efeito do  $O_3$  na composição dos alimentos, os estudos relataram nenhuma ou muito baixa interferência de  $O_3$  nos componentes químicos (CHRIST, SAVI, SCUSSEL, 2016). Em estudo com amêndoas de cacau, o tratamento com  $O_3$  não apresentou oxidação lipídica nas concentrações (20, 40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$ ) e tempos (30, 105 e 180 min) testados. A análise foi repetida após 30 dias de armazenamento, e as amostras, novamente, não apresentaram desenvolvimento de rancidez (KREIBICH et al., 2016). Outros estudos sobre a descontaminação de  $O_3$ , também utilizando produtos contendo alto conteúdo lipídico (castanha do Brasil e amendoim) não relataram alterações na estabilidade dos lipídios (GIORDANO, NONES, SCUSSEL, 2011; SCUSSEL et al., 2011; CHEN et al., 2014).

A oxidação lipídica também foi testada em alimentos completos para cães, com percentual lipídico de 15%. Os parâmetros de  $O_3$  (40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$  a 30, 60 e 120 min) não alterou a estabilidade lipídica da ração, mostrando ser seguro seu uso nas concentrações e tempos testados (SILVA et al., 2018).

Em amostras de trigo, Savi et al. (2014) observaram que apenas a maior concentração de  $O_3$  (60  $\mu\text{mol/mol}$  a 180 min) foi capaz de aumentar o teor de carboxila do amido. No entanto, o tratamento com  $O_3$  não causou alterações na cristalinidade do amido. Para oxidação lipídica, não houve diferença entre as amostras de trigo tratado com  $O_3$  e o controle. O mesmo ocorreu para as proteínas em grãos de trigo expostos ao gás  $O_3$ .

Os mesmos achados foram demonstrados por Sandhu et al. (2012), utilizando baixas concentrações de  $O_3$  (1,5  $\mu\text{mol/mol}$  a 30 e 45 min) em trigo, não produzindo diferença significativa na cristalinidade do amido tratada e no controle.

O ozônio também é capaz de mudar a coloração da superfície de frutas e legumes como pêssegos, cenouras e brócolis (PRESTES, 2007; KIM; YOUSEF; DAVE, 1999). As alterações nos atributos sensoriais ou físico-químicos dependem da composição química do alimento, da dosagem de ozônio, e das condições do tratamento (SILVA et al., 2011).

## 7. PLASMA A FRIO *VERSUS* OZÔNIO

### 7.1 Limitações

Uma das maiores limitações do PF em alimentos é referente a sua eficácia na descontaminação de microrganismos, que varia de acordo com a matriz alimentar e a estrutura da superfície (BOURKE et al., 2018). Em estudo realizado por Smet et al. (2017), constatou-se que as células em um veículo líquido são mais resistentes à inativação do plasma do que em superfícies sólidas, devido à dificuldade de espécies reativas se difundirem em meio líquido. O mesmo é observado na umidade relativa do gás indutor, que mostrou influenciar significativamente na eficácia antimicrobiana do PF (PATIL et al., 2014).

A estrutura dos alimentos precisa também ser levada em conta nos tratamentos de PF para garantir eficácia e segurança, fissuras e fendas na superfície do alimento podem dificultar a eficácia do tratamento contra microrganismos, já que a tecnologia atinge somente a superfície (FERNANDEZ et al. 2013; ZIUZINA et al., 2015).

Fatores intrínsecos como osmolaridade e pH também afetam a eficácia do tratamento com PF, pois podem resultar em endurecimento por estresse das bactérias, tornando-as mais resistente, assim como alguns componentes dos alimentos como seu teor lipídico e o estado antioxidante que podem diminuir a atividade de espécies reativas plasmática (SMET et al., 2016; BOURKE et al., 2018).

Já as limitações do O<sub>3</sub> segundo Prabha et al. (2015) é a toxicidade quando inalado, causando problemas nas vias respiratórias. É um gás altamente instável, portanto não é possível seu armazenamento, além disso, o investimento inicial é maior para adquirir o equipamento de geração de O<sub>3</sub>. Ainda em relação a suas limitações em alimentos, o ozônio não pode ser considerado universalmente benéfico, pois em altas concentrações, pode promover a degradação oxidativa, alterando o sabor e a coloração do produto alimentício (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; SILVA et al., 2011).

Apesar do O<sub>3</sub> ter um efeito imediato na eliminação de microrganismos em alimentos e água, posteriormente pode haver uma recontaminação, pois o residual de O<sub>3</sub> é praticamente nulo (SILVA et al., 2011).

### 7.2 Toxicidade

Estudos mais profundos sobre a segurança em relação a toxicidade do PF em alimentos ainda não foram elucidados. Avaliações da

persistência de fatores citotóxicos nos alimentos ao longo do tempo, sua concentração e sua toxicidade oral, devem ser avaliadas de forma similar aos descontaminantes usados no processamento de alimentos, incluindo cloro e O<sub>3</sub> (BOURKE et al., 2018).

Compostos nitrogenados, como os nitritos e nitratos, foram verificados em água tratada com PF (Lukes et al., 2014), sendo necessário verificar o acúmulo desses compostos em alimentos. Na água tratada com PF, a Organização Mundial da Saúde (OMS) limita para a água potável 50mg / l de nitrato e 3mg / l de nitrito (Bourke et al., 2018).

Já o O<sub>3</sub> é extremamente tóxico quando inalado, seus sintomas de toxicidade são dor de cabeça, tontura, sensação de ardência nos olhos e garganta, sensação de odor pungente e tosse. Em baixas concentrações o O<sub>3</sub> não é um gás tóxico, mas em altas concentrações pode ser letal (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; PRABHA et al., 2015).

Pesquisadores alegam que concentrações de ozônio de 0,02 a 0,04 mg/L podem ser detectadas pelo ser humano e que a exposição prolongada a concentrações iguais ou superiores a 1,0 mg/L pode causar a morte (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; SILVA et al., 2011). Em relação a sua toxicidade em alimentos e água, não apresenta perigo, pois se tratando de um gás instável, não deixa resíduo nos produtos (LAPOLLI et al., 2003).

### **7.3 Legislação**

Nos Estados Unidos, a aprovação de uma nova tecnologia como o PF deve receber revisão e aprovação primária de três órgãos federais: Agência de Proteção Ambiental (EPA), Food and Drug Administration (FDA) e Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Os acordos de memorando de entendimento entre essas agências permitem o compartilhamento de informações e comunicações internas na revisão de novas tecnologias para alimentos e suas embalagens (BOURKE et al., 2018).

Não há na literatura nenhuma legislação ou orientação regulatória específica para o tratamento de plasma nos alimentos, em qualquer órgão regulador globalmente. Como uma nova tecnologia, isso é esperado com respostas normativas tipicamente emergentes como resposta ao uso do setor ou à indústria buscando orientação ou aprovação específica de um processo (CULLEN et al., 2017). A aprovação de tecnologias comparativas como o O<sub>3</sub> em água e alimentos pela FDA pode ser referenciada como uma potencial abordagem de aprovação regulatória bem-sucedida. De fato, alguns dispositivos de plasma são atualmente

comercializados como sistemas de ozônio para aplicações alimentícias (CULLEN et al., 2017; BOURKE et al., 2018).

Em cinco anos um total de 40 novas aprovações de ingredientes alimentares foram feitas, mas apenas 4 delas envolveram novas tecnologias como o tratamento UV (tecnologia) de cogumelos, pão, fermento para panificação e leite. Atualmente, a incerteza permanece o processo de aprovação regulamentar da Comissão Europeia (CE) para tecnologias de plasma a frio devido à falta de definição nos critérios de avaliação como por exemplo: risco para a saúde pública, nutricionalmente desvantajoso e não enganoso para o consumidor (BOURKE et al. 2018).

No Brasil, assim como na Europa, até o presente momento, não foram encontrados registros sobre legislação ou qualquer orientação regulatória sobre o uso de PF em alimentos, água, equipamentos e embalagens. Segundo Cullen et al. (2017), é importante que grupos de especialistas comecem a se formar para começar a coletar dados e fornecer opiniões sobre o uso de plasma em alimentos.

Em relação ao O<sub>3</sub> este é considerado por diferentes organizações internacionais como a FDA, USDA, Organização de Agricultura de Alimentos (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS) como método seguro para ser utilizado em contato direto com água potável e alimentos (CHRIST, SAVI, SCUSSEL, 2016). Desde 1975, o FDA reconhece o tratamento com o O<sub>3</sub> como GMP (Good Manufacturing Practice) para a indústria de água engarrafada e, em 1997, reconheceu como GRAS para uso em processamento de alimentos (FDA, 2001; RICE & GRAHAM, 2001). Mais adiante, o O<sub>3</sub> foi aceito para uso legal diretamente em alimentos processados e produtos agrícolas (matérias-primas, vegetais e frutas) como agente antimicrobiano (USDA, 2002).

A CE estabeleceu limites de concentração e requisitos de rotulagem para os constituintes da água potável (mineral natural e fonte), incluindo a água enriquecida com O<sub>3</sub> e limite máximo do resíduo O<sub>3</sub> (50 µg/l) na mineral natural e águas de nascente enriquecidas com O<sub>3</sub> (EC, 2003).

Já no Brasil, os Ministérios Agropecuários e de Saúde aprovaram a aplicação de O<sub>3</sub> em equipamentos para envase, incluindo os utensílios que entram em contato com a água (ANVISA, 1977). Em 1999 também estabeleceu a regulamentação padronizada para água purificada, na qual rótulos de garrafas devem informar a purificação tratamento aplicado, inclusive O<sub>3</sub> (ANVISA, 1999). Já o Ministério da Agricultura estabeleceu um regulamento para o uso de O<sub>3</sub> na descontaminação de resíduos de pesticidas (organofosforados) na área de estacionamento de aviões agrícolas aplicadores dessas substâncias (MAPA, 2008).

Para os regulamentos japoneses, australianos e chineses, o uso de O<sub>3</sub> nos alimentos foi permitido, seja no tratamento de ar da fábrica, na água e nos alimentos (NAITOU & TAKAHARA, 2006; LUO et al., 2014).

## **8. CONCLUSÃO**

As tecnologias de PF e O<sub>3</sub> em alimentos, mostram resultados promissores na descontaminação de bactérias, fungos, micotoxinas e pesticidas. No entanto, a elucidação das modificações no alimento seja sensorial, química ou física precisam ser mais estudadas, assim como o potencial tóxico do PF. Em relação ao uso dessas tecnologias na indústria, as duas mostram ser eficazes em relação a descontaminação de microrganismos na superfície, são tecnologias verdes e com sustentabilidade ambiental, pois não geram resíduos, e necessitam de baixa energia para suas operações comparadas aos processamentos térmicos. No entanto, para o PF ainda há a necessidade de desenvolvimento de projetos para uma escala industrial, validação e aprovação regulatória por órgãos responsáveis, além da aceitação do consumidor. Apesar dos benefícios comprovados das duas tecnologias na obtenção de alimentos seguros e de alta qualidade, condições específicas de tratamento devem ser padronizadas para cada produto alimentício. Por fim, a aceitação do consumidor, custo-efetividade, aspectos legais e segurança precisam ser levados em consideração em estudos futuros.





