

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ALINE INACIO ALVES

**DESCONTAMINAÇÃO DE CASTANHAS UTILIZANDO
TECNOLOGIAS FÍSICAS**

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

ALINE INACIO ALVES

**DESCONTAMINAÇÃO DE CASTANHAS UTILIZANDO
TECNOLOGIAS FÍSICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2018

ALINE INACIO ALVES

**DESCONTAMINAÇÃO DE CASTANHAS UTILIZANDO
TECNOLOGIAS FÍSICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA:

Érica Nascif Rufino Vieira

Ebenézer de Oliveira
(Coorientador)

Paulo César Stringueta

Guilherme Zocolo
(Coorientador)

Afonso Mota Ramos
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a vida e me guiar por toda essa experiência que não foi fácil, mas muito gratificante e enriquecedora.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de cursar o doutorado, pela confiança depositada e muitos ensinamentos.

À Embrapa Agroindústria Tropical pela estrutura fornecida para o desenvolvimento da minha pesquisa e aprendizado adquirido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida durante o período de doutorado.

Ao Professor Afonso Mota Ramos, pela oportunidade, confiança e orientação tanto no mestrado como no doutorado.

Ao Dr. Ebenézer de Oliveira Silva, por ter me acolhido nessa jornada, pela paciência, preocupação e ensinamentos, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, pela oportunidade de convívio, confiança, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Andreia, Dra. Ana Paula, Dr. Freire, pela disponibilidade de uso dos laboratórios e auxílio nas análises.

Aos Analistas, Paulo, Samara, Márcia e Lorena que tanto me ajudaram nas análises e tanto me ensinaram.

À minha mãe e meu pai pelo dom da vida e apoio sempre. Minha mãe pela grande ajuda na reta final e amor incondicional.

Aos meus irmãos por fazerem parte da minha vida e torcerem pelas minhas conquistas.

Ao meu amado marido Samuel que se manteve durante toda essa caminhada ao meu lado me dando força, e mesmo com a distância se fez companheiro em todos os momentos. Agradeço o apoio, amizade, ajuda e o amor.

Ao meu filho querido e amado Henrique que me mostrou como posso ser mais forte que imagino e me acompanhou durante o último ano do doutorado.

À minha querida amiga Marcela que sempre me apoio e mesmo com a distância se fez presente.

Aos amigos que a Embrapa me proporcionou e que me ajudaram durante todo o tempo em Fortaleza: Hérica, Diana, Darlene, Samara, Mateus, Laisa, Márcia, Luiza, Aline, Branca e Camila.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste estudo.

BIOGRAFIA

Aline Inacio Alves, filha de Pedro Cândido Alves e Neuzedina Inacio Alves, nasceu em Alegre, Espírito Santo no dia 27 de março de 1989.

Em fevereiro de 2012, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, em Alegre-ES. No período de 2009 a 2011 foi bolsista de iniciação científica e trabalhou com recobrimento comestível em morango e Modelagem e simulação de sistemas térmicos.

Em março de 2012, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2014.

Em março de 2014, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em junho de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
CAPÍTULO I	12
INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos.....	15
JUSTIFICATIVA	16
CONTEÚDO DO TRABALHO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II	21
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE ASPERGILLUS FLAVUS AOS TRATAMENTOS DE LUZ ULTRAVIOLETA PULSADA E PLASMA FRIO A BAIXA PRESSÃO	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
Tratamento UV-p.....	23
Tratamento por PFBP	24
Preparo suspensão de esporos.....	24
Aplicação PFBP e UV-p em suspensão de <i>A. flavus</i>	24
Avaliação UV-p e PFBP em castanhas com <i>Aspergillus flavus</i>	24
Análise Estatística	25
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO III	37
AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA PULSADA E PLASMA FRIO A BAIXA PRESSÃO NA AFLATOXINA B1	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	40

Tratamento por UV-p.....	40
Tratamento por PFBP	40
Cinética de degradação da Aflatoxina B1 por UV-p e PFBP	40
Análise cromatográfica dos produtos de degradação da Aflatoxina B1	41
Condições do Massas de Alta resolução - XEVO-QToF	41
Toxicidade por meio do bioensaio com Artemia salina	42
Análise Estatística	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
Degradação de AFB1 em várias concentrações iniciais e cinéticas.....	43
Formação dos produtos de degradação da AFB1	49
Produtos de degradação Aflatoxina B1 tratada com UV-p	49
Produtos de degradação Aflatoxina B1 tratada com Plasma frio a baixa pressão	53
Ensaio de Toxicidade	58
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO IV	65
AVALIAÇÃO DAS CASTANHAS DO PARÁ E DE CAJU CONTAMINADAS COM AFLATOXINA B1 E TRATADAS COM LUZ ULTRAVIOLETA PULSADA E PLASMA FRIO A BAIXA PRESSÃO	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT	66
INTRODUÇÃO	66
MATERIAL E MÉTODOS.....	68
Tratamento de Luz pulsada.....	68
Tratamento por plasma a frio	68
Extração Aflatoxina das castanhas	68
Avaliação UV-p e PFBP em castanhas de caju e do Pará com AFB1	68
Efeito UV-p e plasma em castanhas	69
Capacidade antioxidante	69
Compostos fenólicos	70
Oxidação lipídica	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
CONCLUSÕES	81

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO V	87
CONCLUSÕES GERAIS.....	87

RESUMO

ALVES, Aline Inacio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Descontaminação de castanhas utilizando tecnologias físicas.** Orientador: Afonso Mota Ramos. Coorientadores: Ebenézer de Oliveira Silva e Guilherme Julião Zocolo.

