

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AMANDA BEZERRA GONÇALVES BASSO

**Descontaminação de aflatoxina B<sub>1</sub> por tecnologias combinadas: efeitos da fermentação e aplicação de ultrassom em massa alimentícia à base de trigo**

---

Pirassununga

2022

AMANDA BEZERRA GONÇALVES BASSO

**Descontaminação de aflatoxina B<sub>1</sub> por tecnologias combinadas: efeitos da fermentação e aplicação de ultrassom em massa alimentícia à base de trigo**  
(Versão corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

---

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B322d Basso, Amanda Bezerra Gonçalves  
Descontaminação de aflatoxina B1 por tecnologias  
combinadas: efeitos da fermentação e aplicação de  
ultrassom em massa alimentícia à base de trigo /  
Amanda Bezerra Gonçalves Basso ; orientador Carlos  
Augusto Fernandes de Oliveira. -- Pirassununga,  
2022.  
34 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de  
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade  
de São Paulo.

1. Aflatoxina B1. 2. Massas. 3. Ultrassom. 4.  
Fermentação. 5. Descontaminação . I. Oliveira, Carlos  
Augusto Fernandes de, orient. II. Título.

AMANDA BEZERRA GONÇALVES BASSO

**Descontaminação de aflatoxina B<sub>1</sub> por tecnologias combinadas: Efeitos da fermentação e aplicação de ultrassom em massa alimentícia à base de trigo**

Dissertação apresentado à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

**Data da aprovação** \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me ajudado a conquistar mais esse sonho, por me dar perseverança e por nunca soltar da minha mão e me deixar desistir de nada.

Ao meu esposo Jeferson que sempre é o primeiro a me apoiar em tudo, em todos os meus sonhos, sempre me fazendo acreditar no meu potencial. A minha cunhada Jaqueline, que sempre acreditou em mim, e sempre esteve ao meu lado me ajudando em tudo. Ao meu pai, que me disse uma vez que estudar é uma das coisas mais importantes que existem, pois podem nos tirar o que quiserem, menos aquilo que aprendemos, obrigada pai, nunca me esquecerei disso. A minha mãe que sempre está presente em todos os momentos da minha vida, e aos meus avós que sempre me incentivaram a estudar e nunca desistir.

Ao meu orientador Professor Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, por toda sua paciência, por seus ensinamentos e orientação durante meu mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, por ter me acolhido, ter me proporcionado experiências tão incríveis e ter me ensinado tanto nessa caminhada. Ao Dr. Sher Ali, que me ajudou muito na reta final da minha dissertação.

Ao laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos – LMMA/FZEA-USP, em especial à Roice por todo auxílio e ensinamento durante todo meu experimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

BASSO, A. B. G. **Descontaminação de aflatoxina B<sub>1</sub> por tecnologias combinadas: Efeitos da fermentação e aplicação de ultrassom em massa alimentícia à base de trigo.** 2022. 34f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Considerando a resistência da aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) aos processamentos industriais comumente aplicados aos alimentos, este trabalho teve como objetivo conduzir um estudo preliminar sobre o efeito de tecnologias combinadas, fermentação e aplicação de ultrassom, para reduzir os níveis de AFB<sub>1</sub> em massa alimentícia à base de farinha de trigo, e avaliar algumas características físico-químicas do produto após a aplicação dos referidos processos. Os ensaios de descontaminação foram realizados utilizando-se amostras de massa à base de farinha de trigo previamente contaminadas com 50 ng/g de AFB<sub>1</sub>. O tratamento com ultrassom foi realizado através da imersão de frascos contendo amostras previamente fermentadas (28°C e 85% umidade relativa, por 18 h) em banho de ultrassom (40 kHz; 100 W/cm<sup>2</sup>), o qual foi mantido em temperatura de 35°C por 10, 30 e 60 min. Foram também preparadas amostras não fermentadas contendo AFB<sub>1</sub> e submetidas aos mesmos tratamentos com ultrassom, assim como os controles positivos (amostras contaminadas com AFB<sub>1</sub>) e negativos (amostras não contaminadas com AFB<sub>1</sub>) e não submetidos a nenhum tratamento. Todos os tratamentos foram preparados em triplicata. As massas não fermentadas contaminadas demonstraram uma redução de 50,0 ng/g (valor nominal) para 48,21 ng/g no tempo de tratamento 0 de ultrassom, chegando a 26,99 ng/g no tempo de 60 minutos de aplicação de ultrassom. As amostras que foram tratadas com as combinações de ultrassom e fermentação demonstraram menores níveis de AFB<sub>1</sub>, de 50,0 ng/g (valor nominal) para 46,67 ng/g no tempo 0, e para 19,33 µg/kg no tempo de 60 minutos de ultrassom. Os percentuais de redução nos níveis de AFB<sub>1</sub> variaram de 3,6 a 46,0% nas massas não fermentadas, e de 6,7 a 61,7% nas massas fermentadas. Adicionalmente, os tratamentos com ultrassom utilizados no experimento, nos tempos de 10 e 20 minutos, não interferiram com a acidez titulável, demonstrando que o ultrassom é uma técnica promissora para descontaminação de massas à base de trigo contaminadas com aflatoxinas. Estudos futuros são necessários para estabelecer outros parâmetros, tais

como a temperatura e o pH do produto, visando à otimização do processo de descontaminação da AFB<sub>1</sub>, bem como avaliar possíveis efeitos do ultrassom sobre as características sensoriais dos produtos à base de trigo.

**Palavras-chave:** AFB<sub>1</sub>, massas, ultrassom, fermentação, descontaminação, HPLC.

## ABSTRACT

BASSO, A. B. G. **Decontamination of aflatoxin B<sub>1</sub> by combined technologies: Effects of fermentation and application of ultrasound in of wheat-based dough.** 2022. tantos 34f. **M.Sc.** Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Considering the resistance of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) to processing technologies commonly applied to foods, this work aimed to conduct a preliminary investigation on the effect of combined technologies, fermentation and application of ultrasound, to reduce the levels of AFB<sub>1</sub> in wheat flour-based doughs, as well to evaluate some physical and chemical characteristics of the product after the application of these processes. Decontamination assays were performed using dough samples previously contaminated with 50 ng/g of AFB<sub>1</sub>. The ultrasound treatment was performed by soaking flasks containing previously fermented samples (28°C and 85% relative humidity for 18 h) in an ultrasound bath (40 kHz; 100 W/cm<sup>2</sup>), which was kept at a temperature of 35°C for 10, 30 and 60 min. Non-fermented samples containing AFB<sub>1</sub> were submitted to the same ultrasound treatments, as well as positive (AFB<sub>1</sub>-contaminated samples) and negative (samples not contaminated with AFB<sub>1</sub>) and not submitted to any treatment were also prepared. All treatments were prepared in triplicate. Non-fermented doughs had reduced AFB<sub>1</sub> levels, from 50.0 ng/g (nominal value) to 48.21 ng/g at treatment 0 of ultrasound, reaching to 26.99 ng/g at 60 minutes of ultrasound treatment. Samples treated with combined ultrasound and fermentation had lower AFB<sub>1</sub> levels, from 50.0 ng/g (nominal value) to 46.67 ng/g at treatment 0, and to 19.33 ng/g at 60 minutes of ultrasound. Percentage reductions of AFB<sub>1</sub> levels varied between 3.6 and 46.0% in non-fermented doughs, and from 6.7 to 61.7% in fermented doughs. In addition, the ultrasound treatments used in the experiment at 10 and 20 minutes did not interfere with titratable acidity, hence demonstrating that ultrasound is a promising technique for the decontamination of wheat-based doughs contaminated with aflatoxins. Future studies are needed to determine other parameters, such as temperature and pH of the product, to optimize the decontamination process of AFB<sub>1</sub>, as well as to evaluate possible effects of ultrasound on the sensory attributes of wheat-based products.