## REFERÊNCIAS

ACHEN, M; YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. **Journal of Food Science, Chicago**, n.9, p. 1380-1384, 2001.

AKBAS, M. Y.; OZDEMIR, M. Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. **International Journal of Food Science and Technology**, n.5, p. 513-519, 2006.

AKBAS, M. Y; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. **Food Microbiology**, n.2, p. 386-391, 2008a.

AKBAS, M. Y; OZDEMIR, M. Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers. **International Journal of Food Science and Technology**, n.9, p. 1657-1662, 2008b.

ALMEIDA, E; REGINA, M; ROSA, M.A; DURAN, N. Wastewater treatment by oxidation with ozone. **Química Nova**, n.27, p.818-24, 2004.

ALVES JR, C. **Nitreção em plasma pulsado: equipamento, preparação e caracterização das camadas nitretadas**. Universidade Federal de São Carlos (UFScar). São Paulo, 1995.

BAI, Y; CHEN, J; YANG, Y; GUO, L; ZHANG, C. Degradation of organophosphorus pesticide induced by oxygen plasma: effects of operating parameters and reaction mechanisms. **Chemosphere**, n.81, p.408-414, 2010.

BERMUDEZ-AGUIRRE, D; WEMLINGER, E; PEDROW, P; BARBOSA-CANOVAS, G; GARCIA-PEREZ, M. Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. **Food Control**, n.34, p. 149-157, 2013.

BOUCHER, R.M. State of the art in gas plasma sterilization. **Medical Device and Diagnostics Industry**, n. 7, p.51-56, 1985.

BOURKE, P; ZIUZINA, D; BOEHM, D; CULLEN, P.J; KEENER, K. The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. **Trends in Biotechnology**, p.1-12, 2018.

CHIRST, D; SAVI, G.D; SCUSSEL, V.M. Effectiveness of Ozone Gas in Raw and Processed Food for Fungi and Mycotoxin Decontamination - A Review. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, n.6, p.326-348, 2016.

CHU, P.K. Enhancement of surface properties of biomaterials using plasma-based technologies. **Surface and Coatings Technology**, n.201, p.8076–8082, 2007.

COSTA, M.C; DELIZA, R; ROSENTHAL, A. Revisão: Tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, n.17, p. 187-210, 1999.

CRITZER, F. J; KELLY-WINTENBERG, K; SOUTH, S. L; GOLDEN, D. A. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. **Journal of Food Protection**, n.70, p.2290–2296, 2007.

CULLEN, P.J; TIWARI, B.K; O'DONNELL, C.P; MUTHUKUMARAPPAN, K. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Sc Technol.**, n.20, p.125-36, 2009.

CULLEN, P.J; LALOR, J; SCALLY, L; BOEHM, D; MILOSAVLJEVIĆ, V; BOURKE, P; KEENER, K. Translation of plasma technology from the lab to the food industry. **Plasma Processes and Polymers**, p.1-11, 2017.

DASAN, B.G; MUTLU, M; BOYACI, I.H. Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. **International Journal of Food Microbiology**, p. 50–59, 2016.

DENG, S; RUAN, R; MOK, C.K; HUANG, G; LIN, X; CHEN, P. Inactivation of *Escherichia coli* on almonds using nonthermal plasma. **Journal of Food Science**. n.72, p.62-66, 2007.

DEVI, Y; THIRUMDAS, R; SARANGAPANI, C; DESHMUKH, R.R; ANNAPURE, U.S. Influence of cold plasma on fungal growth and

- aflatoxins production on groundnuts. **Food Control**, n.77, p.187-191, 2017.
- EL-AZIZ, A; MAHMOUD, M.F; ELARAGI, E.A; GA. M. Non thermal plasma for control of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, n.59, p.215 – 221, 2014.
- FRIDMAN, G; CHIROKOV, A; GUTSOL, A. Non-thermal atmospheric pressure discharges. **Journal of Physics D: Applied Physics**, n.38, p.1-24, 2005.
- FRIDMAN, G; BROOKS, A; BALASUBRAMANIA, N; FRIDMAN, A; GUTSOL, A; et al. Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria. **Plasma Processes and Polymers**, n.4, p.370–375, 2007.
- FROHLING, A; DUREK, J; SCHNABEL, U; EHLBECK, J; BOLLING, J; SCHLUTER, O. Indirect plasma treatment of fresh pork: decontamination efficiency and effects on quality attributes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n.16, p.381–390, 2012.
- GOGATE, P.R; PANDIT, A.B. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. **Advances in Environmental Research.**, n.8, p.501-51, 2004.
- GUO, J; HUANG, K; WANG, J. Bactericidal effect of various nonthermalplasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: a review. **Food Control**, n.50, p.482–490, 2015.
- GUROL, C; EKINCI, F.Y; ASLAN, N; KORACHI, M. Low temperature plasma for decontamination of *E. coli* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, n.157, p.1-5, 2012.
- GUZEL-SEYDIM, Z.B; GREENE, A.K; SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **LWT -Food Science and Technology**, n.37, p.453-60, 2004.
- HWANG, E.S; CASH, J.N; ZABIK, M.J. Postharvest treatments for the reduction of mancozeb in fresh apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, n.49, p.3127-32, 2001.

HELHEL, S; OKSUZ, L; RAD, A.Y. Silicone catheter sterilization by microwave plasma; argon and nitrogen discharge international. **Journal of Infrared, Millimeter and Terahertz Waves**, n.26, p. 1613–1625, 2005.

HEO, N.S; LEE, M.K; KIM, G.W; LEE, S.J; PARK, J.Y; PARK, T.J. Microbial inactivation and pesticide removal by remote exposure of atmospheric air plasma in confined environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n.117, p.81–85, 2014.

HOJNIK, N; CVELBAR, U; KALCHER, G.T; WALSH, J.L; KRIZAJ, I. Mycotoxin Decontamination of Food: Cold Atmospheric Pressure Plasma versus “Classic” Decontamination. **Toxins**, n.151, p.1-19, 2017.

HOOVER, D.G. Minimally processed fruits and vegetables: reducing microbial load by nonthermal physical treatments. **Food Technology**, v. 51, n. 6, p. 66-69, June 1997.

ISTADI, N. A. S. A. Co-generation of synthesis gas and C<sub>2</sub>C hydrocarbons from methane and carbon dioxide in a hybrid catalytic-plasma reactor: A review. **Fuel**. n.85, p.577 – 592, 2006.

JIANG, J; LU, Y; LI, J; LI, L; HE, X; SHAO, H; DONG, Y. Effect of seed treatment by cold plasma on the resistance of tomato to *Ralstonia solanacearum* (Bacterial Wilt). **PloS one**, n.9, p.97753, 2014.

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** n.37, p.371–82, 2001.

KHADRE, M.A; YOUSEF, A.E; KIM, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**. n. 66, p.1242-52, 2001.

KIM, J.G; YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone, **Journal of Food Science**. n.65, p. 521–528, 2000.

KIM, B; YUN, H; JUNG, S; JUNG, Y; JUNG, H; CHOE, W. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated

onto bacon using two different gas compositions. **Food Microbiology**, n.28, p.9–13, 2011.

KIM, J. S; LEE, E. J; CHOI, E. H; KIM, Y. J. Inactivation of *Staphylococcus aureus* on the beef jerky by radio-frequency atmospheric pressure plasma discharge treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, n.22, p.124–130, 2014.

KORACHI, M; OZEN, F; ASLAN, N; VANNINI, L; GUERZONI, M. E; GOTTARDI, D; EKINCI, F. Y. Biochemical changes to milk following treatment by a novel, cold atmospheric plasma system. **International Dairy Journal**, n.42, p.64–69, 2015.

KUNZ, A; PERALTA-ZAMORA, P; DE MORAES, S.G; DURAN, N. New tendencies on textile effluent treatment. **Química Nova**. n.25, p.78-82, 2002.

LACOMBE, A; NIEMIRA, B.A; GURTLER, J. B; FAN, X; SITES, J; BOYD, G; CHEN, H. Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes. **Food Microbiology**, n.46, p.479–484, 2015.

LEE, H. J; JUNG, H; CHOE, W; HAM, J. S; LEE, J. H; JO, C. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on agar and processed meat surfaces by atmospheric pressure plasma jets. **Food Microbiology**, n.28, p.1468–1471, 2011.

LIU, C. J; XU, G. H; WANG, T. Non-thermal Plasma Approaches in CO<sub>2</sub> Utilization. **Fuel Processing Technology**. n.58, p.119 – 134, 1999.

LI, M.M; GUAN, E.Q; BIAN, K. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and quality evaluation of ozonised wheat. **Food Additives Contaminants: Part A-Chem Anal Control Expo Risk Assess**. n. 32, p.544-53, 2014.

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**, n.39, p. 33–44, 2003.

MENNAD, B; HARRACHE, Z; AMIR AID, D; BELASRI, A. Theoretical investigation of ozone production in negative corona discharge. **Current Applied Physics**, n.10, p.1391-1401, 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**. n.47, p. 249-54, 2011.

MIR, S.A; SHAH, M.A; MIR, M.M. Understanding the role of plasma technology in food industry. **Food and Bioprocess Technology**, n.9, p.734–750, 2016.

MISRA, N. N; PANKAJ, S. K; WALSH, T; O'REGAN, F; BOURKE, P; CULLEN, P. J. In-package nonthermal plasma degradation of pesticides on fresh produce. **Journal of Hazardous Materials**, n.271, p.33-40, 2014.

MISRA, N. N; PATIL, S; MOISEEV, T; BOURKE, P; MOSNIER, J. P; KEENER, K. M; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. **Journal of Food Engineering**, p.125-138, 2014.

MISRA, N. N; KAUR, S; TIWARI, B. K; KAUR, A; SINGH, N; CULLEN, P. J. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. **Food Hydrocolloids**, n.44, p.115–121, 2015.

MOHAMMADI, S; IMANIL, S; DORRANIAN, D; TIRGARI, S; SHOJAEE, M. The effect of non-thermal plasma to control of stored product pests and changes in some characters of wheat materials. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, n.7, p.150-156, 2015.

MOON, S. Y; KIM, D. B; GWEON, B; CHOE, W; SONG, H. P; JO, C. Feasibility study of the sterilization of pork and human skin surfaces by atmospheric pressure plasmas. **Thin Solid Films**, n.517, p.4272–4275, 2009.

NIEMIRA, B. A. Decontamination of foods by cold plasma. In D. Sun (Ed.), **Emerging Technologies for Food Processing**, 2ed. p. 327–333. UK: Academic, 2014.

NIEMIRA, B.A; GUTSOL, A. **Nonthermal plasma as a novel food processing technology**. In Nonthermal Processing Technologies for Food, ed. HQ Zhang, G Barbosa-C´anovas, VM Balasubramaniam, P Dunne, D Farkas, J Yuan, pp. 271–88. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2010.

NIEMIRA, B. A; SITES, J. Cold plasma inactivates Salmonella Stanley and Escherichia coli O15:H7 inoculated on golden delicious apples. **Journal of Food Protection**, n.71, p.1357–1365, 2008.