A contaminação por aflatoxinas é um problema sério no Brasil principalmente devido às condições climáticas (umidade e alta temperatura), às práticas de agricultura e as condições de estocagem, sendo a Aflatoxina B1 (AFB1) a com maior potencial carcinogênico. Os grãos e castanhas são os principais alvos dos fungos responsáveis pela produção desta toxina. Visando este problema o objetivo deste trabalho foi estudar a aplicação de luz ultravioleta pulsada (UV-p) e plasma frio a baixa pressão (PFBP), na eliminação do fungo *Aspergillus flavus* e degradação da Aflatoxina B1 em solução aquosa e em castanhas de caju e do Pará. Inicialmente, *A. flavus* foi artificialmente inoculado em castanhas de Caju e do Pará que foram tratadas com PFBP por 30 minutos e UV-p com fluência de $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Após o tratamento com plasma, a inativação de *A. flavus* em castanha do Pará foi de 4 ciclos log e em castanha de Caju foi de 3 ciclo log. As tratadas com UV-p tiveram redução de 4 ciclos logs para os dois tipos de castanhas. A Aflatoxina B1 em solução aquosa foi tratada com UV-p e PFBP e obteve-se redução de 95% e 84%, respectivamente. A degradação da AFB1 mostrou seguir uma cinética de reação de primeira ordem ($R^2 \geq 0,95$). Após o tratamento com UV-p foram identificados formação de 4 compostos e para o PFBP 2 compostos foram formados e identificados utilizando cromatografia líquida de ultra-desempenho - espectrometria de massa acoplado ao sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (UPLC-Q-TOF MS). A toxicidade da AFB1 usando *Artemia Salina* foi significativamente diminuída. E por último foi realizado um estudo com as castanhas que foram inoculadas com AFB1 e tratadas. O tratamento de $12\text{J}\cdot\text{cm}^2$ de UV-p reduziu 58% de AFB1 em Caju e 91% em castanha do Pará. O PFBP reduziu 73% de AFB1 em Caju e 65,3% em castanha do Pará. Foram realizadas avaliações de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e oxidação lipídica nas castanhas antes e após os tratamentos. Não houve alteração na capacidade antioxidante e índice de peróxido. Houve pequena alteração na acidez das

castanhas de caju e quanto os compostos fenólicos observou-se redução nas duas castanhas após aplicar o PFBP. Os resultados obtidos sugerem que as tecnologias tem um potencial promissor para degradar, desintoxicar produtos contaminados com AFB1.

ABSTRACT

ALVES, Aline Inacio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august de 2018. ***Decontamination of nuts using physical technologies.*** Adviser:: Afonso Mota Ramos. Committee members: Ebenézer de Oliveira Silva e Guilherme Julião Zocolo.

Aflatoxin contamination is a serious problem in Brazil, mainly due to climatic conditions (humidity and high temperature), agriculture practices and storage conditions, with Aflatoxin B1 (AFB1) being the most carcinogenic potential. Grains and nuts are the main targets of fungi responsible for the production of this toxin. Aiming at this problem, the objective of this work was to study the application of pulsed ultraviolet light (UV-p) and cold plasma at low pressure (PFBP), elimination of *Aspergillus flavus* fungus and degradation of Aflatoxin B1 in aqueous solution and in cashew nuts and of Pará. Initially, *A. flavus* was artificially inoculated in caju and Pará nuts that were treated with PFBP for 30 minutes and UV-p with $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ fluence. After treatment with plasma, the inactivation of *A. flavus* in Brazil nut was 4 log cycles and in cashew was 3 log cycle. Those treated with UV-p had a reduction of 4 log cycles for the two types of nuts. Aflatoxin B1 in aqueous solution was treated with UV-p and PFBP and obtained reduction of 95% and 84%, respectively. The degradation of AFB1 showed a first-order reaction kinetics ($R^2 \geq 0.95$). After treatment with UV-p, formation of 4 compounds was identified and for PFBP 2 compounds were formed and identified using ultra-performance liquid chromatography - mass spectrometry coupled to the Quadripole / Flight Time (UPLC-Q-TOF MS). The toxicity of AFB1 using *Artemia Salina* was significantly decreased. Finally, a study was carried out with the nuts that were inoculated with AFB1 and treated. Treatment of $12\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ of UV-p reduced 58% of AFB1 in caju and 91% in Pará nuts. PFBP reduced 73% of AFB1 in caju and 65.3% in Pará nuts. Evaluations of phenolic compounds, antioxidant capacity and lipid oxidation in nuts before and after treatments. There was no change in antioxidant capacity and peroxide index. There was a small change in the acidity of the cashew nuts and, as for the phenolic compounds, there was a reduction in the two nuts after applying the PFBP. The results obtained suggest that the technologies have a promising potential to degrade, detoxify products contaminated with AFB1.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

Contaminação por aflatoxinas (AF) é um dos principais problemas para grãos armazenados, nozes sem casca, leite e frutas secas, principalmente porque são susceptíveis a colonização por fungos filamentosos. Os fungos *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) e *Aspergillus parasiticus* (*A. parasiticus*) ocorrem como contaminação natural, e produzem aflatoxinas como metabólitos secundários (MOLYNEUX et al., 2007; WANG et al., 2016). Produtores se esforçam para minimizar o crescimento de fungos e produção de aflatoxina em castanhas do Pará e de caju, devido às condições climáticas que favorecem a produção da toxina (De MELLO e SCUSSEL, 2009; PACHECO et al., 2010).

A incidência destas toxinas em commodities agrícolas tem impacto negativo sobre a economia das regiões afetadas, especialmente nos países em desenvolvimento onde a colheita e a pós-colheita são realizadas sem a preocupação com a prevenção de crescimento de fungos (GRIESSLER e ENCARNAÇÃO, 2009; BOVO, CORASSIN, OLIVEIRA, 2010; ATAYDE et al., 2014).

Com o aumento do conhecimento e consciência de que a aflatoxina é uma poderosa fonte de riscos para a saúde para os homens e animais, um grande esforço tem sido feito para eliminar completamente a toxina ou reduzir o seu teor em alimentos e rações para níveis significativamente mais baixos (RUSTOM, 1997; ATAYDE et al., 2014). Valores esses estabelecidos pela legislação como inferiores a $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Brasil, 1996).

A Agência Internacional de Investigação de Câncer (IARC) classificou a aflatoxina B1 (AFB1) no Grupo I como um carcinogêneo humano (IARC, 1997). Todos os animais, especialmente aves, gado e peixes, podem ser vulneráveis à toxicidade aguda de AFB1 a partir de alimentos contaminados (EATON e GROOPMAN, 1994).