**Keywords:** AFB<sub>1</sub>, pasta, ultrasound, fermentation, decontamination, HPLC.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	12
Figura 2. Conversão da AFB <sub>1</sub> na forma ativa e tóxica.....	14
Figura 3. Fluxograma das atividades do experimento.....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características físico-químicas das aflatoxinas.....	12
Tabela 2. Limites de tolerância para aflatoxinas (AF) em produtos alimentícios à base de trigo em alguns países.....	15
Tabela 3. Limites máximos tolerados para aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em cereais e derivados.....	16
Tabela 4. Formulação das massas experimentais à base de trigo.....	19
Tabela 5. Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxina B1 nas massas à base de trigo.....	24
Tabela 6. Concentrações de aflatoxina B1 (ng/g) nas massas à base de trigo fermentadas e não fermentadas, submetidas a diferentes tempos de ultrassom.....	25
Tabela 7. Percentuais (%) de redução da concentração média de aflatoxina B1 (ng/g) nas massas à base de trigo fermentadas e não fermentadas, submetidas a diferentes tempos de ultrassom.....	26
Tabela 8. Acidez e tempo de fermentação das massas à base de trigo fermentadas, submetidas a diferentes tempos de ultrassom.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB<sub>1</sub>- Aflatoxina B<sub>1</sub>

AFB<sub>2</sub>- Aflatoxina B<sub>2</sub>

AFG<sub>1</sub>- Aflatoxina G<sub>1</sub>

AFG<sub>2</sub>- Aflatoxina G<sub>2</sub>

AFM<sub>1</sub>- Aflatoxina M<sub>1</sub>

AFQ<sub>1</sub>- Aflatoxina Q<sub>1</sub>

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

RNA- Ácido Ribonucleico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Características gerais das aflatoxinas.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Aspectos de toxicidade das aflatoxinas.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3. Ocorrência de Aflatoxinas em Trigo e Produtos Derivados.....</b>	<b>14</b>
3.4. Limites de Tolerância para Aflatoxinas em Trigo e Produtos Derivados.....	15
<b>3.5. Métodos de descontaminação para Aflatoxinas.....</b>	<b>17</b>
<b>3.6. Técnicas analíticas para a determinação de Aflatoxinas.....</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1. Materiais.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Preparação das massas à base de farinha de trigo.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Ensaio de descontaminação de aflatoxina B<sub>1</sub>.....</b>	<b>20</b>
<b>4.4. Determinação de Aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5. Avaliação do desempenho do método analítico para determinação de         aflatoxina B<sub>1</sub>.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6. Análise dos resultados.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>23</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por espécies de *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, os quais se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios (OLIVEIRA et al., 2014). Trata-se de substâncias carcinogênicas, teratogênicas e hepatotóxicas (SAAD-HUSSEIN et al., 2016), sendo que a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é a mais frequentemente encontrada em alimentos e rações, além de apresentar maior toxicidade. A AFB<sub>1</sub> foi classificada pela Agência internacional de Pesquisas em Câncer (EFSA, 2004; ANTTILA et al., 2002) como pertencente ao grupo 1, ou seja, carcinogênica para seres humanos (SCHRENK et al., 2020; EFSA, 2004). Elas não são destruídas mesmo após o tratamento térmico ou processamento (CAMPAGNOLLO et al., 2016). Sendo assim, seu controle deve ser realizado utilizando-se duas abordagens: a primeira delas é a prevenção da contaminação e do crescimento fúngico em alimentos e rações e a segunda é a detoxificação dos compostos tóxicos produzidos pelos fungos. Na primeira abordagem, se encaixam os métodos de melhoria das práticas agrícolas, agentes antifúngicos, engenharia genética e controle das condições de armazenamento de grãos (CORASSIN et al., 2013). Na segunda abordagem se encaixam métodos de descontaminação físicos, químicos e biológicos, sendo que estes devem objetivar a completa inativação, destruição ou remoção da toxina, além de não produzir ou deixar resíduos tóxicos nos alimentos e preservar seu valor nutritivo (AGRIOPOULOU et al., 2020). Em particular, os métodos físicos de descontaminação envolvem procedimentos tais como inativação térmica, irradiação e aplicação de ultrassom em alimentos, com a finalidade de degradar as toxinas (GRENIER et al., 2014).

A presente pesquisa trata da aplicação do ultrassom em conjunto com a fermentação para descontaminação das massas à base de trigo, tendo em vista que esta possibilidade já foi abordada recentemente na literatura, mas este trabalho destaca-se pela abordagem prática da técnica proposta. Vale ressaltar o grande diferencial desta presente pesquisa que associa a fermentação da massa juntamente com a aplicação do ultrassom, visando a combinação dessas duas técnicas para a diminuição das aflatoxinas (GAVAHIAN et al., 2021). O trigo destaca-se por sua alta capacidade de aplicação em diversos produtos, ocupa o segundo lugar na produção em escala mundial de cereais alimentícios, ficando atrás

apenas do milho. Empregado diariamente na elaboração de pães, biscoitos, bolos e massas, o trigo é considerado de grande importância para a saúde dado seu grande propósito nutricional (SOUZA et al., 2020). As massas fermentadas, são produzidas, basicamente, a partir de duas substâncias vitais para a alimentação humana: o amido e o glúten, o amido é um carboidrato que gera energia para o organismo, e o glúten é um tipo de proteína presente em alguns cereais, como o trigo, o centeio, o malte e a cevada, que é responsável pela consistência macia que estamos adaptados a apreciar nas massas (MA et al., 2022; XIONG et al., 2021; BIESIEKIERSKI, 2017; DANTAS, 2016; SCHEUER, et al., 2011). Dada sua importância na alimentação em nível mundial, a descontaminação do trigo ganha relevância científica, econômica e social. Há informações plausíveis sobre o efeito da fermentação sobre os níveis de aflatoxinas em massas alimentícias fermentadas, mostrando grande queda de aflatoxinas após a fermentação (NOROOZI et al., 2022; RASHID HUDU et al., 2022; ROCHA, 2021).

Com grande potencial de descontaminação, o ultrassom é uma tecnologia inovadora com efeitos promissores a longo prazo na área de alimentos (COMARELLA, 2012; DUMUTA et al., 2022; OLIVEIRA, 2017). São ondas de som com frequência sonora superior às detectadas pelo ouvido humano (20 KHz) (BYLER, 2018; OLIVEIRA, 2017). Divididas em ultrassom de alta frequência e baixa intensidade ( $>1$  MHz,  $< 1$  W cm<sup>-2</sup>) e ultrassom de baixa frequência e alta intensidade (20-100 KHz com 10-1000 W cm<sup>-2</sup>), ambos são utilizados na tecnologia de alimentos (BYLER, 2018; ALARCON-ROJO et al., 2015). Sendo propagadas através de uma série de ondas conhecidas como cavitação acústica, a qual produz bolhas de gás microscópicas em soluções, induzidas pela diferença de pressão que ao implodirem realizam um aumento brusco de temperatura (BYLER, 2018; RAMPELOTTO, 2012).

Alguns estudos demonstraram a capacidade do ultrassom em inativar microrganismos e enzimas deteriorantes e patogênicas presentes em produtos lácteos e sucos de frutas, devido às formações gasosas, pois aumentam a permeabilidade da membrana, desnaturam o DNA e proteína, além de modificar a morfologia celular, podendo também inibir ou estimular atividades biológicas (BYLER, 2018; COMARELLA, 2012).

Por ser uma tecnologia emergente de descontaminação, e por não produzir contaminantes secundários, o ultrassom têm demonstrado efeitos positivos frente a degradação das micotoxinas nos alimentos, e também efeitos significativos da interação

entre a fermentação e a desintoxicação para diminuição das mesmas. Nos estudos atuais, destaca-se que o uso do ultrassom sobre as aflatoxinas reduz significativamente a bioatividade e a toxicidade da AFB<sub>1</sub>, pois, ele interrompe o vínculo duplo C8=C9 no anel furano, modificando o anel de lactona do grupo metóxi (GAVAHIAN et al., 2021; LIU et al., 2019).

O ultrassom de alta intensidade já vem sendo utilizado em produtos alimentícios, devido à capacidade de operar em temperaturas mais baixas que a pasteurização convencional, desta forma, possibilita a redução de alterações físico-químicas que são ocasionadas pelo calor. Considerando que o ultrassom é uma tecnologia recente no processamento de alimentos, este trabalho tem, portanto, o objetivo de avaliar os efeitos de tecnologias combinadas, fermentação e aplicação de ultrassom, sobre os níveis de AFB<sub>1</sub> em massa alimentícia à base de farinha de trigo, além de avaliar as características físico-químicas do produto após a aplicação dos referidos processos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos de tecnologias combinadas, fermentação e aplicação de ultrassom, sobre os níveis de AFB<sub>1</sub> em massa alimentícia à base de farinha de trigo.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Verificar os níveis de AFB<sub>1</sub> em massa à base de trigo submetida a diferentes intensidades do processo de ultrassom e;
- b) Avaliar algumas características físico-químicas do produto após a aplicação dos referidos processos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Características gerais das aflatoxinas

As aflatoxinas compreendem o grupo mais importante de micotoxinas, devido ao seu alto potencial de toxicidade e ampla distribuição em alimentos. O termo micotoxina é originário da palavra grega "*Mykes*", que significa fungo, e do latim "*Toxicum*", que significa toxina ou veneno (AGRIOPOULOU et al., 2020). As micotoxinas são classificadas como o mais importante fator de risco não-infeccioso e crônico alimentar, sendo superior ao dos contaminantes sintéticos, toxinas de plantas, aditivos alimentares ou resíduos de agrotóxicos. Homem e animais podem ser levados a quadros de intoxicação aguda ou crônica através da ingestão de micotoxinas, sendo a condição patológica resultante desta ingestão denominada micotoxicose (BOGANTES et al., 2004). Fatores que afetam a magnitude dessa toxicidade em seres humanos ou animais incluem o tipo da espécie, modos de ação, metabolismo e mecanismos de defesa (MAZIERO et al., 2010).