ONG, K.C; CASH, J.N; ZABIK, M.J; SIDDIQ, M; JONES, A.L. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. **Food Chemistry**, n.55, p.153-60, 1996.

OUF, S. A; BASHER, A. H; MOHAMED, A.A.H. Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of *Aspergillus niger* contaminating date palm fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.95, p.3204–3210, 2015.

PALOU, L; CRISOSTO, C.H; SMILANICK, J.L; ADASKAVEG, J.E; ZOFFOLI, J.P. Effects of Continuous 0.3 Ppm Ozone Exposure on Decay Development and Physiological Responses of Peaches and Table Grapes in Cold Storage. **Postharvest Biology and Technology** n.24, p.39–48, 2002.

PANKAJ, S.K; BUENO-FERRER, C; MISRA, N.N. Applications of cold plasma technology in food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, n.35, p.5–17, 2014.

PARK, B.J; TAKATORI, K; SUGITA-KONISHI, Y; KIM, I.H; LEE, M.H; HAN, D.W; CHUNG, K.H; HYUN, S.O; PARK, J.C. Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. **Surface and Coatings Technology**. n.201, p.5733–5737, 2007.

PASQUALI, F; STRATAKOS, A.C; KOIDIS, A; BERARDINELLI, A; CEVOLI, C; RAGNI, L; MANCUSI, R; MANFREDA, G; TREVISANI, M. Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: a feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). **Food Control**, n.60, p.552–559, 2016.

PEREZ, A.G; SANZ, C; RIOS, J.J; OLIAS, R; OLIAS, J.M. Effects of Ozone Treatment on Postharvest Strawberry Quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** n.47, p.1652–56, 1999.

PERNI, S; SHAMA, G; KONG, M. G. Cold atmospheric plasma disinfection of cut fruit surfaces contaminated with migrating microorganisms. **Journal of Food Protection**, n.71, p.1619–1625, 2008.

PHAN, K.T.K; PHAN, H.T; BRENNAN, C.S; PHIMOLSIRIPOL, Y. Nonthermal plasma for pesticide and microbial elimination on fruits and vegetables: an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, n.52, p.2127-2137, 2017.

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

PRABHA, V.; BARMA, R.D.; SINGH, R.; MADAN, A. Ozone Technology in Food Processing: A Review. **Trends in Biosciences** n.8, p. 4031-4047, 2015.

RESTAINO, L; FRAMPTON, E.W, HEMPHILL, J.B, PALNIKAR, P. Efficacy of ozonated water against various food related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, n.61, p. 3471-5, 1995.

ROD, S.K; HANSEN, F; LEIPOLD, F; KNOCHEL, S. Cold atmospheric pressure plasma treatment of ready-to-eat meat: inactivation of *Listeria innocua* and changes in product quality. **Food Microbiology**, n.30, p. 233–238, 2012.

RODRIGUES, K.L; GOMES, J.P; CONCEIÇÃO, R.C.S; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Condições higiênic-sanitárias no Comércio Ambulante de Alimentos em Pelotas-RS. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.23, p.447-452, 2003.



ROWAN, N; ESPIE, S; HARROWER, J; ANDERSON, J; MARSILI, L; MACGREGOR, S. Pulsed-Plasma Gas-Discharge Inactivation of Microbial Pathogens in Chilled Poultry Wash Water. **Journal of Food Protection**. n.70, p. 2805-2810, 2007.

SARANGAPANI, C; DEVI, Y; THIRUNDAS, R; ANNAPURE, U. S; DESHMUKH, R. R. Effect of low-pressure plasma on physico-chemical properties of parboiled rice. **LWT–Food Science and Technology**, n.63, p.452–460, 2015.

SARRON, E; COCHET, N; GADONNA-WIDHEM, P. Effects of aqueous ozone on *Pseudomonas syringae* viability and ice nucleating activity. **Process Biochemistry**. n.48, p.1004-9, 2013.

SAVI, G.D; PIACENTINI, K.C; BITTENCOURT, K.O; SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticumaestivum*L.) quality and germination. **Journal of Stored Products Research**. n. 59, p.245-53, 2014.

SCHNEIDER, J; BAUMGARTNER, K.M; FEICHTINGER, J; KRUGER, J; MURANYI, P; SCHULZ, A; WALKER, M; WUNDERLICH, J; SCHUMACHER, U. Investigation of the practicability of low-pressure microwave plasmas in the sterilisation of food packaging materials at industrial level. **Surface and Coatings Technology**. n.200, p.962–966, 2005.

SCHOLTZ, V; PAZLAROVA, J; SOUSKOVA, H; KHUN, J; JULAK, J. Nonthermal plasma-A tool for decontamination and disinfection. **Biotechnology Advances**, n.33, p.1108–1119, 2015.

SCUSSEL, V.M. **Fungos em Grãos Armazenados**. In Armazenagem de grãos, edited by I. Lorini, L.H. Miike, and V.M. Scussel, 675–691. Campinas: Biogeneziz, 2017.

SELCUK, M; OKSUZ, L; BASARAN, P. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. **Bior.Technology**. n.99, p.5104–5109, 2008.

SEGAT, A; MISRA, N.N; CULLEN, P.J; INNOCENTE, N. Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of

alkaline phosphatase. **Food and Bioproducts Processing**, n. 98, p.181–188, 2016.

SHARMA, R.R; DEMIRCI, A; BEUCHAT, L.R; FETT, W.F. Application of ozone for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on inoculated alfalfa sprouts. **Journal of Food Processing and Preservation**. n.27, p. 51-64, 2003.

SHARMA, R.R; DEMIRCI, A; PURI, V.M; BEUCHAT, L.R; FETT, W.F. Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds during exposure to ozonated or electrolyzed oxidizing water. **Trans Asae**. n.7, p.173-81, 2004.

SHI, X.M; ZHANG, G.J; WU, X.L; LI, Y.X; MA, Y; SHAO, X. J. Effect of low-temperature plasma on microorganism inactivation and quality of freshly squeezed orange juice. **Plasma Science, IEEE Transactions on**, n.39, p.1591–1597, 2011.

SHÜLTER, O; EHLBECK, J; HERTEL, C; HABERMEY, M; ROTH, A; ENGEL, K.H; HOLZHAUSER, T; KNORR, D; EISENBRAND, G. Opinion on the use of plasma process for treatment of foods. **Molecular Nutrition & Food Research**. n.57, p.920-927, 2013.

SICILIANO, I; SPADARO, D; PRELLE, A; VALLAURI, D; CAVALLERO, M.C; GARIBALDI, A; GULLINO, M.L. Use of cold atmospheric plasma to detoxify hazelnuts from aflatoxins. **Toxins**. n.8, p. 1-10, 2016.

SIVAPALASINGAM, S; FRIEDMAN, C.R; COHEN, L; TAUXE, RV. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**. n. 67, p. 2342–53, 2004.

SONG, H.P.B; KIM, J.H; CHOE, S; JUNG, S.Y; MOON,W; CHOE, C.J. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, n.26, p.432–436, 2009.

SUHEM, K; MATAN, N; NISOA, M; MATAN, N. Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold

atmospheric plasma treatment. **International Journal of Food Microbiology**, n.161, p. 107-111, 2013.

TATAPUDI, P; FENTON, J.M. Simultaneous Synthesis of Ozone and Hydrogen Peroxide in a Proton- Exchange- Membrane Electrochemical Reactor. **Journal of the Electrochemical Society**, n.141, p.1174-1178, 1994.

TENDERO, C; TIXIER, C; TRISTANT, P; DESMAISON, J; LEPRINCE, P. Atmospheric pressure plasmas: a review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, n.61, p. 2-30. 2006.

TORLAK, E; SERT, D; ULCA, P. Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. **International Journal of Food Microbiology**. n.165, p. 276-80, 2013.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. **Food Technology**, n.33, p.58–63, 1999.

TROMPETER, F.J; NEFF, W. J; FRANKEN, O; HEISE, M; NEIGER, M; LIU, S; PIETSCH, G.J; SAVELJEW, A. B. Reduction of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* spores using nonthermal atmospheric gas discharges. **IEEE Transactions on plasma science**, n.30, p. 1416-1423, 2002.

USEPA. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual: United States Environ Prot Ag. EPA 815-R-99-014; 1999.

U.S. FDA - Food Drug Admin. (2008). Final Rule (73 FR 49593). Irradiation in the production, processing and handling of food. 21 CFR Part 179  
<http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm093651.htm>

VEGA-MERCADO, H; MARTÍN-BELLOSO, O; QIN, B.L; CHANG, F.J; GÓNGORA-NIETO, M.M; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V; SWANSON, B.G. Non-thermal food preservation: pulsed electric fields. **Trends in Food Science & Technology**, n. 8, p. 151-156, 1997.

WANG, S.Q; HUANG, G.Q; LI, Y.P; XIAO, J.X; ZHANG, Y; JIANG, W.F. Degradation of aflatoxin B1 by low- temperature radio frequency

plasma and degradation product elucidation. **Eur Food Res Technol**, n.241, p.103–113, 2015.

YONG, H. I; KIM, H. J; PARK, S; ALAHAKOON, A. U; KIM, K; CHOE, W; JO, C. Evaluation of pathogen inactivation on sliced cheese induced by encapsulated atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. **Food Microbiology**, n.46, p. 46–50, 2015.

ZIUZINA, D; PATIL, S; CULLEN, P. J; KEENER, K.M; BOURKE, P. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella entericaserovar Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. **Food Microbiology**, n.42, p.109–116, 2014.

**6 CAPÍTULO 5**  
**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO PLASMA A FRIO NAS**  
**ESPÉCIES DE FUNGOS TOXIGÊNICOS DOS GÊNEROS**  
*Aspergillus, Fusarium E Penicillium.*



## **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO PLASMA A FRIO NAS ESPÉCIES DE FUNGOS TOXIGÊNICOS DOS GÊNEROS *Aspergillus*, *Fusarium* E *Penicillium*.**

### **RESUMO**

Os efeitos antifúngicos do plasma a frio (PF) na exposição a fungos toxigênicos foram avaliados. O PF foi formado por reator tipo jato de plasma em descarga de barreira dielétrica (DBD), corrente alternada, tensão de 8,5kV e potência de 240 W, o que inibiu eficientemente o crescimento das colônias fúngicas de *A. flavus* e *F. verticillioides* no tempo de 10 min de exposição e *P. citrinum* por 20 min. Nos parâmetros testados, a exposição ao PF foi capaz de inibir o crescimento fúngico, ocasionou alterações morfológicas nas hifas e produção de ROS em todos os fungos testados, devido ao estresse oxidativo. Esse tipo de tratamento mostrou ser eficaz na inativação fúngica, sendo uma solução aos problemas à contaminação em alimentos.

### **1. INTRODUÇÃO**

Fungos são responsáveis pela deterioração de grãos e alimentos completos. Causam inúmeras perdas econômicas, pois estão associados à redução de nutrientes, perda de germinação e descoloração dos alimentos. Quando expostos a condições ambientais ótimas como alta temperatura e umidade, algumas espécies de fungos toxigênicos podem produzir micotoxinas (LAZZARI, 1997; BRASE et al. 2009).