Uma variedade de tratamentos químicos (incluindo amônia, peróxido de hidrogênio, bissulfito de sódio, cloro, ozônio, ácidos e alcalinos) e tratamentos físicos (incluindo irradiação gama, calor, radiação de micro-ondas e ultravioleta

e luz visível) têm sido estudados para degradar e descontaminar produtos com aflatoxinas e eliminar a viabilidade dos fungos, mas todos têm limitações significativas devido à falta de adequação para uso em substratos de alimentos sólidos, degradação incompleta, retenção de toxicidade residual, alteração química de nutrientes no substrato alimentar, ou a criação de subprodutos residuais indesejáveis (SAMARAJEEWA et al., 1990; WANG et al., 2016).

Luz ultravioleta pulsada (UV-p) é uma tecnologia "não-térmica" aprovada pelo FDA (FDA, 1996) com o potencial de ser usado em processos convencionais. A tecnologia UV-p cria curtos pulsos, de alta intensidade de amplo espectro de luz branca. Os espectros completos incluem ultravioleta, visível e infravermelho. Pesquisadores descobriram o potencial da aplicação de UV-p na degradação de micotoxinas, como por exemplo, Moreau et al. (2011), relataram a degradação de zearalenona, desoxinivalenol, Aflatoxina AFB1 e Ocratoxina. No entanto, a degradação de aflatoxinas por tratamento UV-p em castanhas não foi testado.

Outra tecnologia que pode ser testada como uma forma de degradação de micotoxinas é o plasma a frio que é um gás parcialmente ionizado (SCHOLTZ et al., 2015). Tem como aplicação evitar formação de biofilmes e eliminar micro-organismos, é utilizado em materiais que são sensíveis aos produtos químicos e/ou calor, evitando que substâncias químicas deixem componentes remanescentes na superfície (KRAMER et al., 2015). Micro-organismos, como *Penicillium* e *Aspergillus*, são inativados por meio de plasma (SOUSKOVA et al., 2011; PARK et al., 2012).

Novas aplicações de plasma frio têm sido propostas no setor de processamento de alimentos, como a degradação da atividade de enzimas, em alguns casos com a consequente melhoria da qualidade visual do produto (PANKAJ, MISRA, CULLEN, 2013; SUROWSKY et al., 2013; TAPPI et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi estudar as tecnologias UV-p e o PFBP, aplicadas na degradação da aflatoxina B1, fazendo um estudo inicial com *Aspergillus flavus*, uma avaliação cinética da degradação da aflatoxina B1 e a utilização das tecnologias para descontaminar castanhas de caju e castanhas do Pará contaminadas com a micotoxina, e o impacto dos tratamentos nas características físicas e químicas das castanhas.

HIPÓTESES

Este trabalho está alicerçado sobre as seguintes hipóteses:

- As Tecnologias de luz ultravioleta pulsada (UV-p) e Plasma frio a baixa pressão (PFBP) degradam a Aflatoxina B1 e reduz a toxicidade da micotoxina.
- As Tecnologias de UV-p e PFBP reduzem a contaminação de *Aspergillus flavus* nas castanhas de Caju e Castanhas do Pará.
- As Tecnologias de UV-p e PFBP reduzem a concentração de Aflatoxina B1 nas castanhas de Caju e Castanhas do Pará.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a eficiência das técnicas de luz ultravioleta pulsada (UV-p) e Plasma frio a baixa pressão (PFBP) como um tratamento para degradar Aflatoxina e *Aspergillus flavus* em castanha de caju e castanha do Pará.

Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de *Aspergillus flavus* antes e após tratamento com UV-p e PFBP.
- Estudar a cinética de degradação da aflatoxinas B1 tratada com UV-p e PFBP.
- Avaliar o crescimento de *Aspergillus flavus* em castanha do Pará e de caju antes e após tratamento com UV-p e plasma.
- Analisar a estabilidade de oxidação do óleo das castanhas antes e após o tratamento com UV-p e PFBP.
- Avaliar a capacidade antioxidante, os compostos fenólicos nas castanhas antes e após tratamento com UV-p e PFBP.
- Estudar a toxicidade da Aflatoxina B1 após o tratamento com UV-p e PFBP.
- Quantificar a degradação de Aflatoxina B1 nas castanhas antes e após tratamento com UV-p e PFBP.

JUSTIFICATIVA

Observa-se um aumento na preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos. Alguns alimentos oferecem maior risco devido contaminação e produção de toxinas, como as castanhas que quando contaminadas por um grupo de fungos da família *Aspergillus*, podem ter presença de aflatoxina que é uma toxina carcinogênica. Tanto que existe uma legislação específica para presença desta toxina em alimentos.

Após contaminação e produção da toxina perde-se o produto, formas para descontaminar esses produtos ajudariam na redução das perdas de alimentos, principalmente de produtos com muito valor agregado como é o caso das castanhas.

CONTEÚDO DO TRABALHO

Este trabalho está dividido em cinco capítulos, sendo um capítulo introdutório, três no formato de artigo científico, contendo as discussões sobre o tema proposto e um capítulo de conclusões gerais.

O primeiro capítulo apresenta informações necessárias para melhor compreensão do trabalho desenvolvido e engloba uma introdução geral sobre o assunto a ser abordado e seus objetivos gerais e específicos.

O segundo capítulo consiste no estudo do uso das tecnologias de UV-p e Plasma frio a baixa pressão (PFBP) na eliminação de *Aspergillus flavus* em meio BDA e nas castanhas de caju e do Pará.

No terceiro capítulo é abordada a cinética de degradação da toxina quando empregado o PFBP e a UV-p e os produtos formados.

No quarto capítulo se propõe avaliar a aplicação da UV-p e do PFBP na degradação da aflatoxina B1 nas castanhas de caju e do Pará.

O capítulo referente às conclusões gerais aborda os principais achados dos três capítulos, resumindo os mesmos com enfoque nos objetivos inicialmente propostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATAYDE, H. M.; OLIVEIRA, I. M. A.; INHAMUNS, A. J.; TEIXEIRA, M. F. S. Fungos toxigênicos e micotoxinas na alimentação de peixes: uma revisão. **Scientia Amazonia**, v. 3, n.3, 59-71, 2014.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de Aflatoxinas em Alimentos por Bactérias Ácido-Láticas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 15-21, 2010.