As espécies de fungos produtores de aflatoxinas pertencem ao gênero *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (OLIVEIRA et al., 1997). As aflatoxinas são metabólitos produzidos por cepas dessas espécies de forma secundária. Existem condições que precisam ser favoráveis para o desenvolvimento desses fungos, tais como a umidade, temperatura, o pH e a quantidade de oxigênio disponível no local (GUERRA et al., 2012).

Com as alterações climáticas disponíveis, os fungos podem se desenvolver e produzir as micotoxinas que são seus contaminantes naturais, e extremamente tóxicos, capazes de desenvolver toxicidade aguda e crônica, acarretando o desenvolvimento de doenças imunossupressoras e carcinoma hepatocelular (ASSUNÇÃO et al., 2018). Dentre os tipos de aflatoxinas existentes, as de maior interesse médico são as identificadas como aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (GIANG et al., 2020). Essa definição decorre das cores observadas quando estas toxinas são expostas à luz ultravioleta. As aflatoxinas identificadas como "B" (do Inglês "blue") apresentam cor azul, e as identificadas como "G" (do Inglês "green") são identificadas pela cor verde (TESSARI et al., 2012).

Segundo TESSARI et al. (2012), quanto a natureza química das aflatoxinas, vale ressaltar que elas são bisfuranocumarinas, derivadas de um decacetídeo através da via

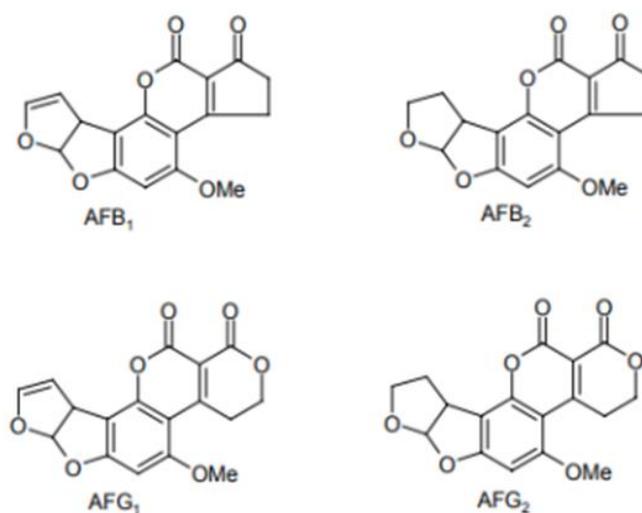
biossintética dos policetídeos, na qual a unidade C2 é perdida durante a formação de anéis bisfuranos. As aflatoxinas B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> são dihidroderivados de B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, respectivamente. TING et al. (2020), esclarecem que a aflatoxina B<sub>1</sub> se destaca por ser altamente detectada em alimentos contaminados por fungos, e por ser identificada como um dos mais fortes compostos mutagênicos e carcinogênicos hepáticos, sendo mais tóxicas que as demais aflatoxinas (TING et al., 2020). As principais características físico-químicas das aflatoxinas encontram-se na Tabela 1, enquanto a Figura 1 apresenta as suas estruturas químicas.

**Tabela 1** – Principais características físico-químicas das aflatoxinas.

Tipo de aflatoxina	Fórmula estrutural	Peso Molecular	Ponto de Fusão °C
<b>Serie 1 - difuro-cumaro-ciclo-pentanonas</b>			
<b>AFB<sub>1</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269
<b>AFB<sub>2</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289
<b>Serie 2 - difuro-cumaro-lactonas</b>			
<b>AFG<sub>1</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	328	244-246
<b>AFG<sub>2</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240

Fonte: Adaptado de Urrego Novoa (2006).

**Figura 1** - Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.



Fonte: Rocha (2021)

### 3.2. Aspectos de toxicidade das aflatoxinas

As aflatoxinas entram facilmente no organismo devido ao seu baixo peso molecular. Geralmente elas são absorvidas após ingestão oral, e devido a sua alta lipossolubilidade, elas são absorvidas no sistema gastrointestinal, e distribuídas em diferentes órgãos do corpo (SAKATA et al., 2011). Após serem absorvidas, as aflatoxinas chegam ao fígado, onde são biotransformadas pelo sistema enzimático das oxidases pertencentes à família de enzimas do citocromo P-450, que atua no sistema metabólico de drogas e toxinas (FERREIRA et al., 2006). Essa biotransformação é um processo complexo, pois envolve diversas vias como a epoxidação, hidroxilação, desmetilação e redução. A epoxidação é um processo que pode ser definido como a junção de diversas reações exotérmicas que ocorrem em algumas fases líquidas com transferência de massa (QUADROS, 2015). Ela juntamente com a biotransformação primária da AFB<sub>1</sub>, inclui também o-desalquilação que origina a AFP<sub>1</sub>, reduzindo a aflatoxicol e a hidroxilação, resultando em AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub> e AFB<sub>2a</sub>, resultando nas principais reações das aflatoxinas no metabolismo, que é a hidroxilação, oxidação e desmetilação (SAKATA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 1997).

A hidroxilação que ocorre para formar as aflatoxinas, permite a conjugação com ácidos glicurônico ou sulfatos, que por serem solúveis em água, auxiliam na sua consequente excreção através da urina ou bile, seguido pela excreção nas fezes (OLIVEIRA et al., 1997). E a desmetilação e a redução que são etapas finais do processo consistem em redução do grupo metil da molécula diminuindo o seu tamanho (PEREIRA, 2007).

Por apresentar efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressivos e hepatotóxicos, as aflatoxinas oferecem sérios riscos à saúde humana e animal (NORONHA et al., 2020; GONÇALVES, 2017), que são influenciados por fatores como espécie, sexo, idade, estado nutricional, efeito de outros produtos químicos, dose e período de exposição do organismo à toxina (FERREIRA et al., 2006; EFSA, 2004). A *International Agency for Research on Cancer*, classifica a AFB<sub>1</sub> como pertencente ao Grupo 1, carcinogênica para humanos (EFSA, 2004; ANTTILA et al., 2002).

As aflatoxinas possuem grande capacidade de manifestar efeitos tóxicos no organismo, porém, para a AFB<sub>1</sub> manifestar esse efeito precisa sofrer ativação metabólica, sua forma ativada (Figura 2) é um composto denominado AFB<sub>1</sub>-epóxido (8,9-óxido de AFB<sub>1</sub>), que reage rapidamente com as macromoléculas como do ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas, e a ligação dessa forma ativada com o DNA resulta na formação de uma adutoadlatoxina-N<sup>7</sup>- guanina, quais são responsáveis pela primeira lesão ocasionada pelas aflatoxinas ao DNA. A ligação da 8,9-óxido de AFB<sub>1</sub>, acarreta na modificação da estrutura do DNA e da sua atividade biológica, originando mecanismos básicos de efeitos mutagênicos e neoplasias (MALLMANN et al., 1994; FORRESTER et al., 1990).

**Figura 2** - Conversão da AFB<sub>1</sub> na forma ativa e tóxica.



**Fonte:** Peña et al. (2007).

### 3.3. Ocorrência de Aflatoxinas em Trigo e Produtos Derivados

A Food and Agriculture Organization (FAO) estima que cerca de um quarto dos alimentos no mundo estejam contaminados com micotoxinas, podendo ser veiculadas para homens e animais por meio de produtos agrícolas, rações industrializadas, produtos de origem animal, queijos curados por fungos e alimentos fermentados, entre outros (BERNARDI et al., 2018). Nesse universo, representando aproximadamente 30% da produção global de grãos, o trigo é destinado à elaboração de produtos alimentícios para

humanos e animais, e também para produtos não alimentícios como a geração de energia renovável. Vários trabalhos já demonstraram que a ocorrência de micotoxinas é maior no trigo moído, em comparação com a farinha branca, o que aumenta ainda mais a preocupação com a produção dos alimentos integrais. No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas em trigos e derivados pode variar de 1 a 20 $\mu$ g segundo o ministério da saúde (item 3.4 - tabela 2) (Ministério da saúde, 2021; BERNARDI et al., 2018).

A contaminação de alimentos por fungos pode ocasionar, além de problemas de saúde, perdas econômicas irreparáveis como nas perdas diretas de produtos agrícolas, redução na produtividade, doenças humanas e diminuição da produtividade de animais por morte, além dos custos de desintoxicação para adequar produtos aos limites da legislação (BERNARDI et al., 2018).