Eles podem ter origem no campo, como os fungos do gênero *Fusarium* ou durante a armazenagem como os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As principais toxinas produzidas por esses três gêneros incluem: aflatoxinas, ocratoxina A, citrinina, tricotecenos, fumonisinas e zearalenona (SCUSSEL, 2017). Esses metabólitos causam intoxicação aguda ou crônica além de danos à saúde humana e animal após a ingestão de alimentos contaminados (MARASAS e NELSON 1987; SCUSSEL, 2017).

Para controle desses fungos, são amplamente utilizados fungicidas sintéticos, que deixam resíduos nos alimentos e ambiente (solo, água e ar), e apresentam toxicidade, quando utilizados em excesso, para humanos e animais (BOOBIS et al., 2008). Assim, outras alternativas de descontaminação segura de fungos passaram a ser estudada. Uma dessas tecnologias é a ozonização. O ozônio (O<sub>3</sub>) é um potente agente antimicrobiano devido à sua capacidade oxidante, sua utilização é segura

já que o mesmo é espontaneamente convertido em oxigênio (O<sub>2</sub>), sendo seu uso seguro (KHADRE et al., 2001).

O plasma a frio (PF), tecnologia mais recente que a ozonização, é também utilizado como descontaminante de microrganismos em grãos e alimentos (HELHEL; OKSUZ; RAD, 2005; SCHNEIDER et al, 2005; CHU, 2007). Esse gás apresenta tratamento uniforme, pode executar a atividade a baixa temperatura não alterando sabor, odor e estrutura do alimento, além de não deixar resíduos (NIEMIRA; GUTSOL, 2010).

O PF é formado a partir da excitação de um gás ou mistura de gases mediante aplicação de uma pressão e energia, podendo ser esta última mecânica, térmica, nuclear ou a mais comum por via corrente elétrica (MISRA et al., 2014).

Os mecanismos pelos quais o PF inativa os microrganismos é causando danos às membranas celulares por radiação ultravioleta (UV) e pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), incluindo oxigênio atômico, ozônio, óxido nítrico e dióxido de nitrogênio (GALLAGHER et al., 2007; LAROUSSI; LEIPOLD, 2004). O ROS e RNS são os principais agentes bactericidas e fungicidas (MISRA et al., 2016).

O processo de inativação desses microrganismos pelo PF começa com a interação entre esses agentes ativos e a superfície das células do microrganismo, causando sua ruptura celular (BOURKER et al., 2018). A inativação bacteriana e fúngica pelo PF é fortemente dependente não apenas do gás formador de plasma, mas também dos fatores intrínsecos do substrato em que esses microrganismos se encontram como sua atividade de água, estado da superfície, teor de proteína, gordura e pH (LACOMBE et al., 2015; LEE et al., 2011).

Trabalhos com a utilização de PF como agente descontaminante em fungos nos alimentos foram publicados em menor quantidade, quando comparado aos estudos envolvendo bactérias (LACOMBE et al., 2015; MIR et al., 2016; SARANGAPANI et al., 2015; BERMUDEZ-AGUIRRE et al., 2013). Os alimentos mais estudados foram a oleaginosas (pistache, amêndoas, amendoim e avelãs), tâmaras e em sementes de fruta e grãos (tomate, trigo, feijão, aveia, soja, cevada, milho e centeio), já em relação aos fungos os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais testados quanto a atividade antifúngica do PF (SELCUK; OKSUZ; BASARAN, 2008; SUHEM et al., 2013; DASAN et al., 2016).

No entanto, são poucos os trabalhos encontrados na literatura que avaliam o efeito do plasma a frio no crescimento das colônias e na morfologia de fungos toxigênicos. Assim, objetivo deste trabalho foi explorar os efeitos antifúngicos in vitro do plasma a frio em diferentes



espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, onde o crescimento de colônias e alterações de hifas (morfologia, mortalidade e espécies reativas do oxigênio) foram destacados pela aplicação de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência (FM).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Cepas fúngicas: *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum* obtidas do Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares (LABMICO), da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

Equipamentos: microscópio eletrônico de varredura (MEV), JEOL (Peabody, MA, USA); microscópio de fluorescência (MF), Leica (Leider, IL, EUA). Revestidor de ouro (Au), modelo SCD500, Leica (Leider, IL, EUA); autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brasil); capela de fluxo laminar, Veco (Campinas, SP, Brasil); estufa microbiológica, Quimis (Diadema, SP, Brasil). Reator tipo jato de plasma com barreira dielétrica. Uma fonte de corrente alternada de alta tensão ( $\pm 17$  kV) e corrente 30 mA foi empregada para gerar o plasma a 240 W. A fonte de alta tensão foi ligada a um transformador Variac ATV-215-MP (220-240V; 60 Hz; 6,3 A; 1-1,5 kVA) que é usado para controlar a tensão elétrica entregue ao reator e ar comprimido foi utilizado como gás plasmogênico.

Meio de cultura e reagentes: meio de cultura ágar batata-dextrose (PDA), Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brasil), glutaraldeído 2,5%, Neon (Suzano, SP, Brasil), álcool etílico, Synth (Diadema, SP, Brasil), cloranfenicol, dimetilsulfóxido e diacetato de 2,7-diclorohidrofluoresceína (H2DCF-DA) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Aplicação de plasma a frio: um disco (4 mm) de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *P. citrinum*, retirados da borda da cultura fúngica com 7 dias foram colocados no interior do reator individualmente em uma placa Petri contendo meio de cultura PDA. Os fungos tratados no reator foram submetidos a uma corrente 30 mA e uma tensão de  $\pm 8,5$  kV, gerando uma potência de 240 W e expostos por 10 min e 20 min (Figura 1), enquanto os fungos controles não receberam nenhum tratamento. Após, tanto os fungos tratados quanto o controle, foram incubados a 25 °C por 8 dias. A eficiência do tratamento com PF foi avaliada até o 8º dia após a

incubação medindo o diâmetro da colônia de fungos (em mm) (FRATERNALE et al. 2003; SAVI & SCUSSEL, 2014).



Figura 1. (a) Reator de plasma a frio (PF) tipo jato de plasma com descarga em barreira dielétrica; (b) colônia fúngica (*Aspergillus flavus*) controle e (c) mesma colônia fúngica após 8 dias de tratamento por PF.

**Morfologia:** para verificar alterações morfológicas nos fungos tratados com PF, foram realizadas análises de MEV. As seções de fungos tratados e controle foram coletadas, fixadas com glutaraldeído 2,5% para preservar as estruturas fúngicas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e desidratadas com solução alcoólica (50, 60, 70, 80, 90 e 100%). Posteriormente, foram preparados para análise de MEV como segue: as seções foram fixadas em stubs (diâmetro de 1,2 mm, 0,8 mm de altura), colocadas no suporte Au Coater, aplicado a vácuo (até 104 mBar) e revestidos com uma camada Au 1,40 nm. Os stubs foram transferidos para MEV, submetidos novamente à visualização da morfologia a vácuo, os fungos foram identificados em diferentes ampliações e registrados por micrografias (tomadas a uma tensão de 0,5–30 kV) (BRAY, 2000).

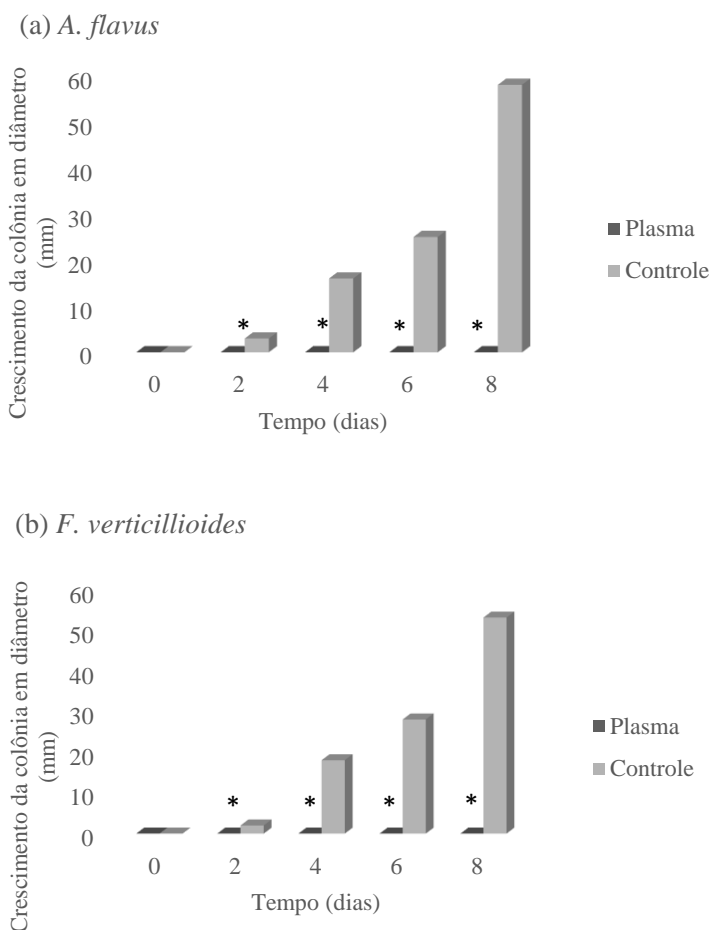
**Produção de ROS:** as hifas tratadas e de controle receberam 40  $\mu$ M de H2DCF-DA por 30 min a 28° C no escuro. O sedimento foi lavado (3 $\times$ ) com PBS e analisado por FM em aumento de 300 $\times$ . A produção de ROS foi observada pela coloração de hifas fluorescentes verdes (SEMIGHINI e HARRIS 2010). A presença de fluorescência das hifas fúngicas foi observada em cada área da lâmina do microscópio.

**Análise Estatística:** os dados de crescimento de colônias de fungos e mortalidade de hifas foram analisados pela análise de variância (ANOVA). Todas as análises foram expressas com média e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3. RESULTADOS

#### Efeito do plasma a frio no crescimento fúngico

As cepas de fungos tratados com plasma a frio não apresentaram crescimento até o 8º dia de incubação (Figura 2). Para a inativação completa as cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides* foram expostas ao plasma durante 10 min, já para o *P. citrinum* a inativação só ocorreu após 20 min de exposição ao tratamento.



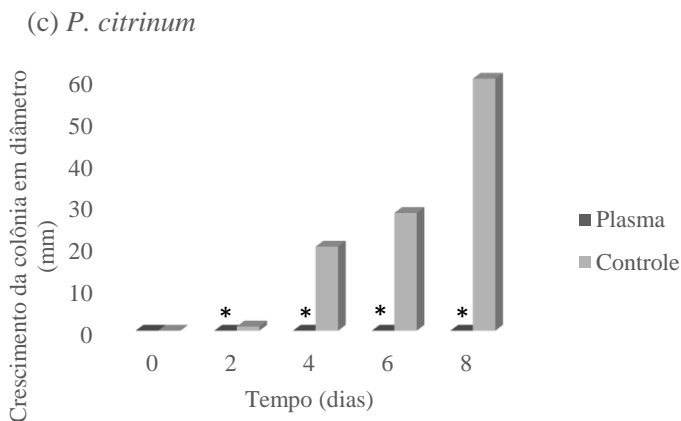


Figura 2. Efeitos do plasma a frio em diferentes espécies de fungos sobre o crescimento da colônia: (a) *Aspergillus flavus*, (b) *Fusarium verticillioides* (exposição de 10 min) e (c) *Penicillium citrinum* (exposição de 20 min), (os dados são apresentados como valores médios do diâmetro dos fungos). Os símbolos indicam estatisticamente significantes quando comparados com o grupo controle \* $p < 0,05$ .