CULLEN, J.M. & NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (eds.) *The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press Inc., 3-26, 1994.

DE MELLO-ROBERT, F.; SCUSSEL, V. M. Development of physical and optical methods for in-shell Brazil nuts sorting and aflatoxin reduction. **Journal of Agricultural Science**, v. 1, p. 3–14, 2009.

GRIESSLER, K.; ENCARNAÇÃO, P. Fumonisin - mycotoxins of increasing importance in fish! *Aquaculture Asia Magazine*, abril/junho de 2009. Disponível em: <<http://library.enaca.org/AquacultureAsia/Articles/april-june-2009/aquaculture-asia-april-09.pdf>>. Acesso em 16 abril 2016.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs**, v.56, p.245-395, 1997.

KRAMER, A.; BEKESCHUS, S.; MATTHES, R.; BENDER, C.; STOPE, M. B.; NAPP, M.; LADEMANN, O.; LADEMANN, J.; WELTMANN, K.; SCHAUER, F. Cold Physical Plasmas in the Field of Hygiene—Relevance, Significance, and Future Applications. **Plasma Processes and Polymers**, v.12, p.1410–1422, 2015.

MOLYNEUX, R. J., MAHONEY, N.; KIM, J. H.; CAMPBELL, B. C. Mycotoxins in edible tree nuts. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.72–78, 2007.

MOREAU, M.; LESCURE, G.; AGOULON, A.; SVINAREFF, P.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation. **Journal of Applied Toxicology**, v.33, n.5, p. 357-363, 2011.

PACHECO, A. M.; LUCAS, A.; PARENTE, R.; PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p. 330–334, 2010.

PANKAJ, S.K.; MISRA, N.N.; CULLEN, P.J. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p.153–157, 2013.

PARK, G.; RYU, Y. H.; HONG, Y. J.; CHOI, E. H.; UHM, H. S. **Applied Physics Letters**, v. 100, p.063703, 2012.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SAMARAJEewa, U.; SEN, A. C.; COHEN, M. D.; WEI, C. I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 6, p. 489-501, 1990.

SCHOLTZ, V.; PAZLAROVA, J.; SOUSKOVA, H.; KHUN, J.; JULAK, J. Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1108–1119, 2015.

SOUSKOVA, H.; SCHOLTZ, V.; JULAK, J.; KOMMOVA, L.; SAVICKA, D.; PAZLAROVA, J. The survival of micromycetes and yeasts under the low-temperature plasma generated in electrical discharge. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 77, 2011.

SUROWSKY, B.; FISCHER, A.; SCHLUETER, O.; KNORR, D. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Technol.v.19, p.146–152, 2013.

TAPPI, S.; BERARDINELLI, A.; RAGNI, L.; DALLA ROSA, M.; GUARNIERI, A.; ROCCULI, P. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 21, p. 114-122, 2014.

WANG, B.; MAHONEY, N. E.; PAN, Z.; KHIR, R.; WU, B.; MA, H.; ZHAO, L. Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. **Food Control**, v. 59, p. 461-467, 2016.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* AOS TRATAMENTOS DE LUZ ULTRAVIOLETA PULSADA E PLASMA FRIO A BAIXA PRESSÃO

RESUMO

A influência do plasma frio a baixa pressão (PFBP) e a luz ultravioleta pulsada (UV-p) no crescimento de *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) foram investigadas como uma alternativa aos tratamentos químicos e térmicos. Primeiramente estudou-se a aplicação de diferentes tratamentos em suspensões de esporos de *A. flavus*, para definir os melhores tratamentos de UV-p e PFBP. Então, *A. flavus* foi artificialmente inoculado em castanhas de caju e do Pará que foram tratadas com PFBP por 30 minutos e UV-p com fluência de $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Após o tratamento com PFBP, a inativação de *A. flavus* em castanha do Pará foi de 4 ciclos log e 3 ciclos na castanha de caju, e as tratadas com UV-p tiveram redução de 4 ciclos logs para os dois tipos de castanhas. Estes resultados sugerem que o plasma frio e UV-p podem ser considerados métodos alternativos para a descontaminação de alimentos, devido ao seu potencial de inativação microbiana.

Palavras-chave: Castanha de caju, Castanha do Pará, esporos e descontaminação.

ABSTRACT

The influence of cold plasma at low pressure (PFBP) and pulsed ultraviolet light (UV-p) on the growth of *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) was investigated as an alternative to chemical and thermal treatments. Firstly the application of different treatments on spore suspensions of *A. flavus* was studied to define the best UV-p and PFBP treatments. Then, *A. flavus* was artificially inoculated in cashew and Pará nuts that were treated with PFBP for 30 minutes and UV-p at $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. After treatment with PFBP, the inactivation of

A. flavus in Brazil nut was 4 log cycles and 3 cycles in cashew nuts, and those treated with UV-p had a reduction of 4 log cycles for both types of nuts. These results suggest that cold plasma and UV-p can be considered alternative methods for food decontamination because of their potential for microbial inactivation.

Key words: Cashew nuts. Pará nuts, spores and decontamination.

INTRODUÇÃO

A conscientização mundial para a produção de alimentos seguros e saudáveis aumentou e existem pontos na cadeia produtiva que apresentam grandes problemas quanto a contaminação. Métodos inadequados de pós-colheita, manuseio, transporte e armazenamento levam ao crescimento de fungos filamentosos, o que resulta na produção de micotoxinas (FAO, 2011).

Aspergillus spp. é uma espécie responsável pela contaminação e posterior produção de aflatoxinas no campo, na colheita, durante as operações de pós-colheita e armazenamento de castanhas. Devido ao risco relativamente alto de contaminação de castanhas, o aprimoramento do processamento pós-colheita com métodos de descontaminação são de grande interesse dos aspectos econômicos, de saúde pública e ambiental (Williams et al., 2004; Kendra e Dyer, 2007).