Portanto, a contaminação do trigo por aflatoxinas representa a possibilidade de prejuízos tanto para a saúde humana e animal, quanto para a própria cadeia produtiva ao acarretar diminuição da produtividade, morte de animais e aumento dos custos para beneficiamento do trigo e produção de seus derivados, situação que é regulamentada por órgãos competentes em todo o mundo e no Brasil.

### **3.4. Limites de Tolerância para Aflatoxinas em Trigo e Produtos Derivados**

A Tabela 2 apresenta os limites de tolerância para aflatoxinas em produtos alimentícios à base de trigo em alguns países americanos, asiáticos e europeus no ano de 2013. Os dados apresentados por Oliveira e Corassin (2013) demonstram que na maioria dos países, os limites são determinados pelo total de aflatoxinas e variam entre 4 e 30 $\mu$ g. No Brasil esses limites são determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária vinculada ao Ministério da Saúde, mais especificamente pelas Resolução RDC nº 487, de 26 de março de 2021 que dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade (Ministério da saúde, 2021) e pela Instrução Normativa - nº 88, de 26 de março de 2021 que estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos (Ministério da saúde, 2021).

**Tabela 2** - Limites de tolerância para aflatoxinas (AF) em produtos alimentícios à base de trigo em alguns países.

País	Produto Alimentício	Aflatoxina	Limite (µg/kg)
EUA	Todos os alimentos, exceto leite	Total de AF	20
Bósnia e Herzegovina	Trigo	AFB <sub>1</sub> e AFG <sub>1</sub>	1
China	Bolo, biscoito de massa e pão	AFB <sub>1</sub>	5
Índia	Todos os produtos alimentícios	Total de AF	30
União Europeia	Produtos destinados ao consumo humano direto ou como ingredientes em alimentos	Total de AF	4
Chile	Todos os alimentos	Total de AF	5
Japão	Todos os alimentos	AFB <sub>1</sub>	10
Israel	Outros alimentos (excluídos nozes, amendoim, farinha de milho, figos, seus produtos, leites e produtos lácteos)	Total de AF	15
México	Cereais e produtos de cereais	Total de AF	20

**Fonte:** Oliveira e Corassin (2013, p. 7)

De acordo com a Instrução Normativa n. 88 (Ministério da saúde, 2021), os limites máximos para aflatoxinas no trigo e seus derivados no Brasil são aqueles descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Limites máximos tolerados para aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em cereais e derivados.

Produto Alimentício	Limite (µg/kg)
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cavada maltada	5
Milho, milho em grão inteiro, partido, amassado ou moído, farinhas ou sêmolos de milho	20

**Fonte:** Adaptado Ministério da saúde (2021).

O Brasil determina os limites com base no total das aflatoxinas contidas nos produtos alimentícios, considerando também que tais limites diminuem à medida que os alimentos vão sendo processados. Ou seja, a descontaminação do trigo e seus derivados é parte importante do processo de produção de alimentos e, conseqüentemente à saúde humana e animal (ANVISA, 2021).

### 3.5. Métodos de descontaminação para Aflatoxinas

Existem vários métodos de descontaminação para aflatoxinas, dentre eles podemos destacar os métodos físicos, químicos e biológicos, sendo que estes devem ter como objetivo a completa inativação, destruição ou remoção da toxina, além de não produzir ou deixar resíduos tóxicos nos alimentos e preservar seu valor nutritivo, entre outras (AGRIOPOULOU et al., 2020). Em particular, os métodos físicos de descontaminação envolvem procedimentos como separação mecânica e de densidade, inativação por calor, luz UV, radiação ionizante ou extração de solvente, os métodos químicos podem-se destacar como aplicação de hipoclorito de sódio e gás cloro, agentes antioxidantes ou agentes hidrolíticos, e por fim os métodos biológicos como aplicação de leveduras, filamentos de fungos, algas, por antibiose, competição de nutrientes e espaço, entre outros (GRENIER et al., 2014).

Os métodos de descontaminação visam a diminuição dos efeitos destrutivos e tóxicos das aflatoxinas nos alimentos. A aplicação de irradiação solar, raios gama e luz ultravioleta, já são amplamente utilizados como forma de descontaminação de produtos, sendo que a irradiação utilizada nos alimentos é um processo físico que utiliza a exposição dos alimentos a um dos três tipos de energia ionizante, sendo elas, a radiação gama, raios-X ou feixe de elétrons. Carão (2014) destaca que visando aumentar o rendimento do produto, o uso de ultrassom vem cada vez mais sendo utilizado como forma de descontaminação de aflatoxinas nos alimentos, podendo ser definido como uma tecnologia inovadora com efeitos promissores na área de alimentos.

O ultrassom é propagado através de ondas que podem ser divididas em ultrassom de alta frequência e baixa intensidade ( $>1$  MHz,  $< 1$  W cm<sup>-2</sup>) e ultrassom de baixa frequência e alta intensidade (20-100 KHz com 10-1000 W cm<sup>-2</sup>) que produzem bolhas de gás microscópicas em soluções que induzidas pela diferença de pressão que quando implodem, resultam em um aumento brusco de temperatura (ALVES, 2013).

Alguns estudos demonstraram a capacidade do ultrassom em inativar microrganismos e enzimas deteriorantes e patogênicas presentes em produtos lácteos e sucos de frutas, devido às formações gasosas, pois aumentam a permeabilidade da membrana, desnaturam

o DNA e proteína, além de modificar a morfologia celular, podendo também inibir ou estimular atividades biológicas (BYLER, 2018; COMARELLA, 2012).

Segundo LIU et al. (2019), o ultrassom aplicado à aflatoxina mostra-se um método promissor para a descontaminação e degradação da AFB<sub>1</sub>. Adicionalmente, a associação de tecnologias combinadas como o uso de ultrassom e fermentação pode ser mais eficiente para descontaminação de aflatoxinas em alimentos, considerando os efeitos combinados destas técnicas, além de apresentarem custos relativamente baixos (GAVAHIAN et al., 2021).

### 3.6. Técnicas analíticas para a determinação de Aflatoxinas

A técnica mais frequentemente utilizada para a determinação das aflatoxinas nos alimentos é a cromatografia líquida com detecção por fluorescência. O método de cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. Essa técnica se destaca devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (MOTTA et al., 2010).

A cromatografia líquida, consiste na separação, identificação e quantificação dos componentes de uma amostra (JUNIOR et al., 2021). Ela tem como base a diferença de solubilidade dos analitos entre a sua fase móvel, líquida e estacionária, e neste trabalho vale ressaltar, que na fase estacionária foi utilizada como base líquido/líquido. Mesmo se tratando de um excelente método físico-químico de separação, para a análise quantitativa e qualitativa ela necessita de uma técnica confirmatória que detecta o analito de interesse, e o detector ideal deve ser sensível a pequenas mudanças na concentração do analito, que forneça uma resposta clara. Os tipos de detectores variam entre ultravioleta, de índice de refração, de fluorescência e de espectrometria de massas (JÄNISCH et al., 2022).

A espectrometria de massas também vem sendo aplicada para qualificar e quantificar a presença de micotoxinas em alimentos e outras matrizes. Esta técnica analisa os átomos e as moléculas por meio da relação massa/carga ( $m/z$ ) dos íons de analitos no estado gasoso, após separação em um sistema de cromatografia líquida (JUNIOR et al., 2021).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Amostras de farinha de trigo foram adquiridas no comércio varejista. Foi utilizado padrão de AFB<sub>1</sub> (SIGMA-ALDRICH) previamente dissolvido em acetonitrila, o qual foi diluído de maneira a obter uma solução de trabalho contendo 1,0 µg AFB<sub>1</sub>/mL. Esta solução foi utilizada no preparo das massas contaminadas utilizadas nos ensaios de descontaminação, contendo 50 ng/g de AFB<sub>1</sub>. Após transferir alíquotas convenientes da solução de trabalho e da farinha para um béquer, o conteúdo foi misturado e em seguida deixado em estufa a 50° C para evaporação do solvente. O equipamento de ultrassom utilizado (SolidSteel, Piracicaba, SP) possui frequência igual a 40 kHz e potência de 100 W. As análises de AFB<sub>1</sub> nas amostras foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®), equipado com detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 440 nm) e coluna Kinetex C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) de 4,6 × 150 mm, 2,6 µm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 µm) 4 x 10 mm, disponível no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da FZEA/USP.

### 4.2. Preparação das massas à base de farinha de trigo

Com base na literatura disponível (FARIDI, 1994), a formulação das massas de trigo foi preparada de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4** - Formulação das massas experimentais à base de trigo.