### Efeito do plasma a frio na alteração das hifas: morfologia e produção de ROS

a) Morfologia: todos os fungos tratados apresentaram deformações e rupturas na estrutura das hifas e conídios (Figura 3). A exposição ao plasma a frio provocou alterações morfológicas nos fungos, podendo resultar em rupturas da membrana celular fúngica e inativação, impedindo seu crescimento.

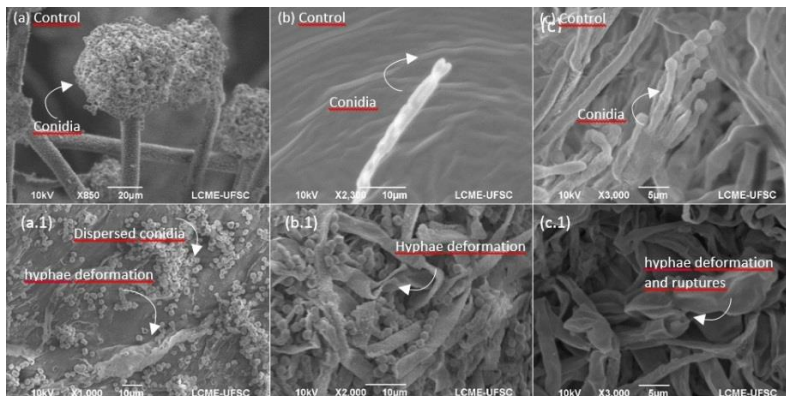


Figura 3. Efeito do plasma a frio (10 min de exposição) na morfologia das hifas de (a) *Aspergillus flavus*, (b) *Fusarium verticillioides*, e (20 min exposição) (c) *Penicillium citrinum*. [Controle: sem tratamento (a,b,c.); Tratamento com plasma a frio: (a.1, b.1, e c.1)]. Microscopia eletrônica de varredura, 850, 1.000, 2.000 e 3.000× de aumento.

(b) Produção de ROS: todos os fungos após o tratamento mostraram uma forte intensidade de fluorescência verde dentro da estrutura da hifa devido à formação de ROS intracelular (Figura 4). Essa produção de ROS pode estar relacionada ao estresse químico causado pela exposição ao gás  $O_3$  formado durante o processo de plasma a frio, o que era esperado, já que o  $O_3$  é um forte reagente oxidante.

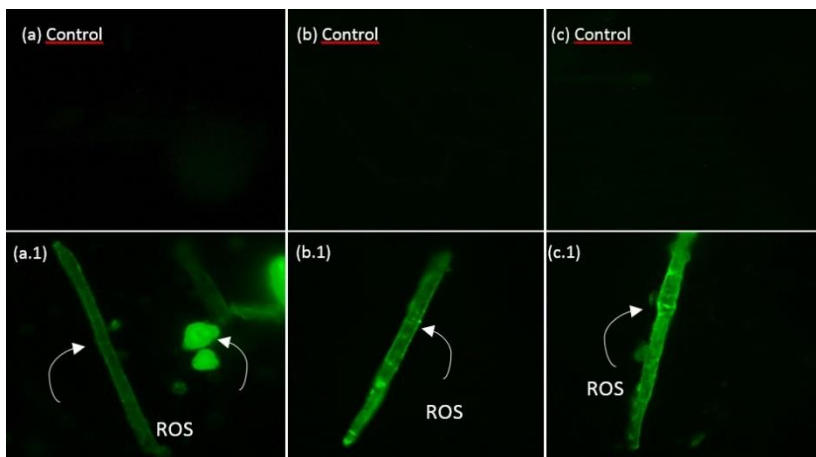


Figura 4. Efeito do diacetato de 2,7-diclorohidrofluoresceína em fungos tratados com plasma frio (exposição de 10 min) (a) *Aspergillus flavus*, (b) *Fusarium*

*verticillioides*, e (exposição de 20 min) (c) *Penicillium citrinum* [Controle: sem tratamento (a, b, c); Tratamento com plasma frio: desenvolvimento de fluorescência de hifas (após produção de ROS - a.1, b.1, c.1)]. Imagens microscopia de fluorescência, 300 × aumento.

#### 4. DISCUSSÃO

Estratégias de inativação e descontaminação fúngica com aplicação PF foram realizadas em diversos estudos em alimentos (DASAN et al. 2016; MIR et al. 2016; OUF et al. 2015; BASARAN et al. 2008). No entanto, existem poucos estudos que relatam o mecanismo de ação da exposição ao PF em fungos filamentosos (SIMONCICOVÁ et al. 2018; DEVI et al. 2017) e em algumas espécies toxigênicas utilizadas nesse trabalho.

Neste estudo, a resistência ao tratamento foi diferente no fungo *P. citrinum*, que precisou de um tempo maior de exposição (20 min) ao PF para a inativação, comparado ao *A. flavus* e *F. verticillioides* que foram necessários apenas 10 min de exposição ao tratamento para a inativação. Suhem et al. (2012), observaram a inibição completa de *A. flavus* em meio de cultura por PF tipo jato após 25 min de tratamento a 40 W.

O efeito do jato PF também foi verificado no crescimento de bolores de pães, incluindo *A. flavus*, *A. niger*, *Rhizopus stolonifer* e *Penicillium roqueforti*. Usando potência geradora de plasma a 24 W por 5, 10 e 20 min de exposição ao tratamento, os autores observaram que o tempo de 20 min é mais eficaz em retardar o crescimento dos fungos. Todos os crescimentos de fungos diminuíram proporcionalmente ao aumento do tempo de tratamento de PF. O *A. flavus* foi o que obteve a maior redução (83%) com um tempo máximo de exposição. Enquanto *A. niger*, *R. stolonifer* e *P. roqueforti* foram inativados pelo jato de PF, aproximadamente 75%, 71% e 48%, respectivamente (THONGLOR & AMNUAYCHEEWA, 2017).

Em relação a modificação da estrutura fúngica, na presente pesquisa a exposição PF levou à morte celular de hifas de todos os fungos testados e, conseqüentemente, à inativação do crescimento de fungos. *A. flavus* e *F. verticillioides* podem ser mais sensíveis ao tratamento relacionado ao crescimento de colônias de fungos, do que *P. citrinum*. A morte das células fúngicas pode ocorrer devido a alterações no metabolismo e estresse oxidativo geral, por exemplo, o aumento da formação intracelular de ROS (SAVI & SCUSSEL, 2014).

A presença de ROS no interior das hifas no presente estudo também pode ser notada. Como os principais componentes do ar são

nitrogênio e oxigênio, as espécies reativas são compostas principalmente por ROS, envolvendo O<sub>3</sub>, radicais hidróxidos e RNS (KLÄMPF et al., 2012).

As descargas de plasma criam partículas carregadas e um campo elétrico. Propõe-se que as forças elétricas afetem a membrana celular, o que poderia causar ruptura eletrostática ou, pelo menos, uma permeabilização por um tempo curto (LEDUC et al., 2009). Assim, as moléculas de ROS derivadas do plasma, como os agentes oxidantes como o O<sub>3</sub>, podem penetrar no microrganismo. O ROS pode violar a integridade da estrutura celular pela peroxidação lipídica, resultando em danos na membrana (BIELSKI et al., 1983; POMPL et al., 2009).

Todos os fungos apresentaram maior formação de ROS com exposição ao PF quando comparados ao controle. Assim, é provável que a resposta celular ao PF induziu estresse oxidativo afetando os processos de desenvolvimento das células fúngicas. A formação de ROS desempenha um papel importante na sinalização e homeostase das células aeróbicas saudáveis. Sua produção normalmente ocorre em uma taxa controlada, no entanto, sob estresse químico, pode ser bastante aumentada. Este comportamento é responsável pela morte de células fúngicas devido à produção de células e mutações de ácidos nucléicos e carcinogênese (SAVI & SCUSSEL, 2014; FAORO & IRITI, 2005).

Os resultados obtidos nesse trabalho também podem ser comparados com pesquisas semelhantes utilizando outro processo não térmico de descontaminação como a ozonização. Savi & Scussel (2014) avaliaram os efeitos antifúngicos in vitro do gás O<sub>3</sub> na concentração de 60 µmol/mol em diferentes fungos *F. verticillioides*, *F. graminearium*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *P. citrinum*, em relação ao crescimento de colônias, germinação de conídios e alterações de hifas. Os autores observaram que para *F. graminearium* não houve crescimento após o tratamento de 60 min de exposição ao gás, já para o *P. citrinum* esse crescimento não ocorreu após 120 min de tratamento. Os fungos *F. verticillioides*, *A. parasiticus* e *A. flavus* obtiveram comportamentos semelhantes entre si, e seus crescimentos de colônia foram significativamente menor (52, 63, 60 mm) comparado ao controle (63, 88, 78 mm) no tempo de 120 min de exposição ao O<sub>3</sub>, respectivamente.

Os mesmos autores relataram que todos os fungos apresentaram deformação e ruptura na estrutura das hifas causado pela exposição ao O<sub>3</sub>. As hifas de fungos tratadas apresentaram aumento na produção de ROS. Todos os fungos após o tratamento mostraram uma forte intensidade de fluorescência verde dentro da estrutura da hifa devido à formação de ROS intracelular. Essa produção de ROS verificada nas hifas tratadas pode

estar relacionada a um estresse químico causado pela exposição ao gás O<sub>3</sub> que, como mencionado anteriormente, é um forte reagente oxidante (SAVI & SCUSSEL, 2014).

## **5.CONCLUSÃO**

Todos os fungos foram significativamente afetados pela aplicação do tratamento com plasma a frio. *A. flavus* e *F. verticillioides* necessitaram apenas de 10 min para inativação fúngica, já para *P. citrinum* esse resultado foi obtido com 20 min de tratamento. Este é o primeiro estudo onde foi descrito o efeito do tratamento com PF em fungos toxigênicos, incluindo redução do crescimento micelial, modificações morfológicas de hifas e a indução de ROS.



## REFERÊNCIAS

- BASARAN, P; BASARAN-AKGUL, N; OKSUZ, L. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. **Food Microbiology**, n. 25, p.626–632, 2008.
- BERMUDEZ-AGUIRRE, D; WEMLINGER, E; PEDROW, P; BARBOSA-CANOVAS, G; GARCIA-PEREZ, M. Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. **Food Control**, n.34, p.149–157, 2013.
- BIELSKI, B.H.J; ARUDI, R.L; SUTHERLAND, W.M. A study of the reactivity of perihydroxy radical/superoxide ion with unsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**. n.258, p. 4759-4761, 1983.
- BOOBIS, A.R.; OSSENDORP, B.C; BANASIAK, U; HAMEY, P.Y; SEBESTYEN, I; MORETTO, A. Cumulative Risk Assessment of Pesticide Residues in Food. **Toxicology Letters** n.180, p. 137–150, 2008.
- BOURKE, P; ZIUZINA, D; BOEHM, D; CULLEN, P.J; KEENER, K. The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. **Trends in Biotechnology**, p.1-12, 2018.
- BRASE, S; ENCINAS, A; KECK, J; NISING, C.F. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. **Chemistry Review** n. 109, p.3903–4399, 2009.
- BRAY, D. Critical Point Drying of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy. **Springer Protocols**, n.13, p.235–243, 2000.
- CHU, P.K. Enhancement of surface properties of biomaterials using plasma-based technologies. **Surface and Coating Technology**, n.201, p.8076–8082, 2007.
- DASAN, B.G.; MUTLU, M.; BOYACI, I.H. Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. **International Journal of Food Microbiology**, p.50–59, 2016.