As micotoxinas são os metabólitos secundários produzidos pelos fungos e causam a contaminação de muitos produtos agrícolas (FAO, 2011). O *Aspergillus flavus*, em particular, produz aflatoxinas B1 e B2, que são os carcinogêneos hepáticos, produzidos naturalmente. Além dos problemas causados à saúde existe a perda econômica devido à contaminação por aflatoxina (Ellis et al., 1991; Eaton & Groopman, 1994). Os esporos de *Aspergillus flavus* estão presentes no ar, no solo, restos de plantas e grãos colhidos (Nierman et al., 2015).

Vários métodos foram desenvolvidos para a inibição do crescimento de fungos e produção de micotoxinas (Basaran et al., 2008). O plasma frio é um

gás ionizado contendo átomos ou moléculas em um estado metaestável com uma carga elétrica líquida zero (Misra et al., 2016). No processamento de alimentos, o plasma frio é amplamente utilizado para a inativação microbiana, inativação enzimática, germinação de sementes, sanitização de vegetais, higienização de embalagens dentre outras utilizações (Pankaj et al., 2013; Jiafeng et al., 2014; Thirumdas et al., 2015; Berardinelli et al., 2016; Devi et al., 2017; Misra e Jo, 2017). A química do plasma depende de vários fatores, como composição do gás de alimentação, umidade relativa, potência fornecida e tempo de tratamento. Radicais livres, íons, luz ultravioleta e outras espécies químicas reativas formadas durante a geração de plasma, juntas reagem com micróbios e levam à destruição. As espécies reativas superam o sistema de defesa natural dos microrganismos resultando em danos ao DNA, proteínas, lipídios e membranas (Yong et al., 2014).

A implementação de UV-p para inativar microrganismos ganhou interesse por ser um tratamento de curta duração (Krishnamurthy et al., 2010). Esta tecnologia utiliza pulsos de curta duração (100 e 400 μ s) de um amplo espectro, entre 100 e 1100 nm, com 54% de energia emitida na faixa ultravioleta (Gomez-López et al., 2007; Oms-Oliu et al., 2010). A ação da UV-p ocorre devido a efeitos fotoquímicos (formação de dímeros de pirimidina), fototérmico (aquecimento devido a energia transmitida pela luz) e fotofísico (encolhimento da membrana) (Gomez-López et al., 2007; Wekhof, 2000; Ferrario et al., 2013; Krishnamurthy et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi analisar a resposta dos esporos de *Aspergillus flavus* in vitro e inoculados em castanhas de caju e do Pará após tratamento com PFBP e UV-p.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamento UV-p

Para os tratamentos com UV-p, foi utilizada uma câmara UV-p (SteriBeam, modelo XeMaticA-2LXL) com duas lâmpadas de xénon posicionadas lateralmente, com capacidade para um pulso a cada 15 segundos

e energia de $0,3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{pulso}^{-1}$ (para pulsos com 100% de potência das lâmpadas). Foram utilizadas as fluências de 6, 9 e $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Tratamento por PFBP

Os tratamentos de plasma a frio foram realizados utilizando um sistema de plasma de mesa PE-100 (Plasma Etch, EUA) e potência de 30 W. O plasma foi gerado com Ar sintético (grau FID 4.5, pureza 99,95%, White Martins, Brasil), aplicando um campo elétrico de 80 kHz através do eletrodo. O processo foi realizado no modo plasma indireto, o que significa que o plasma foi gerado e depois alimentado na câmara de processamento, que continha a amostra. Foi usada taxa de fluxo de gás de $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os tratamentos foram realizados durante 10, 20, 30 e 40 min sob condições de vácuo (30 kPa).

Preparo suspensão de esporos

Os esporos foram obtidos do micélio crescido em um ágar dextrose batata a 27°C durante 7 dias e foram coletados inundando a superfície das placas com água estéril. Depois de contar os esporos, usando câmara de Neubauer, a suspensão foi padronizada em concentrações de 10^6 esporos· mL^{-1} por diluição com água estéril.

Aplicação PFBP e UV-p em suspensão de *A. flavus*

Os tratamentos de UV-p nas fluências de 6, 9 e $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, foram aplicados nas suspensões de esporos 10^4 esporos· mL^{-1} . A suspensão tratada foi inoculada em placas contendo BDA e após 2 dias a 27°C foi realizada contagem de número de colônias.

Para o tratamento com PFBP a suspensão de esporos foi seca em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) em placas de petri e em seguida exposta ao tratamento com PFBP nos diferentes tempos. Após o tratamento foi realizada a suspensão dos esporos com água estéril e então foi inoculado em placas contendo BDA e depois de 2 dias a 27°C foi realizada contagem de número de colônias.

Avaliação UV-p e PFBP em castanhas com *Aspergillus flavus*

As castanhas foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5 %, enxaguou-se três vezes em água destilada estéril e secou-se com papel

absorvente estéril. Depois disso, as castanhas foram secas sob uma capa de fluxo laminar por várias horas (Selcuk et al., 2008). Então aplicou-se a suspensão de esporos de *Aspergillus flavus* na concentração de 10^4 esporos·mL⁻¹. As castanhas contaminadas foram expostas a energia de 12 J·cm⁻² utilizando o UV-p e PFBP com fluxo de 30 mL·min⁻¹ durante 30 minutos. Após tratadas foram realizadas as análises de crescimento de fungos por meio de contagem do número de colônias utilizando placas contendo BDA que foram incubadas durante 48 horas a 27 °C.

Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, em triplicata e 5 repetições. Os dados obtidos foram interpretados por análise de variância (ANOVA) utilizando teste F ao nível probabilidade de 5%. Quando os resultados apresentaram diferença significativa pelo teste F entre as amostras foi utilizado teste de Tukey para comparação de médias. Para a execução da análise estatística foi utilizado o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 1 e 2 estão apresentadas as curvas de redução de esporos de *Aspergillus flavus* tratados por UV-p e PFBP. A contagem inicial de esporos de *A. flavus* foi de $3,5 \times 10^5$ UFC·g⁻¹. O Tratamento de UV-p com 6 J·cm⁻² reduziu os esporos de *A. flavus* em 1-log e com 12 J·cm⁻² em 5-log.