Ingredientes	Massa (%)
Farinha	100 g
Água	50 mL
Levedura	1,0 g
Gordura vegetal	14 mL
Sal	0,8 g
Bicarbonato de sódio	1,5 g

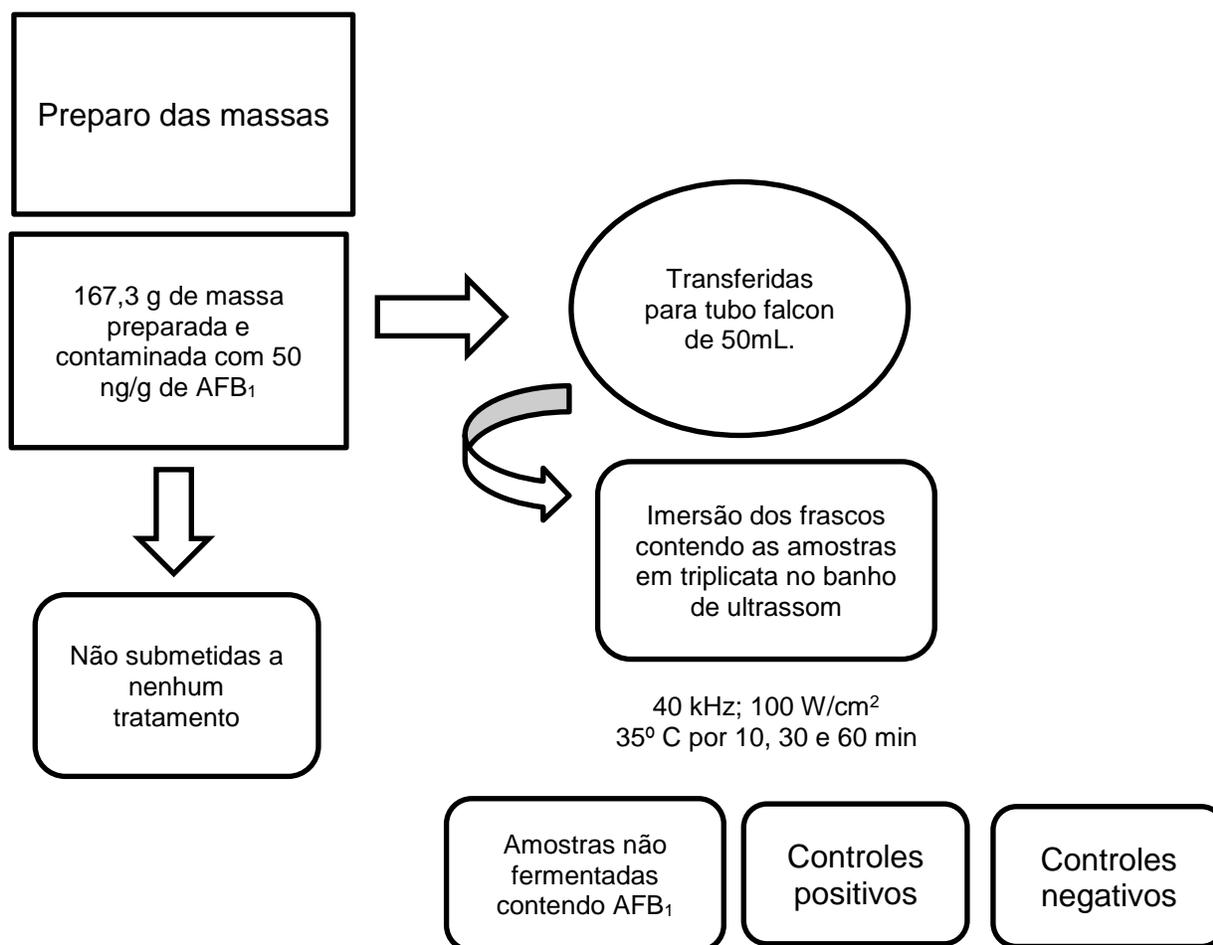
**Fonte:** Faridi (1994).

Os testes de acidez titulável total (TTA) foram utilizados como indicadores do processo de fermentação (Li et al., 2013). A farinha, o bicarbonato de sódio, a gordura vegetal, o sal, e o fermento seco instantâneo (contendo *Saccharomyces cerevisiae*) foram misturados em um recipiente com peso final de 167,3 g, a massa foi feita em duplicata com peso total de 334,6 g (que foi controlada para a base de micotoxinas de contaminação primária). A massa foi fermentada a 28°C e 85% e umidade relativa, em um armário de fermentação por no mínimo 18 horas. Após esse tempo de fermentação, a massa controle sem fermentação e a massa fermentada foram avaliadas conforme protocolo de descontaminação.

#### **4.3. Ensaio de descontaminação de aflatoxina B<sub>1</sub>**

Os ensaios de descontaminação da AFB<sub>1</sub> nas massas alimentícias foram realizados conforme descrito por Liu et al. (2019), (itens 4.1 e 4.2) com algumas modificações. Alíquotas de 100 g de massa foram preparadas segundo a receita descrita acima (Tabela 4), sendo uma delas armazenada em freezer a -20° C, constituindo o controle negativo (sem adição de AFB<sub>1</sub> e sem fermentação). Após este procedimento, as demais alíquotas de massa foram adicionadas de volumes convenientes da solução padrão de AFB<sub>1</sub>, de maneira a obter a concentração de 50 ng/g de AFB<sub>1</sub>. Parte das massas foram mantidas em fermentação por no mínimo 18 h a 28 °C e 85% de umidade relativa. A outra parte das alíquotas de massas foram submetidas diretamente ao tratamento de ultrassom, conforme descrito a seguir, sem o processo de fermentação. Na sequência, pesou-se 25 g de massa fermentada em frasco de vidro, sendo a massa levada para o banho de ultrassom a 40 kHz, 100 W/cm<sup>2</sup>, a 35°C por 10, 30 e 60 minutos. Todos os procedimentos acima descritos foram conduzidos utilizando triplicatas de amostras. A Figura 3 apresenta uma síntese dos procedimentos experimentais utilizados no estudo.

**Figura 3.** Fluxograma das atividades do experimento.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.4. Determinação de Aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras

A determinação de AFB<sub>1</sub> nas amostras foi efetuada mediante a utilização dos procedimentos preconizados pela empresa fabricante de colunas de imunoafinidade (Aflatest®, Vicam) e determinação através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito resumidamente abaixo:

No laboratório, 25 g de amostra foram pesadas em um tubo Falcon, juntamente com 5 g de NaCl e 125 mL de metanol-água (70+30). Após a agitação em agitador rotacional por 30 min, o extrato foi centrifugado e filtrado em papel de filtro, recolhendo-se 15 mL em um

Becker. Foram adicionados ao extrato 30 mL de água ultra-purificada (Milli-Q, Millipore), após o que a mistura foi homogeneizada e filtrada em filtro de microfibras (1,5 µm, Millipore), recolhendo-se 15 mL para passagem através de coluna de imunoafinidade, sendo a mesma adaptada a um manifold conectado a um sistema de vácuo (fluxo de uma a duas gotas/segundo). Após a eluição da amostra, a coluna foi lavada através da passagem de 10 mL de água Milli-Q. Em seguida, foi passado 1 mL de metanol (grau CLAE), de maneira a eluir a AFB<sub>1</sub>, recolhendo o eluato em frasco âmbar. O eluato foi então derivatizado. Para isso, após evaporação total do eluato, acrescentou-se 100 µL de ácido trifluoracético e 200 µL de n-hexano, sendo a mistura homogeneizada e colocada em estufa a 35° C por 10 minutos. Em seguida, a solução foi evaporada novamente, ressuspensa em 500 µL de etanol-água (50+50) e reservada para injeção no cromatógrafo.

A separação e a quantificação das aflatoxinas foram conduzidas em um sistema CLAE (Shimadzu®), equipado com detector de fluorescência (excitação: 360 nm e emissão: 440 nm) e Kinetex C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) de 4,6 × 150 mm, 2,6 µm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 µm) 4 × 10 mm. Foram injetados 20 µL da amostra filtrada ressuspensa (membrana filtrante PTFE, 0,45 µm, Millex, Millipore), utilizando-se, como fase móvel, água-metanol-acetonitrila (60+20+20), com fluxo de 1,0 mL/min. Nestas condições, o tempo de retenção da AFB<sub>1</sub> foi de aproximadamente 5,8 minutos. A quantificação das aflatoxinas nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, na equação de regressão da curva de calibração externa.