DEVI, Y; THIRUMDAS, R; SARANGAPANI, C; DESHMUKH, R.R; ANNAPURE, U.S. Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. **Food Control**, n.77, p. 187-191, 2017.

FAORO, F; IRITI, M. Cell Death Behind Invisible Symptoms: Early Diagnosis of Ozone Injury. **Biologia Plantarum**, n.49, p.585–592, 2005.

FRATERNALE, D; GIAMPERI, L; RICCI, D. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil Obtained From in vitro Plants of *Thymus mastichina* L. **Journal of Essential Oil Research** n.15, p.278–281, 2003.

GALLAGHER, M.K; VAZE, N; GANGOLI, S; VASILETS, V.N; GUTSOL, A.F; MILOVANOVA, T.N. Rapid inactivation of airborne bacteria using atmospheric pressure dielectric barrier grating discharge. **IEEE Transactions on Plasma Sciences**, n.35, p.1501-1510, 2007.

HELHEL, S; OKSUZ, L; RAD, A.Y. Silicone catheter sterilization by microwave plasma; argon and nitrogen discharge international. **Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves**.n.26, p. 1613–1625, 2005.

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

KLÄMPFL, T.G; ISBARY, G; SHIMIZU, T; LI, Y; ZIMMERMANN, J.L; STOLZ, W; SCHLEGEL, J; MORFILL, G.E; SCHMIDT, H. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. **American Society for Microbiology**, n.5, p. 1-29, 2012.

LACOMBE, A; NIEMIRA, B.A; GURTLER, J. B; FAN, X; SITES, J; BOYD, G; CHEN, H. Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes. **Food Microbiology**, n.46, p.479–484, 2015.

LAROUSSE, F; LEIPOLD, M. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by

air plasmas at atmospheric pressure. **Journal of Mass Spectrometry**, n.233, p.81–86, 2004.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos, rações**. Ed. Do autor, Curitiba-PR, 134p, 1997.

LEDUC, M; GUAY, D; LEASK, R.L; COULOMBE, S. Cell permeabilization using a non-thermal plasma. **New Journal of Physics**. n.11, p.115-21, 2009.

LEE, H. J; JUNG, H; CHOE, W; HAM, J. S; LEE, J. H; JO, C. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on agar and processed meat surfaces by atmospheric pressure plasma jets. **Food Microbiology**, n.28, p.1468–1471, 2011.

MARASAS, W.F.O; NELSON, P.E. *Mycotoxicology*. University Park, PA: Pennsylvania State University, 1987.

MIR, S.A; SHAH, M.A; MIR, M.M. Understanding the role of plasma technology in food industry. **Food and Bioprocess Technology**, n.9, p.734–750, 2016.

MISRA, N. N; PANKAJ, S. K; WALSH, T; O'REGAN, F; BOURKE, P; CULLEN, P. J. In-package nonthermal plasma degradation of pesticides on fresh produce. **Journal of Hazardous Materials**, n.271, p.33-40, 2014.

MISRA, N. N; KAUR, S; TIWARI, B. K; KAUR, A; SINGH, N; CULLEN, P. J. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of wheat flour. **Food Hydrocolloids**, n.44, p.115–121, 2015.

NIEMIRA BA, GUTSOL A. Nonthermal plasma as a novel food processing technology. In **Nonthermal Processing Technologies for Food**, ed. HQ Zhang, G Barbosa-C´anovas, VM Balasubramaniam, P Dunne, D Farkas, J Yuan, pp. 271–88. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2010.

OUF, S. A; BASHER, A. H; MOHAMED, A.A.H. Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of *Aspergillus niger* contaminating date palm

fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.95, p.3204–3210, 2015.

POMPL, R; JAMITZKY, F; SHIMIZU, T; STEFFES, B; BUNK, W; SCHMIDT, H.U; GEORGI, M; RAMRATH, K et al. The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging. **New Journal of Physics**. n.11, p.115-23, 2009.

SARANGAPANI, C; DEVI, Y; THIRUNDAS, R; ANNAPURE, U. S; DESHMUKH, R. R. Effect of low-pressure plasma on physico-chemical properties of parboiled rice. **LWT–Food Science and Technology**, n.63, p.452–460, 2015.

SAVI, G.D; SCUSSEL, V.M. Effects of Ozone Gas Exposure on Toxigenic Fungi Species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* Genera. **Ozone: Science & Engineering**, n.36, p.144–152, 2014.

SCHNEIDER, J; BAUMGA“RTNER, K.M; FEICHTINGER, J; KRUGER, J; MURANYI, P; SCHULZ, A; WALKER, M; WUNDERLICH, J; SCHUMACHER, U. Investigation of the practicability of low-pressure microwave plasmas in the sterilisation of food packaging materials at industrial level. **Surface and Coating Technology**. n.200, p.962–966, 2005.

SCUSSEL, V.M. **Fungos em Grãos Armazenados**. In Armazenagem de grãos, edited by I. Lorini, L.H. Miike, and V.M. Scussel, 675–691. Campinas: Biogeneziz, 2017.

SELCUK, M; OKSUZ, L; BASARAN, P. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. **Bior.Technology**. n.99, p.5104–5109, 2008.

SEMIGHINI, C.P; HARRIS, S.D. Methods to Detect Apoptotic-Like Cell Death in Filamentous Fungi. **Methods in Molecular Biology** n.638, p. 269–279, 2010.

ŠIMONČICOVÁ1, J; KALIŇÁKOVÁ1, B; KOVÁČIK, D; MEDVECKÁ, V; LAKATOŠ, B; KRYŠTOFOVÁ1, S; HOPPANOVÁ1, L; PALUŠKOVÁ1, V; HUDECOVÁ1, D; ŽURINA, P; ZAHORANOVÁ, A. Cold plasma treatment triggers antioxidative defense system and induces changes in hyphal surface and subcellular

structures of *Aspergillus flavus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.102, p.6647–6658, 2017 .

SUHEM, K; MATAN, N; NISOA, M; MATAN, N. Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. **International Journal of Food Microbiology**, n.161, p.107-111, 2013.

THONGLOR, P; AMNUAYCHEEWA, P. Application of atmospheric-pressure argon plasma jet for bread mold decontamination. In: IOP Conf. Series: **Journal of Physics: Conf. Series** 901 (2017) 012140.



**7 CAPÍTULO 6**  
**PLASMA A FRIO NA DESCONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM**  
**RAÇÕES EXTRUSADAS PARA CÃES INOCULADAS E**  
**NATURALMENTE CONTAMINADAS E SEU PERFIL DE**  
**ÁCIDOS GRAXOS**





# PLASMA A FRIO NA DESCONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM RAÇÕES EXTRUSADAS PARA CÃES INOCULADAS E NATURALMENTE CONTAMINADAS E SEU PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

## RESUMO

A inativação fúngica e efeitos na umidade, conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos pelo plasma a frio (PF) em alimentos extrusados para cães naturalmente contaminados e inoculados com *A. flavus* foram avaliados. O PF foi formado por reator em geometria cilíndrica tipo ponta-plano em descarga de barreira dielétrica (DBD), corrente alternada e potência de 540 W, e descontaminou eficientemente tanto o alimento naturalmente contaminado e inoculado nos dois tempos testados (20 e 40 min). A umidade e atividade de água, assim como a composição dos ácidos graxos não foram alterados pelos tratamentos. No entanto, o conteúdo lipídico das amostras tratadas diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ). De acordo com o presente estudo, é possível inferir que o PF teve um efeito positivo na inativação fúngica em alimentos para cães e pode ser um procedimento promissor, no entanto necessita de uma maior investigação em relação a diminuição lipídica do alimento.

## 1. INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos para animais de estimação têm como objetivo principal proporcionar benefícios nutricionais, estéticos e de desempenho para uma melhor qualidade de vida do animal. Na composição desses alimentos estão presentes principalmente produtos agrícolas como grãos, que podem apresentar uma variedade de contaminantes.

A principal técnica empregada para prevenir ou retardar a contaminação nesses alimentos é a aplicação de parâmetros, como a redução da atividade de água ( $a_w$ ), redução do pH e uso de agentes antimicrobianos e antifúngicos (LEISTNER, 1994; COPETTI; 2005). Dentre esses alimentos para animais de estimação, destacam-se as rações secas e extrusadas, nos quais o tratamento térmico durante o processamento é o principal parâmetro para a redução da contaminação microbiológica.

Em relação a contaminação desses alimentos, os fungos são os mais relatados. Essa contaminação pode ocorrer desde a produção e o

armazenamento da matéria-prima de origem animal e de grãos, que são amplamente utilizados na fabricação de rações para várias espécies animais, durante o processamento, na comercialização desse alimento e estocagem do produto final na casa do tutor do animal (GIRIO et al., 2012; DE SOUZA KOERICH & SCUSSEL, 2013).

*Aspergillus flavus* é a espécie predominante responsável pela contaminação fúngica e posterior produção de aflatoxinas (AFLs) principalmente em grãos durante operações e armazenamento pós-colheita (SCUSSEL, 2017). Em estudos avaliando a micobiota em alimentos comerciais para cães, *A. flavus* foi a espécie mais frequentemente encontrada (BUENO et al., 2001; MAIA & SIQUEIRA, 2007; BARBOSA et al., 2014). As AFLs produzidas por esse fungo são predominante e potencialmente mutagênicas, teratogênicas e hepatocarcinogênicas, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1993).

O plasma a frio (PF) é utilizado como método alternativo de descontaminação fúngica em alimentos. Por operar a baixa temperatura esse gás não altera o sabor, odor e estrutura do alimento, no entanto, estudos relatam oxidação lipídica e modificações na composição de ácidos graxos (NIEMIRA; GUTSOL, 2010). Esse gás provoca danos as membranas celulares do microrganismo, impedindo seu desenvolvimento (MISRA et al., 2016).

O PF já foi estudado em diversos alimentos como frutas e grãos (SELCHUK; OKSUZ; BASARAN, 2008; SUHEM et al., 2013; DASAN et al., 2016), no entanto não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando sua eficácia em alimentos para animais de estimação. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a descontaminação fúngica por plasma a frio em alimentos naturalmente contaminados e inoculados com *A. flavus* em ração extrusada para cães, e seu efeito no conteúdo lipídico e no perfil de ácidos graxos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: alimentos comerciais extrusados para animais de estimação do tipo Super-Premium. Principais ingredientes: farinha de vísceras de frango, farinha de salmão, ovo desidratado, proteína isolada de suíno, quirera de arroz, polpa de beterraba, aveia, gordura de frango, óleo de peixe, antioxidantes (BHA e BHT), cloreto de potássio, premix vitamínico e mineral.