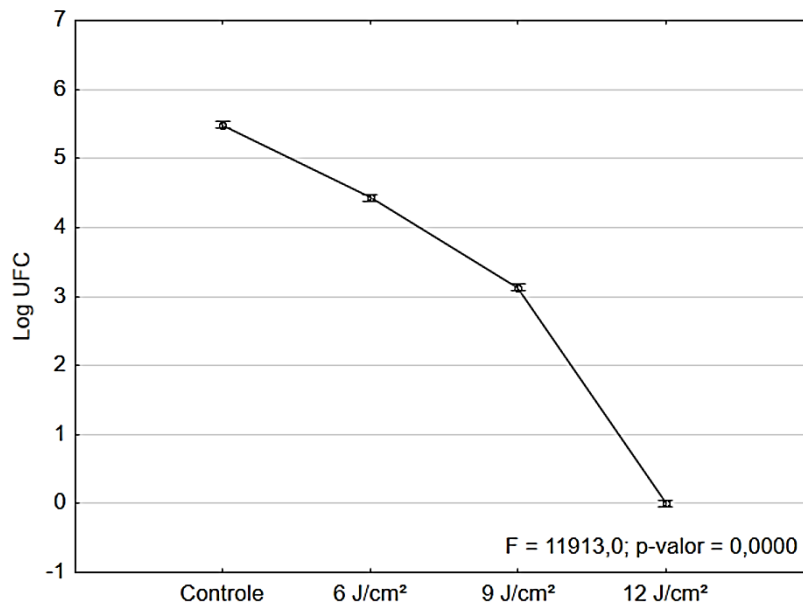


Figura 1. Média e intervalo de confiança para redução de *Aspergillus flavus* nos diferentes tratamentos UV-p.

No trabalho de Gomez-Lopez et al. (2005), Utilizando UV-p em placas com ágar contendo *A. flavus* obteve-se uma redução de 1-log a distância de 8 cm e 3-log a distância de 4 cm, quando aplicado 50 pulsos e cada pulso 7J.

A inativação microbiana por exposição a UV-p é atribuída ao efeito do espectro amplo de UV e da densidade de energia aplicada com o tratamento, que por sua vez se relaciona com o comprimento do pulso e a alta potência de pico do pulso. A composição do espectro emitido da fonte UV-p afeta significativamente a eficácia do tratamento (Marquenie et al., 2003a, b). A exposição aos comprimentos de onda UV entre 100 e 280 nm (UV-Continua) tem sido usada em uma ampla gama de aplicações antimicrobianas, incluindo desinfecção de água, ar, superfícies e alimentos (Bintsis et al., 2000; Wright et al., 2000; Koutchma et al., 2004).

No tratamento com PFBP no tempo de 10 min. de aplicação e no tempo de 20 min. Ocorreu redução de 1-log. Já nos tempos de 30min. e 40 min. Houve uma redução de 4-log.

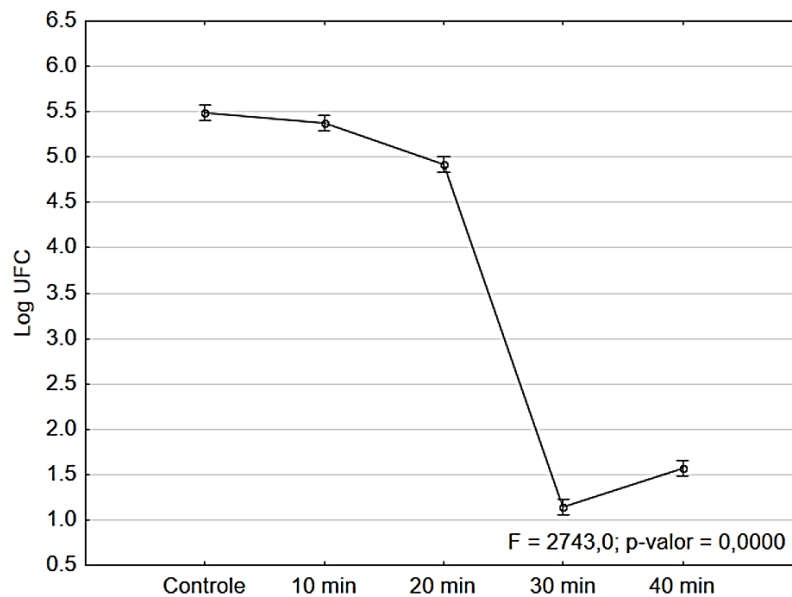


Figura 2. Média e intervalo de confiança para redução de *Aspergillus flavus* nos diferentes tratamentos PFBP.

Suhem et al. (2013), não observaram germinação de *A. flavus* no meio depois de um tratamento de plasma em 40 W durante 25 min. No entanto, a potência plasmática e o tempo de exposição reduzidos resultaram em um aumento do crescimento de *A. flavus* em aproximadamente 1 a 2 log₁₀ ufc / ml em relação ao controle (sem tratamento com plasma).

As espécies antimicrobianas produzidas durante o tratamento com plasma dependem de qual gás é aplicado no sistema. Outros fatores que interferem nas taxas de inativação são a potência e o tipo de equipamento (Marsili et al., 2002). Durante o tratamento com plasma são geradas espécies químicas altamente reativas, íons e radiações UV, e estes têm capacidade de inativar microrganismos através de diferentes mecanismos (Laroussi et al, 2003;. Moisan et al., 2001). Boxhammer et al. (2012) relataram que o plasma frio utilizando o ar é a fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e a interação de ambas as espécies resulta em maior eficiência de inativação. O grau de sobrevivência de um esporo no ambiente hostil do plasma de ar é diretamente dependente da integridade de seu revestimento protetor. Devido ao seu baixo teor de água, os esporos podem resistir a temperaturas elevadas de forma eficaz. No entanto, no plasma de ar, os radicais de oxigênio oferecem um ambiente oxidativo, onde as

proteínas do revestimento de esporos podem ser desnaturadas, e o esporo fica vulnerável ao ataque dos radicais gerados pelo plasma. Outro mecanismo é o acúmulo de partículas carregadas na superfície dos esporos e o bombardeio contínuo de radicais na superfície do esporo que causa a ruptura da parede celular (Gaunt, Beggs e Georghiou, 2006).