O padrão de AFB<sub>1</sub> (SIGMA-ALDRICH) encontrava-se dissolvido em solução de acetonitrila, sendo calibrado espectrofotometricamente ( $\lambda = 350$  nm) através da técnica preconizada por Scott (1990), para obtenção da concentração exata da micotoxina. Após a calibração, foram transferidos 200 µL do padrão para um frasco, evaporado até a secura sob fluxo de nitrogênio e ressuspensa em volume conveniente de metanol grau CLAE, de maneira a obter uma solução de trabalho contendo aproximadamente 1,0 µg AFB<sub>1</sub>/mL. Esta solução foi derivatizada conforme descrito acima e utilizada no preparo dos pontos da curva de calibração, nas concentrações de 1,56, 3,12, 6,25, 12,5 e 25,0 ng/mL.

#### **4.5. Avaliação do desempenho do método analítico para determinação de aflatoxina B<sub>1</sub>**

Para avaliar a eficiência da metodologia para a determinação de AFB<sub>1</sub> nas amostras de massa à base de trigo, foram realizados ensaios de recuperação, em amostras artificialmente contaminadas, de acordo com JAGER et al. (2016). As amostras de massa foram preparadas conforme descrito no item 4.2 e artificialmente contaminadas com a solução de trabalho, de maneira a obter níveis de contaminação de 5,0 e 50,0 ng/g de AFB<sub>1</sub>. As amostras fortificadas foram preparadas em triplicata para cada nível de AFB<sub>1</sub>, e submetidas ao método descrito no item 4.4, com vistas à obtenção dos percentuais de recuperação e coeficientes de variação dos resultados das análises.

#### **4.6. Análise dos resultados**

Os resultados obtidos nas análises laboratoriais foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no General Linear Model do SAS® (SAS Institute, 1992), para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre os percentuais de redução de AFB<sub>1</sub> e características físico-químicas nas amostras dos diferentes tratamentos. Para a comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste de Tukey, adotando-se  $\alpha = 0,05$ .

### **5. Resultados e Discussão**

#### **5.1. Desempenho do método analítico para aflatoxina B<sub>1</sub>**

Na Tabela 5, são demonstrados os resultados de recuperação e coeficiente de variação, os quais podem ser considerados como muito bons para o método analítico. Considerando os resultados descritos, as precisões instrumentais foram consideradas satisfatórias (AZEVEDO et al., 2021), tendo em vista que foram obtidas recuperações médias de 85,0 e 88,4% nas concentrações de AFB<sub>1</sub> testadas (5,0 ng/g e 50,0 ng/g, respectivamente). Os coeficientes de variação foram relativamente baixos para os níveis

estudados, observando-se valores de 11,5% para as amostras contaminadas com 5,0 ng/g, e 7,9% nas amostras contendo 50 ng/g de AFB<sub>1</sub>.

**Tabela 5** - Percentuais de recuperação e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de aflatoxina B<sub>1</sub> nas massas à base de trigo.

Aflatoxina B <sub>1</sub> adicionada (ng/kg)	Aflatoxina B <sub>1</sub> obtida (ng/kg)	Aflatoxina B <sub>1</sub> Média (ng/kg)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
	0			
0	0	0	-	-
	0			
	3,84			
5	4,12	4,25	85,0	11,5
	4,79			
	47,40			
50	40,45	44,20	88,4	7,9
	44,75			

O método desenvolvido demonstrou um resultado bem-sucedido na determinação de AFB<sub>1</sub> nas amostras, apresentando resultados aceitáveis para precisão e exatidão, além de limites de detecção e quantificação apropriados para ambas as aplicações, o método demonstrou especificidade e sensibilidade para detectar as concentrações de AFB<sub>1</sub> (AZEVEDO et al., 2021).

Segundo STEINBACH et al. (2022), a sensibilidade pode ser esclarecida ao percentual de casos que tem a característica de interesse que foram corretamente preditas pelo modelo determinado, ou seja, verdadeiros positivos (falsos positivos + verdadeiros positivos). E a especificidade da técnica elaborada pode relacionar-se com o percentual de casos que não tem a característica de interesse que foram corretamente estabelecidos pelo modelo avaliado, ou seja, verdadeiros negativos (falsos negativos + verdadeiros negativos).

## 5.2. Efeito do ultrassom e da fermentação sobre a aflatoxina B<sub>1</sub>

A Tabela 6 apresenta as concentrações de AFB<sub>1</sub> (ng/g) nas massas à base de trigo fermentadas e não fermentadas, submetidas a diferentes tempos de ultrassom. Os dados mostram que os tratamentos associados resultaram em uma redução ( $P < 0,05$ ) frente as amostradas contaminadas com AFB<sub>1</sub>. As massas não fermentadas contaminadas demonstraram uma queda de 50,0 ng/g (valor nominal) para 48,21 ng/g no tempo de tratamento 0 de ultrassom, chegando a 26,99 ng/g no tempo de 60 minutos de aplicação de ultrassom. As amostras que foram tratadas com as combinações de ultrassom e fermentação demonstraram uma diminuição de 50,0 ng/g (valor nominal) para 46,67 ng/g no tempo 0, e para 19,33 ng/g no tempo de 60 minutos de ultrassom, o que deixa claro que os tratamentos combinados para descontaminação das AFB<sub>1</sub> foram mais eficazes para diminuir a concentração da AFB<sub>1</sub> nas amostras de massa à base de trigo. Contudo, o tempo de 10 minutos foi suficiente ( $P < 0,05$ ) para atingir o efeito máximo de redução na concentração de AFB<sub>1</sub> nas massas fermentadas, uma vez que os valores se mantiveram sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos tratamentos com 30 e 60 minutos.

**Tabela 6** - Concentrações de aflatoxina B<sub>1</sub> (ng/g) nas massas à base de trigo fermentadas e não fermentadas, submetidas a diferentes tempos de ultrassom.

Fermentação da massa	Tempo de aplicação do ultrassom (min.)			
	0	10	30	60
Não Fermentada	48,21±3,42 <sup>Aa</sup>	42,24±7,62 <sup>Aa</sup>	37,89±1,83 <sup>Ab</sup>	26,99±9,09 <sup>Ac</sup>
Fermentada	46,67±6,16 <sup>Aa</sup>	23,20±6,42 <sup>Bb</sup>	21,99±5,58 <sup>Bb</sup>	19,33±3,78 <sup>Bb</sup>

<sup>ABab</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas nas colunas, ou por diferentes letras minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Segundo GAVAHIAN et al. (2021), estudos sobre a aplicação de ultrassom com menor frequência associado a fermentação dos alimentos, demonstraram melhora da atividade enzimática, de diversos setores alimentícios, como vinificação e produção de laticínios.

Os resultados do presente experimento indicam percentuais de redução nos níveis de AFB<sub>1</sub> variando de 3,6 a 46,0% nas massas não fermentadas, e de 6,7 a 61,7% nas massas fermentadas (Tabela 7), comprovando a maior eficácia do tratamento com ultrassom pelo tempo de 10 minutos, em combinação com a fermentação da massa à base de trigo.

**Tabela 7** – Percentuais (%) de redução da concentração média de aflatoxina B<sub>1</sub> (ng/g) nas massas à base de trigo fermentadas e não fermentadas, submetidas a diferentes tempos de ultrassom.

Fermentação da massa	Tempo de aplicação do ultrassom (min.)			
	0	10	30	60
Não fermentada	3,6	15,5	24,2	46,0
Fermentada	6,7	53,6	56,0	61,3

No presente experimento, a combinação das técnicas de aplicação de ultrassom com o processo de fermentação, mostrou-se eficiente para diminuição da concentração de AFB<sub>1</sub>, nas amostras, o que demonstra alta relevância comparado a métodos convencionais de descontaminação (GAVAHIAN et al., 2021).

A diminuição de toxinas relacionadas a aplicação do ultrassom pode ser levada em conta devido ao estresse causado pela cavitação que o ultrassom ocasiona quando aplicado, as correntes de energia ocasionadas pelo ultrassom estimulam a atividade celular produzindo microbolhas que vão aumentando no vácuo da aplicação e implodem, diminuindo assim a atividade da toxina (GAVAHIAN et al., 2021).

Com relação a fermentação da massa, estudos com nanopartículas de prata associado a fermentação comprovam que a aplicação de *Saccharomyces cerevisiae* demonstram grande redução ou até mesmo remoção total de aflatoxina B<sub>1</sub>, por sua alta capacidade de síntese tanto intracelular quanto extracelular quando colocada no mesmo lugar da toxina. Ela se liga na parede celular da AFB<sub>1</sub> causando a sua destruição (KERSTNER et al., 2022).

A avaliação da aplicação do ultrassom em produtos lácteos, mostrou-se como um método positivo para a indústria alimentícia, pois, há relatos que sua aplicação inativa a carga microbiana, e aumenta compostos bioativos, ocasionando também a modulação da atividade

de probióticos. Entretanto, frente ao uso do ultrassom sobre a AFB<sub>1</sub>, vale ressaltar que seus mecanismos de ação ainda não são bem compreendidos (BRITO et al., 2022; GAVAHIAN et al., 2021).