Cepas fúngicas: *Aspergillus flavus*, obtida do Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares (LABMICO), da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

Meio de cultura e reagentes: meio de cultura ágar batata-dextrose (PDA), Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brasil), cloranfenicol, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), ácido clorídrico e éter de petróleo, Neon (Suzano, SP, Brasil).

Equipamentos: reator de plasma frio de descarga corona com barreira dielétrica em geometria cilíndrica, fonte de corrente alternada de alta tensão ( $\pm 17$  kV) e corrente 30 mA foi empregada para gerar o plasma a 540 W. A fonte de alta tensão foi ligada a um transformador Variac ATV-215-MP (220-240V; 60 Hz; 6,3 A; 1-1,5 kVA) que é usado para controlar a tensão elétrica entregue ao reator e uma mistura de ar comprimido e gás argônio para a formação do gás plasmogênico. Autoclave, Phoenix (Araraquara, São Paulo, Brasil); incubadora microbiológica, Quimis (Diadema, SP, Brasil); cabine de fluxo laminar, Veco (Campinas, SP, Brasil) e Aqua-Lab, modelo 4TE, Decagon Devices (São José dos Campos, SP, Brasil). Determinador de gordura modelo TE-044, Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil), chapa de aquecimento, Cientec (Belo Horizonte, MG, Brasil) e cromatógrafo a gás, modelo GC-2014 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Aplicação de plasma a frio: 20 g do alimento naturalmente contaminado ( $1 \times 10^2$  UFC/g) e inoculado com *A. flavus* ( $1 \times 10^3$  UFC/g) foram colocados dentro do reator de plasma frio e expostos ao tratamento por 20 min e 40 min, enquanto as amostras controle não receberam nenhum tratamento (Figura 1). Após, tanto as amostras tratadas como a controle passaram pelas análises de carga total fúngica, umidade (mc), aw, extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA) e perfil de ácidos graxos.

Carga total fúngica: as amostras trituradas foram transferidas assepticamente para sacos de polietileno onde adicionou-se água peptona (0,1%), seguida de homogeneização. De cada amostra diluída, as alíquotas foram inoculadas em superfície de meio de cultura PDA contendo cloranfenicol (100 mg/l) e espalhadas de forma homogênea, depois incubadas em estufa microbiológica ( $25 \pm 1$  ° C, 7 dias) (SILVA et al., 2010). Após esse período, as colônias desenvolvidas foram contadas e expressas em unidade formadora de colônias por g (UFC/g).

Determinação de umidade: mc - foi determinado de acordo com o método gravimétrico AOAC (2005) (art. 31.1.02). Cada amostra homogeneizada (2 g) foi colocada em um cadinho de porcelana e seca em estufa (105°C por 8 horas) até peso constante. O resultado foi determinado pela média dos resultados individuais e a aw - obtida por medida de porção de cada amostra (5 g) no aparelho Aqualab (25°C).

Extrato etéreo em hidrólise ácida: o conteúdo lipídico foi determinado pelo método 1443 - Determinação do teor de gordura total (ISO, 1973). Aproximadamente 5 g da amostra foram colocadas em béquer Griffin com 80 ml de ácido clorídrico (4N) e colocadas sobre chapa de aquecimento por 30 min. Após, a solução foi filtrada, e esse filtro colocado em cartucho onde foi encaixado no aparelho Goldfish, as amostras ficaram em contato com o éter de petróleo (1h 30 min), após, o cartucho foi suspenso e ficou sobre gotejamento do éter por 30 min (65°C). O reboiler foi deixado em capela para evaporação total do éter e posteriormente colocado em estufa por 30 min, após esse tempo o reboiler com o conteúdo lipídico foi pesado.

Perfil de ácidos graxos: a composição qualitativa de ácidos graxos foi determinada pela comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos (Sigma, St. Louis, EUA). A composição quantitativa foi obtida por normalização da área e expressa em porcentagem por massa.

Análise estatística: os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) realizados pelo Microsoft Excel, versão 5.0 da Microsoft Inc. Quando foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), as médias de tratamento foram diferenciadas utilizando comparações pareadas aplicando o teste de Tukey.

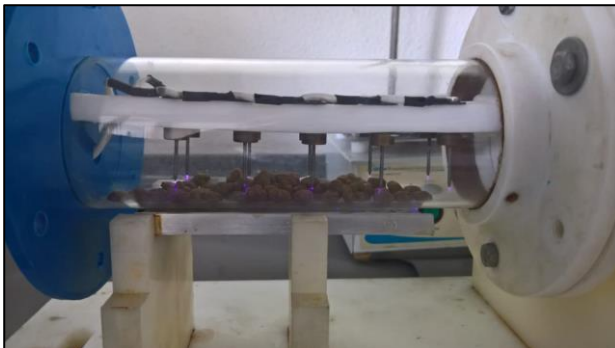


Figura 1. Ração extrusada para cães no interior do plasma frio em geometria cilíndrica

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Plasma frio na descontaminação fúngica

O PF nos parâmetros testados foi eficiente para inativar os fungos presentes no alimento naturalmente contaminado como no alimento inoculado em todos os tempos testados ( $p < 0,05$ ). Foram observados também que não houve diferença significativa no mc e aw entre os tratamentos mantendo os parâmetros de umidade, previamente estabelecidos pela indústria, seguros (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem total fúngica e umidade em alimentos extrusados para cães submetidos ao plasma frio

Tratamento plasma frio Tempo de exposição (min)	Contagem total <sup>a</sup> (UFC/g)	Umidade	
		mc <sup>b</sup> (%)	aw <sup>c</sup>
<i>Naturalmente contaminada</i>			
0	$1 \times 10^2$	8,346	0,586
20	SC <sup>d</sup>	8,616	0,571
40	SC	8,809	0,562
<i>Inoculada com <i>Aspergillus flavus</i></i>			
0	$1 \times 10^3$	8,355	0,598
20	SC	8,458	0,574
40	SC	8,399	0,552

<sup>a</sup>contagem fúngica total; <sup>b</sup>conteúdo de umidade; <sup>c</sup>atividade de água; <sup>d</sup>sem crescimento fúngico

Mecanismos sinérgicos como a interação química entre as espécies reativas do oxigênio (ROS), nitrogênio (RNS) e a membrana celular, danos causados pela radiação ultravioleta (UV) nas membranas, DNA e proteínas dos microrganismos, são as causas pelas quais o PF inativa os fungos e outros microrganismos (PHAN et al., 2017).

O principal ROS de acordo com o estudo de Misra et al. (2016) foi o ozônio (O<sub>3</sub>), considerado um agente fungicida, causando ruptura celular e contribuindo para a inativação fúngica. O grau descontaminante do PF é afetado pelo tipo e população inicial de microrganismos, o meio de inativação, a composição do gás para a geração do plasma e sua taxa de fluxo, bem como estado fisiológico das células (SONG et al., 2009; PHAN et al., 2017).

Os parâmetros utilizados nesse estudo como tempo, mistura dos gases (oxigênio e argônio), potência (540 W) e corrente alternada, foram eficientes para descontaminar os dois alimentos (naturalmente contaminado e inoculado com *A. flavus*) nos tempos de exposição testados. Em trabalho similar, Silva et al. (2018) testaram a inativação de alimentos para cães naturalmente contaminadas em três tipos de reatores de PF (240 W) durante 10 min, e concluíram que todos os reatores testados foram capazes de inativar os fungos.

Em superfícies de avelãs, Dasan et al. (2016) investigaram a descontaminação de *A. flavus* e *A. parasiticus* por PF. Reduções significativas de 4,50 log (UFC/g) em *A. flavus* e 4,19 log (UFC/g) em *A. parasiticus* foram alcançados após 5 minutos de tratamentos 655 W. Não foram observadas também crescimento na carga de *A. flavus* e *A. parasiticus* durante o armazenamento das avelãs tratadas com plasma, enquanto nas amostras de controle os fungos continuaram a crescer em condições de armazenamento (30 dias a 25°C).

Em barras de cereais de arroz, o PF foi utilizado para inibir o crescimento de *A. flavus*. O tratamento foi aplicado na superfície das barras de cereais com potência de 40W e tempo de exposição de 20 min, reduzindo aproximadamente 4 log UFC/g e impedindo também o crescimento do fungo na superfície das barras por pelo menos 20 dias (SUHEM et al., 2013).

Os parâmetros de umidade (mc e aw) não foram alterados. Em estudo com outro método alternativo de descontaminação, a ozonização, os tratamentos nos tempos de 30, 60 e 120 min também não alteraram a umidade, permanecendo abaixo do máximo recomendado, sendo seguro para evitar o crescimento fúngico (SILVA et al., 2018).

### **Efeito do plasma frio no conteúdo lipídico e no perfil de ácidos graxos**

O PF alterou o conteúdo lipídico das amostras submetidas aos tratamentos em relação a amostra controle. Houve uma diminuição dos lipídeos em todas as amostras tratadas com PF (p<0,05). A respeito do

perfil qualitativo e quantitativo dos ácidos graxos, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 2. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos em ração extrusada para cães em diversos tempos de tratamento por plasma frio.

Análises	Tempo de exposição (min) ao plasma frio		
	0	20	40
	média (%)	média (%)	média (%)
<b>EEHA*</b>			
	13,298 <sup>a</sup>	12,224 <sup>b</sup>	11,776 <sup>b</sup>
<b>Ácidos graxos</b>			
C14:0	0,157	0,148	0,155
C15:0	-	0,005	0,014
C16:0	3,022	2,915	3,053
C16:01	0,653	0,624	0,578
C18:0	0,663	0,721	0,810
C18:1n9c	4,999	4,520	4,083
C18:2n6c	3,082	2,182	2,46
C20:1	-	0,160	0,139
C20:3n6c	0,020	-	0,022
C22:0	0,113	0,097	0,129
C20:5n3c	0,127	0,099	0,089
C22:6n3c	0,092	0,069	0,062
Não identificados	0,370	0,684	0,182
Total saturado	3,955	3,886	4,161
Total	5,652	5,304	4,800
monoinsaturado			
Total polinsaturado	3,321	2,350	2,633
Total trans	<0,05	<0,05	<0,05

\*EEHA: extrato etéreo em hidrólise ácida; <sup>a,b</sup>Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes, diferem significativamente entre si ao nível de 5%.

O PF é frequentemente considerado um processo que pode levar a oxidação, assim é essencial analisar sua influência nos lipídios presentes nos alimentos. O tempo do tratamento e o gás usado para gerar o plasma são considerados os principais fatores críticos que afetam os lipídeos (PANKAJ et al., 2018). Os estudos disponíveis sobre os efeitos do PF nos lipídios em diferentes produtos alimentares são muito limitados, a maioria refere-se à oxidação e peroxidação dos lipídios.

Em trabalhos com PF em alimentos avaliando a oxidação lipídica, Thirumdas et al. (2014) constataram em nozes a oxidação com o aumento da exposição ao PF. Isto pode ser porque os radicais são capazes de oxidar moléculas lipídicas (MISRA et al., 2016). Em estudo com arroz marrom, Thirumdas et al. (2016) observaram que a aplicação de plasma não alterou a proteína bruta, lipídeos, cinzas e carboidratos desse alimento.