Um mecanismo importante de desinfecção, onde o rompimento das paredes celulares ou das membranas celulares dos microrganismos, foi observado após o tratamento com plasma foi confirmado por Yang et al. (2009). No experimento de Suhem et al. (2013), a estrutura de *A. flavus* foi danificada pelo plasma atmosférico frio, onde os conidióforos e a vesícula foram quebrados, demonstrando a eficácia da inativação de *A. flavus* por um jato de plasma atmosférico frio.

Os resultados deste estudo indicaram que em solução a eliminação fúngica completa pela UV-p aconteceu quando foi aplicado $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, e para o PFBP ocorreu uma redução de 4-log após 30 min de tratamento, permanecendo essa redução de 4-log após 40 min.

Na Figura 3 estão apresentados os resultados da redução na contagem de *A. flavus* em castanhas do Pará inoculadas com esporos de *A. flavus* e tratadas com UV-p e PFBP. Como podem ser observadas as castanhas de Pará contaminadas e tratadas com PFBP e UV-p apresentaram redução de 4-logs.

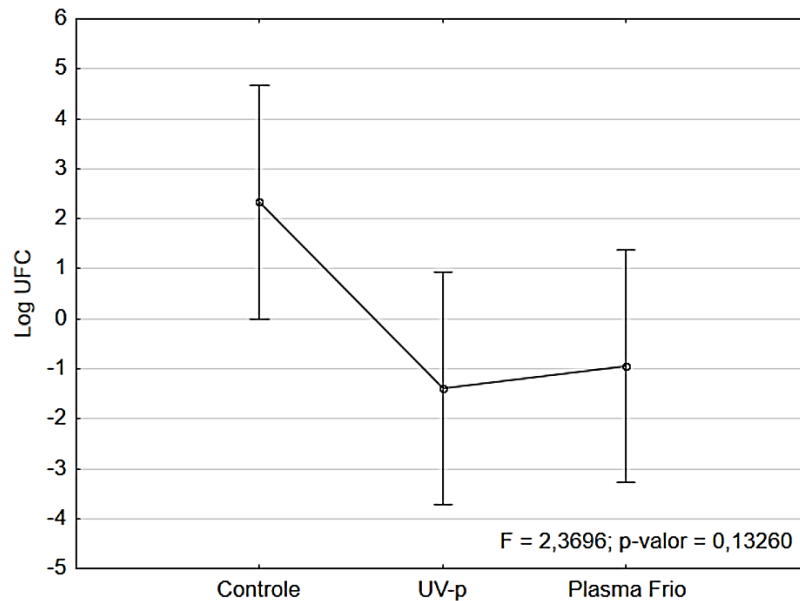


Figura 3. Média e intervalo de confiança para redução de *Aspergillus flavus* em castanhas do Pará nos diferentes tratamentos.

Um tratamento UV-p foi aplicado para inativar esporos de *A. niger* em farinha de milho obtendo-se uma redução de 4-log nas condições de voltagem de 3800 V, distância de 3 cm, $5,6\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ por pulso e tempo de 100 s (Jun et al., 2003). O impacto da UV-p na redução de conídios de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus flavus* em grãos de cevada foi estudado por Zenklusen et al. (2018). A redução máxima na população fúngica foi de 1,2–1,7 ciclos log para pulsos de luz intensos até $18,0\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

A diferença entre o presente trabalho e os demais, tem relação com o equipamento utilizado, à fluência, o tempo, a distância utilizada na aplicação do tratamento e a cepa de *A. flavus* utilizada, devido a diferenças de fenótipos e genótipos. No caso do tratamento de alimentos, a eficiência depende fortemente das propriedades específicas dos alimentos, condições de tratamento e equipamentos utilizados (Oms-Oliu et al., 2010; Rowan et al., 2015). A eficiência dos tratamentos de inativação da UV-p depende da fluência aplicada, que pode ser controlada pela intensidade de descarga aplicada, a distância entre a amostra e a lâmpada de flash, bem como o número de lâmpadas (Kramer et al., 2017).

Assim como em outros trabalhos utilizando UV-p, um dos problemas que ocorrem é o sombreamento, pois a tecnologia de UV-p é superficial, e por isso quanto mais regular a superfície melhor o resultado. Os conídios inoculados podem não ter sido submetidos a um tratamento homogêneo, porque nem todos os lados das castanhas foram expostos à radiação; além disso, os microrganismos podem não ter sido distribuídos uniformemente na superfície do grão e os fungos poderiam ter sido internalizados nas castanhas, ou poderiam estar presentes em irregularidades ou lesões na superfície das castanhas, impedindo o contato entre eles e a radiação (Zenklusen et al., 2018; Alzamora et al., 2016; Gómez-López et al., 2007).

Na Figura 4 estão apresentados os resultados da redução na contagem de *A. flavus* em castanhas do Caju inoculadas com esporos de *A. flavus* e tratadas com UV-p e PFBP. As castanhas de caju contaminadas e tratadas com PFBP e UV-p apresentaram redução 3 e 4 log, respectivamente.