### 5.3. Efeito do ultrassom sobre a fermentação das massas à base de trigo

Na Tabela 8, são apresentados os resultados de acidez e tempo de fermentação das massas. As medições de acidez titulável foram feitas em triplicata, e para a medição foram utilizadas dez gramas de massa fermentada e misturadas por 5 minutos com 100mL de acetona:água e posteriormente foram titulados. Os resultados foram expressos como o volume (mL) de NaOH 0,1 N para titular 10 g de massa fermentada (GARCIA-MANTRANA et al., 2015). Com relação aos resultados expressados, a acidez titulável nos tempos de 10 e 30 minutos de ultrassom mantiveram o valor de 4,0 mL. Observou-se que apenas o tempo de tratamento de 60 minutos de ultrassom diminuiu o valor de acidez titulável, embora não significativa ( $P > 0,05$ ), permitindo verificar que os tratamentos com ultrassom não interferiram com a fermentação das massas, avaliada por este parâmetro (GARCIA-MANTRANA et al., 2015).

**Tabela 8** - Acidez e tempo de fermentação das massas à base de trigo fermentadas, submetidas a diferentes tempos de ultrassom.

Parâmetro	Tempo de aplicação do ultrassom (min.)			
	0	10	30	60
Acidez titulável (mL)	4,0 ± 0 <sup>a</sup>	4,0 ± 0 <sup>a</sup>	4,0 ± 0 <sup>a</sup>	3,0 ± 0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Como demonstrado nas análises, o aumento da temperatura da massa causado pelo ultrassom associado à fermentação, aumenta a distribuição constante de temperatura, o que aprimora a técnica de fermentação. O aquecimento do ultrassom em 60Hz demonstra melhora no transporte de nutrientes para a célula devido a eletroporação da membrana, que ajuda a evitar a degradação do meio de fermentação mantendo a descontaminação estável (GAVAHIAN et al., 2021).

As ondas de ultrassom podem causar alterações físicas e químicas na estrutura dos alimentos, pois quando aplicado, ele ocasiona a compressão das moléculas presentes, promovendo microbolhas no meio líquido e conseqüente cavitações nessas estruturas. Com isso, a energia gerada pelo ultrassom pode acarretar rupturas ou efeitos não destrutíveis como a sonoporação, que é um processo na qual a permeabilidade da membrana celular é modificada (GAVAHIAN et al., 2021).

O efeito da sonoporação causada pelo ultrassom nas células dos microrganismos auxilia na melhora da transferência de massa através da membrana celular, o que facilita as reações enzimáticas e conseqüente aumento da taxa de transferência de massa dos reagentes para o sítio ativo, contribuindo assim para a remoção de subprodutos de células e conseqüente redução do tempo de fermentação (GAVAHIAN et al., 2021; BRITO et al., 2022).

Vários estudos abordam a aplicação do ultrassom como instrumento de descontaminação em bebidas como vinho, cervejas, xaropes e sucos. No caso do suco de cereja, por exemplo, um estudo evidenciou que tratamentos tradicionais como a pasteurização, que é um processo de esterilização, reduz o teor de frutooligossacarídeos (FOS), que é importante devido as suas propriedades prebióticas, enquanto o ultrassom possibilitou a inativação microbiana do suco, mantendo as propriedades prebióticas do produto, e melhora da retenção de ácidos orgânicos e o teor de antocianinas (BRITO et al., 2022).

## **6. Conclusão**

Produzir alimentos e evitar a contaminação deles por aflatoxinas durante a sua cadeia produtiva, é uma questão de máxima importância para a Saúde Pública, principalmente para produtos à base de trigo. Embora a utilização de técnicas já existentes e adequadas para evitar a contaminação sejam amplamente recomendadas e utilizadas, alguns métodos de detoxificação, principalmente baseados em interações de métodos físicos e biológicos podem ser uma alternativa segura e promissora para descontaminação de alimentos contendo aflatoxinas. Segundo os resultados desse trabalho preliminar, a aplicação do ultrassom para a diminuição na concentração de AFB<sub>1</sub> se mostrou promissora, reduzindo em até 46,0% a concentração da toxina na massa à base de trigo não fermentada. No

entanto, a combinação do ultrassom no tempo de 10 minutos com a fermentação da massa, possibilitou uma redução ainda maior na concentração da AFB<sub>1</sub> no produto (53,6%). Adicionalmente, os tratamentos com ultrassom utilizados no experimento, nos tempos de 10 e 30 minutos, não interferiram com a acidez titulável e nem com o tempo de fermentação das massas, demonstrando que o ultrassom é uma técnica promissora para descontaminação de massas à base de trigo contaminadas com aflatoxinas. Estudos futuros são necessários para estabelecer outros parâmetros, tais como a temperatura e o pH do produto, visando à otimização do processo de descontaminação da AFB<sub>1</sub>, bem como avaliar possíveis efeitos do ultrassom sobre as características sensoriais dos produtos à base de trigo.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGRIOPOULOU, S.; STAMATELOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. **Foods**, v. 9, n. 2, p.137, 2020.
- ALARCON-ROJO, A.D.; JANACUA, H.; RODRIGUEZ, J.C.; PANIWNKY, L., & MASON, T. J. Power ultrasound in meat processing. **Meat Science**, 107, p.86-93, 2015.
- ALVES, L.D.L.; CICHOSKI, A.J.; BARIN, J.S.; RAMPELOTTO, C.; DURANTE, E.C.O ultrassom no amaciamento de carnes. **Ciência Rural**, v. 43, p.1522-1528, 2013.
- ANTTILA, A.; BHAT, R.V.; BOND, J.A.; BORGHOFF, S.J.; BOSCH, F.X.; CARLSON, G.P.; PEREZ, E. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 82, 2002.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC no 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. ANVISA, Brasil, 2011.
- ASSUNÇÃO, R.; MARTINS, C.; VIEGAS, S.; VIEGAS, C.; JAKOBSEN, L.E.; PIRES, S.M.; ALVITO, P. Impacto das alterações climáticas na exposição da população portuguesa a aflatoxinas. **Observações: boletim epidemiológico**, n. 22, p.25-28, 2018.
- AZEVEDO, C.C.; KASAHARA, M.K.; MONTAGNER, C.C. Método analítico para determinação dos corantes auramina em testes de ecotoxicidade e em águas superficiais. **Química Nova**, v. 44, p. 817-823, 2021.

BERNARDI, C.; RESENDE, D.D.O.; ALBUQUERQUE, A.; TIBOLA, C. **Micotoxinas no trigo**. 2018.

BIESIEKIERSKI, J. R. O que é glúten?. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 32, p. 78-81, 2017.

BOGANTES-LEDEZMA, P.; BOGANTES-LEDEZMA, D.; BOGANTES-LEDEZMA, S. Aflatoxinas. **Acta médica costarricense**, v. 46, n. 4, p.174-178, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 487, de 26 de março de 2021**. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. Brasília, 2021a. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-487-de-26-de-marco-de-2021-311593455> Acesso em: 18 ago. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa - nº 88, de 26 de março de 2021**. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Brasília, 2021b. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598> Acesso em: 18 ago. 2021

BRITO, L.M. Efeito do uso de ultrassom na viabilidade das culturas tradicionais do iogurte e culturas probióticas. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

BYLER, A.P.I. Inibição da contagem de *Samonella typhimurium* em água pela aplicação de ultrassom e agentes químicos. 2018. 52f. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

CAMPAGNOLLO, F.B.; GANEV, K. C.; KHANEGHAH, A. M.; PORTELA, J. B.; CRUZ, A. G.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M<sub>1</sub>: A review. **Food Control**, v. 68, p.310-329, 2016.

CARÃO, Á.C.D.P.; BURBARELLI, M.F.D.C.; POLYCARPO, G.D.V.; SANTOS, A.R.D.; ALBUQUERQUE, R.D.; OLIVEIRA, C.A.F. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, v. 44, p. 699-705, 2014.