A redução do conteúdo lipídico dos alimentos que passaram pelos tratamentos de PF foi significativa em relação a amostra controle

( $p < 0,05$ ). Essa redução pode ter sido causada pela ação oxidativa do ROS, como o  $O_3$ , gerado durante a formação do plasma. Essa diminuição no conteúdo lipídico leva a um desbalanceamento da dieta, já que esta é formulada para atender as exigências nutricionais do animal.

Além disso, os lipídios desempenham pelo menos três funções em rações para carnívoros e devem ser observadas antes mesmo do início da formulação. Eles fornecem energia, ácidos graxos essenciais e *flavor*, este último diretamente relacionado ao aroma e paladar do alimento (ZORAN, 2002; FRANÇA et al., 2011). Uma redução significativa do conteúdo lipídico, pode interferir nessas funções.

Em relação ao perfil de ácidos graxos, no presente estudo foi observado que esses não foram afetados pelos tratamentos, não havendo diferença significativa. Os ácidos graxos insaturados estão em maior porcentagem, sendo os monoinsaturados em maior proporção em relação aos poliinsaturados. Os ácidos graxos são fontes energéticas de significativa importância para animais carnívoros, como os cães (CASE et al., 2000).

Ácidos graxos de cadeia longa com duas ou mais insaturações não são sintetizados por mamíferos, se tornando essenciais para estas espécies. Entre estes ácidos graxos destacam-se os precursores dos Ômega 6 e 3 ( $n6$  e  $n3$ ), o ácido linoléico (18:2  $n6$ ) e o ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3  $n3$ ), respectivamente (NRC, 2006).

A ação do PF nos ácidos graxos também foi estudada por Kim et al. (2014), a uma potência de 200 W, pedaços de carne seca foram submetidas ao tratamento durante 5 min. Os autores não observaram diferença significativa na composição dos ácidos graxos presentes na carne, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo. Em outro estudo com carne suína, Ulbin-Figlewicz e Jarmoluk (2015), observaram que após tratamento de 10 min com PF, o período de armazenamento afetou significativamente a proporção de ácidos graxos poliinsaturados, com um aumento de cerca de 3% após 14 dias de armazenamento refrigerado, enquanto o teor de ácidos graxos saturados estava no mesmo nível.

#### 4. CONCLUSÃO

O tratamento com PF utilizado no presente estudo demonstrou sua eficácia na descontaminação de ração extrusada para cães naturalmente contaminadas e inoculadas com *A. flavus*, em todos os tempos avaliados. Os parâmetros e tempos testados não alteraram significativamente o



conteúdo de umidade, atividade de água e composição de ácidos graxos, no entanto, o teor lipídico das rações expostas ao tratamento por PF reduziu, independente do tempo testado. De acordo com o presente estudo, é possível inferir que o PF teve um efeito positivo na inativação fúngica em alimentos para cães e pode ser um procedimento promissor, no entanto, necessita de uma maior investigação em relação a diminuição do lipídio do alimento.



## REFERÊNCIAS

AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg (MD)

BARBOSA, I.P; RODRIGUES, A.M.D; MURATORI, M.C.S; FERREIRA, M.D.S; FILHO, F.C.C; PEREIRA, M.M.G. Espécies fúngicas isoladas de ração para gatos comercializadas. **PUBVET**, n. 15, 2014.

BUENO, D.J; Silva, J.O; Olliver, G. Microflora in commercial pet foods. **Journal of Food Protection**, n.64, p,741-743, 2001.

CASE, L.P; CAREY, D; HIRAKAWA, D. **Canine and feline nutrition**. A resource for companion animal professionals. Philadelphia: Mosby, 2000. 592 p.

COPETTI, M.V. **Avaliação micológica de rações comerciais para cães e gatos e potencial micotoxigênicos de espécies selecionadas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DASAN, B.G.; MUTLU, M.; BOYACI, I.H. Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. **International Journal of Food Microbiology**, p.50–59, 2016.

DE SOUZA KOERICH, K; SCUSSEL, V.M. Dogs and birds dryfood fumonisin FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> contamination and their relation to ingredients and packaging characteristics. **Research Journal of Biological Sciences**, n.8, p.22-29, 2013.

FRANÇA, J; SAAD, F.M.O.B; SAAD, C.E.P; SILVA, R.C; REIS, J, S. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.40, p.222-231, 2011.

GIRIO, T.M.S; NADER FILHO, A; ROSSI JUNIOR, O.D. Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel. **Ars Veterinaria**, n.28, p.36-40, 2012.

IARC. International Agency for Research of Cancer. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenon-X. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 56, p. 397-444, 1993.

KIM, J.S; LEE, E.J; CHOI, E.H; KIM, Y.J. Inactivation of *Staphylococcus aureus* on the beef jerky by radio-frequency atmospheric pressure plasma discharge treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, n.22, p.124–130, 2014.

LEISTNER, M; AGUILERA, J.M; CHIRIFE, J. Combined methods for the preservation of foods: in Latin America and the CYTED-D project. **Journal of Food Engineering**, n.22, p. 433-444, 1994.

MAIA, P.P; SIQUEIRA, M.E.P.B. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros-uma revisão. **Revista da FZVA**. n.1, p. 235-257, 2007.

MISRA, N.N; PANKAJ, S.K; SEGAT, A; ISHIKAWAD, K. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. **Trends in Food Science & Technology**, n.55, p.39-47, 2016.

National Research Council – NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, D.C.: National Academic Press, 2006.

NIEMIRA, B.A; GUTSOL, A. Nonthermal plasma as a novel food processing technology. In *Nonthermal Processing Technologies for Food*, ed. HQ Zhang, G Barbosa-C´anovas, VM Balasubramaniam, P Dunne, D Farkas, J Yuan, pp. 271–88. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2010.

PANKAJ, S.K; WAN, Z; KEENER, K.M. Effects of cold plasma on Food Quality: a review. **Foods**. n.7, p. 1-21, 2018.

PHAN, K.T.K; PHAN, H.T; BRENNAN, C.S; PHIMOLSIRIPOL, Y. Nonthermal plasma for pesticide and microbial elimination on fruits and vegetables: an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, n.52, p.2127-2137, 2017.

SCUSSEL, V.M. **Fungos em Grãos Armazenados**. In Armazenagem de grãos, edited by I. Lorini, L.H. Miike, and V.M. Scussel, 675–691. Campinas: Biogeneziz, 2017.

SELCUK, M; OKSUZ, L; BASARAN, P. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. **Bior.Technology**.n. 99, p.5104–5109, 2008.

SILVA, J.R; PEREIRA, M.N; SCUSSEL, V.M. Ozone Gas Antifungal Effect on Extruded Dog Food Contaminated with *Aspergillus Flavus*. **Ozone: Science & Engineering**.n.40, p. 487-493, 2018.

Silva N, JunqueiraVCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR 2010.Manual de métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. (4.ed), p. 624 São Paulo, Varela.

SONG, H.P.B; KIM, J.H; CHOE, S; JUNG, S.Y; MOON, W; CHOE, C.J. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, n.26, p.432–436, 2009.

SUHEM, K; MATAN, N; NISOA, M; MATAN, N. Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. **International Journal of Food Microbiology**, n.161, p.107-111, 2013.

THIRUMDAS, R; SARAGAPANI, C; AJINKA, M.T; DESHMUKH R.R; ANNAPURE, U.S. Influence of low pressure cold plasma on cooking and textural properties of brown rice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, n.37, p. 53-60, 2016.

THIRUMDAS, R; SARANGAPANI, C; ANNAPURE, U.S. Cold plasma: a novel nonthermal technology for food processing. **Food Biophysics**, n.10, p.1-11, 2014.

ULBIN-FIGLEWICZ, N; JARMOLUK, A. Effect of low-pressure plasma treatment on the color and oxidative stability of raw pork during refrigerated storage. **Food Science and Technology International**. n.22, p. 313-324, 2015.

ZORAN, D.L. The carnivore connection to nutrition in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.11, p.1559, 2002.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentou dados e informações sobre a qualidade e segurança biológica, assim como métodos alternativos e seguros de descontaminação em alimentos extrusados destinados a cães. É importante conhecer os aspectos qualitativos dos alimentos fornecidos, já que dieta desses animais é baseada em um tipo de alimento, o qual consumido diariamente amplifica a exposição a possíveis contaminantes biológicos presentes na dieta.

Após avaliar os principais contaminantes biológicos (insetos e fungos) e o modo de comercialização dos alimentos extrusados comerciais, verificou-se que a venda a granel, hábito comum no Brasil, contribuem para o aumento da presença de vetores, como roedores e insetos, além de receberem maior umidade do ambiente favorecendo a presença de fungos. A falta de legislação para esses contaminantes, dificulta a fiscalização desse tipo de venda.

O tratamento com gás  $O_3$  mostrou sua eficácia sobre esporos de *A. flavus* nas condições de 40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$  por 120 min. Os parâmetros de umidade antes e após os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre eles, mantendo os alimentos dentro dos parâmetros seguros estabelecidos pela indústria para evitar o crescimento de fungos. O mesmo ocorreu com a estabilidade lipídica. De acordo com o presente estudo, é possível inferir que o gás  $O_3$  teve um efeito positivo na inativação de *A. flavus* em alimentos de cães e pode ser um procedimento promissor, com potenciais aplicações na área de venda de alimentos.

Em segundo momento, a descontaminação por plasma a frio *in vitro* e *in vivo* (alimento extrusado) mostrou ser um método eficaz nas cepas fúngicas de *A. flavus*, *F. graminearium* e *P. citrinum*. Nas pesquisas *in vitro*, o plasma a frio foi testado para avaliar o mecanismo de ação deste descontaminante frente aos principais fungos toxigênicos contaminantes de alimentos para cães. Entre as espécies testadas, *A. flavus* e *F. graminearum* foram os mais sensíveis ao tratamento na potência de 240W com corrente alternada por 10 min de exposição, os quais foram inibidos completamente. Já *P. citrinum* foi mais resistente, precisando de 20 min de exposição para a inibição completa. Em adição, foram observadas alterações morfológicas na estrutura de todos os fungos. Foram observados também a produção de ROS nas hifas fúngicas, o que já poderia ser esperado devido a forte ação oxidante do gás  $O_3$ , gerado na formação do plasma a frio.

No estudo com o alimento extrusado naturalmente contaminado e inoculado com *A. flavus*, o plasma a frio também se mostrou eficiente

para a descontaminação, nos tempos de 20 e 40 min de exposição a uma potência de 540 W., no entanto o conteúdo lipídico foi alterado por ambos tratamentos.

Neste caso, a aplicação do PF pode ser ajustada com o intuito de usar uma menor potência e menor tempo para evitar a alteração no conteúdo lipídico e ao mesmo tempo manter a sua ação antifúngica nos alimentos extrusados.

Estas duas tecnologias são alternativas eficazes que podem evitar a contaminação desses alimentos, sendo reconhecidas como métodos seguros e sem deixar resíduo no alimento e ambiente.