COMARELLA, C.G. Ultrassom no tratamento pós-colheita de uvas cultivar Isabel e Cabernet Sauvignon e sua influência na composição de sucos. 2012. 85f. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

- CORASSIN, C.H.; BOVO, F.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA, C.A.F. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M<sub>1</sub> in UHT skim milk. **Food Control**, v. 31, p.80-83, 2013.
- DANTAS, R. Oito perguntas sobre massas. **Superinteressante**, 2016, 26 de dezembro. Disponível em: <https://super.abril.com.br/saude/a-importancia-das-massas/>. Acesso em: jul. 2021.
- DUMUTA, A.; VOSGAN, Z.; MIHALI, C.; GIURGIULESCU, L.; KOVACS, M.; SUGAR, R.; MIHALESCU, L. The influence of unconventional ultrasonic pasteurization on the characteristics of curds obtained from goat milk with the low cholesterol content. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 89, p.106155, 2022.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B<sub>1</sub> as undesirable substance in animal feed. **EFSA Journal**, v.2, n.3, p.39, 2004.
- FARIDI, H. **The science of cookie and cracker production**. Chapman and Hall, 1994.
- FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência**, v.2, n.1, p.113-127, 2006.
- FORRESTER, L.M.; NEAL, G. E.; JUDAH, D.J.; GLANCEY, M.J.; WOLF, C.R. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism in human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87, n.21, p.8306-8310, 1990.
- FRANCO, L.T.; PETTA, T.; ROTTINGHAUS, G.E.; BORDIN, K.; GOMES, G.A.; ALVITO, P.; OLIVEIRA, C.A.F. Assessment of mycotoxin exposure and risk characterization using occurrence data in foods and urinary biomarkers in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.128, p. 21–34, 2019.
- GIANG, L.T.; THIEN, T.L.T. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in cashew nut by UHPLC-HRMS. **Vietnam Journal of Chemistry**, v.58, n.4, p.540-547, 2020.
- GONÇALVES, B. Micotoxinas: Uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. **Revista de Saúde-RSF**, v.4, n.1, 2017.
- GARCÍA-MANTRANA, I.; MONEDERO, V.; HAROS, M. Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 improves mineral availability of high fibre rye-wheat sour bread. **Food chemistry**, v.178, p.267-275, 2015.

- GAVAHIAN, M.; MATHAD, G.N.; OLIVEIRA, C.A.F.; KHANEGHAH, A.M. Combinations of emerging technologies with fermentation: Interaction effects for detoxification of mycotoxins? **Food Research International**, p.110104, 2021.
- GRENIER, B.; LOUREIRO-BRACARENSE, A.P.; LESLIE, J.F.; OSWALD, I.P. Physical and chemical methods for mycotoxin decontamination in maize. **Mycotoxin reduction in grain chains**, p.116-129, 2014.
- GUERRA, F.L.; CUNHA, E.G.D.; SILVA, A.C.S.B.D.; KNOP, S. Análise das condições favoráveis à formação de bolor em edificação histórica de Pelotas, RS, Brasil. **Ambiente Construído**, v.12, n. 4, p.7-23, 2012.
- HUDU, A.R.; KOMLA, M.G.; OPOKU, N. Influence of Indigenous Processing Methods on Aflatoxin Occurrence in Africa, in: Aflatoxins - Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks. **IntechOpen**, 2022.
- JAGER, A.V.; TONIN, F.G.; BAPTISTA, G.Z.; SOUTO, P.C.; OLIVEIRA, C.A.F. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.219, p.294-300, 2016.
- JÄNISCH, B.D. **Determinação multiclasse de agrotóxicos em camas biológicas empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**. 2022.
- JÚNIOR, D.S.T.; SANTOS, S.N.; DE SOUSA MARQUES, A.B.; FARIAS, K.P.; SOUZA, A.B.; LIMA, G.N.; RODRIGUES, J.L. Revisão sobre cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas aplicada à análise toxicológica de alimentos. **Research, Society and Development**, v.10, n.5, p. e47910515419, 2021.
- KERSTNER, F.; PIVATO, A.F.; COMITRE, A.A.; SIBAJA, K.V.M.; SANTOS, L.O.; GARDABUFFON, J. Remoção de aflatoxina B1 por nanopartículas de prata sintetizadas em meio fermentado do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. **Tecnologia e Microbiologia Sob a Perspectiva da Segurança dos Alimentos**, v. 2, n.13, p. 163-177, 2022.
- LI, J.; HOU, G.G.; CHEN, Z. Whole grain saltine crackers: Formulation, processing, and quality improvements. **Cereals Food World**, v. 58, p.180-185, 2013.
- LIU, Y.; LI, M.; LIU, Y.; BIAN, K. Structures of reaction products and degradation pathways of aflatoxin B1 by ultrasound treatment. **Toxins**, v.11, n.9, p.526, 2019.
- Ma, H.; Liu, M.; Liang, Y.; Zheng, X.; Sun, L.; Dang, W.; Liu, C. Research progress on properties of pre-gelatinized starch and its application in wheat flour products. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 5, p.87–97, 2022.
- MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; WENTZ, I. Aflatoxinas-Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, v.24, p.635-643, 1994.

- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1 p. 89-99, 2010.
- MOTTA, T.P.; DUARTE, K.M.R. ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos. **PUBVET**, Londrina, v.4, n.42, Ed. 147, Art. 989, 2010.
- NORONHA, M.V.P.; DE ALENCAR, R.D.N.; COSTA, J.C.; BACHUR, T.P.R. Exposição crônica a Aflatoxina B<sub>1</sub> e oncogênese do carcinoma hepatocelular. **RevInter**, v.13, n. 3, 2020.
- NOROOZI, R.; KOBARFARD, F.; REZAEI, M.; AYATOLLAHI, S.A.; PAIMARD, G.; ESLAMIZAD, S.; SADEGHI, E. Occurrence and exposure assessment of aflatoxin B<sub>1</sub> in Iranian breads and wheat-based products considering effects of traditional processing. **Food Control**, v.138, p.108985, 2022.
- URREGO NOVOA, J.R.; DÍAZ, G.J. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. **Revista de la Facultad de Medicina**, v.54, n.2, p.108-116, 2006.
- OLIVEIRA, C.A.F.; BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; JAGER, A.V.; REDDY, K.R. Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. **Aflatoxins-recent advances and future prospects**, v.1, p.59-62, 2013.
- OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n.4, p.417-424, 1997.
- OLIVEIRA, C.A.F.; CORASSIN, C.H.; CORRÊA, B.; OSWALD, I.P. Animal health: mycotoxins. In: Neal Van Alfen (Ed). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, London: Academic Press, pp.358-377, 2014.
- OLIVEIRA, V.S. Efeito do ultrassom e plasma a frio nas propriedades do suco de acerola. 2017. 148f. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- PEÑA, D.G.D. La exposición a la aflatoxina B<sub>1</sub> en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. **salud pública de méxico**, v.49, n.3, p.227-235, 2007.
- PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química nova**, v.30, p.171-177, 2007.
- QUADROS JUNIOR, J.V.D. Estudo da reação de epoxidação do óleo de soja em condição de remoção de calor máxima. 2015. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.
- RAMPELOTTO, C. Pasteurização de salsichas com ultrassom e micro-ondas. 2012. 82f. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

- ROCHA, A. R. Ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em cervejas produzidas no Brasil e sua avaliação de risco carcinogênico. 2021. 75f. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal da Bahia, 2021.
- SAAD-HUSSEIN, A.; SHAHY, E.M.; SHAHEEN, W.; TAHA, M.M.; MAHDY-ABDALLAH, H.; IBRAHIM, K.S.; EL-SHAMY, K.A. Comparative hepatotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> among workers exposed to different organic dust with emphasis on polymorphism role of glutathione S-transferase gene. Open Access Macedonian **Journal of Medical Sciences**, v.4, p.312, 2016.
- SAKATA, R.; SABBAG, S.; MAIA, J.T. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13, 2011.
- SAS Institute. **SAS® User's Guide**: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC., 1992.
- SCHEUER, P.M.; FRANCISCO, A.D.; MIRANDA, M.D.; LIMBERGER, V.M. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n.2, p.211-222, 2011.
- SCHRENK, D.; BIGNAMI, M.; BODIN, L.; CHIPMAN, J. K.; DEL MAZO, J.; WALLACE, H. Risk assessment of aflatoxins in food. **EFSA Journal**, v.18, n.3, p.e06040, 2020.
- SOUZA, R.G.D.; FILHO, V.; RIBEIRO, J.E. **Produção de trigo no Brasil: indicadores regionais e políticas públicas**. 2020.
- STEINBACH, J. Perfil emocional e de consumo: influência de diferentes estilos de cerveja no comportamento de consumidores e não consumidores da região sul do país. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2022.
- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.9, p.18, 2012.
- TING, W.E.; CHANG, C.H.; SZONYI, B.; GIZACHEW, D. Growth and Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> Production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on *Ground Flax Seeds* (*Linum usitatissimum*). **Journal of food protection**, v. 83, n. 6, p. 975-983, 2020.
- VIEIRA, A.P.; BADIALE-FURLONG, E.; OLIVEIRA, M.L.M. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. **Food Science and Technology**, v.19, n.2, p.221-225, 1999.
- XIONG, X.; LIU, C.; SONG, M.; ZHENG, X. Effect of characteristics of different wheat flours on the quality of fermented hollow noodles. **Food Science & Nutrition**, v.9, n.9, p.4927-4937, 2021.