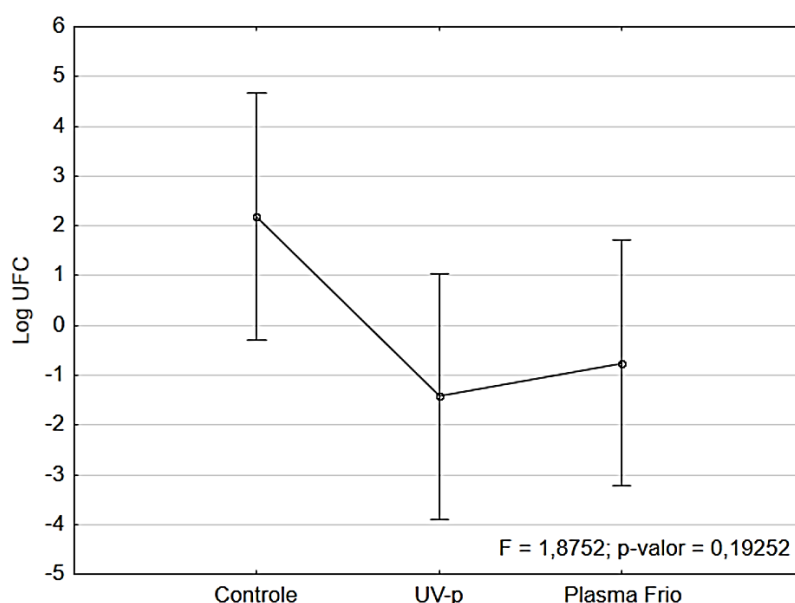


Figura 4. Média e intervalo de confiança para redução de *Aspergillus flavus* em castanhas de Caju nos diferentes tratamentos.

Basaran et al. (2008), trabalharam com plasma frio a baixa pressão, utilizando gases de ar e hexafluoreto de enxofre (SF6), a potência total aplicada foi de 300 W. O tratamento com plasma de gases de ar por 5 min

resultou em uma redução de 1 log de *A. parasiticus* e mais 5 min de tratamento resultaram em redução adicional de 1 log. A aplicação de plasma SF6 foi mais efetiva, resultando em aproximadamente uma diminuição de 5 log na população fúngica para a mesma duração. Diferentes resultados foram obtidos em amendoim e pistache, em comparação com avelãs. A duração total do tratamento de 5 min de plasma SF6 permitiu reduções microbianas da ordem de 3 a 6 logs de UFC·g⁻¹, dependendo da amostra.

No estudo de Devi et al. (2017), foi encontrado resultados melhores devido condições de trabalho diferentes. Houve 97,9% e 99,3% de redução no crescimento de *A. parasiticus* e *A. flavus*, respectivamente, quando tratados em potências de 60 W. Foi observado desintegração completa da membrana de esporos fúngicos devido à eletroporação e à corrosão causada pelas espécies reativas do plasma.

Os resultados obtidos no estudo da aplicação do PFBP na redução de espécies de *Aspergillus* foram diferentes de outros trabalhos que também aplicam essa técnica. A diferença entre os resultados ocorre devido aos diferentes gases utilizados, o equipamento e a potência.

CONCLUSÕES

Nas soluções de esporos de *A. flavus* tratadas com UV-p ocorreu diminuição de crescimento do fungo em meio BDA e a solução de esporos tratada com plasma houve redução de 4 ciclos no crescimento em meio BDA. *A. flavus* inoculados em castanhas de caju e castanhas do Pará que foram tratadas com PFBP apresentaram redução de 3 e 4 ciclos log respectivamente e quando tratadas com UV-p a redução foi de 4 ciclos log para ambas as castanhas. Considerando os resultados obtidos, as técnicas utilizadas podem ser uma alternativa para substituir o processo térmico para eliminar a contaminação fúngica. No caso do PFBP os resultados tecnologia dependem principalmente do tipo de gás de alimentação e aparelho de plasma usado. E na UV-p a fluência, número de pulsos, distância da amostra em relação a lâmpada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZAMORA, S. M.; GUERRERO, S. N.; RAFFELLINI, S.; FERRARIO, M.; SCHENK, M. Hurdle technology in fruit processing. In S. Pareek (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables: Technology, physiology, and safety* (pp. 101–138). Boca Raton, FL: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2016.

BASARAN, P.; BASARAN-AGUL, N.; OKSUZ, L. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. **Food Microbiology**, v. 25, p. 626–632, 2008.

BERARDINELLI, A.; PASQUALIA, F.; CEVOLI, C.; TREVISANI, M.; RAGNI, L.; MANCUSI, R.; MANFRED, G. Sanitisation of fresh-cut celery and radicchio by gas plasma treatments in water medium. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 297–304, 2016.

BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. K. Existing and potential application of ultraviolet light in the food industry: a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 637-645, 2000.

BOXHAMMER, V.; MORFILL, G. E.; JOKIPII, J. R.; SHIMIZU, T.; KLÄMPFL, T.; LI, Y. F.; KÖRITZER, J.; SCHLEGEL, J.; ZIMMERMANN, J. L. Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution. **New Journal of Physics**, v. 14, n. 11, p.113042, 2012.

Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme. Rome: FAO/WHO, 122, 2011.

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**, v. 77, p. 187-191, 2017.

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**, v. 77, p.187-191, 2017.

EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. Toxicology of Aflatoxins. Academic Press., 1994.

ELLIS, W. O.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K.; OLDHAM, J. H.; SCOTT, P. M. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 30, n.4, p. 403-439, 1991.

FERRARIO, M.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S.M. Study of pulsed light-induced damage on *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1001-1011, 2013.

GAUNT, L. F.; BEGGS, C. B.; GEORGHIOU, G. E. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A review. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 34, n. 4, p. 1257-1269, 2006.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M.; DEVLIEGHIERE, F.; BONDUELLE, V.; DEBEVERE, J. Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 460– 470, 2005.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M.; RAGAERT, P.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHIERE, F. Pulsed light for food decontamination: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, n. 9, p. 464–473, 2007.

JIAFENG, J.; XIN, H.; LING, L.; JIANGANG, L.; HANLIANG, S.; QILAI, X.; RENHONG, Y.; YUANHUA, D. Efiect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. **Plasma Science and Technology**, v.16, n.1, p. 54-58, 2014.

JUN, S.; IRUDAYARAJ, J.; DEMIRCI, A.; GEISER, D. Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 883–888, 2003.

KENDRA, D.F.; DYER, R.B. Opportunities for biotechnology and policy regarding mycotoxin issues in international trade. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 147–151, 2007.

KOUTCHMA, T.; KELLER, S.; CHIRTEL, S.; PARISI, B. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 2, p.179–189, 2004.

KRAMER, B.; WUNDERLICH, J.; MURANYI, P. Impact of treatment parameters on pulsed light inactivation of microorganisms on a food simulant surface. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 42, p. 83–90, 2017.

KRISHNAMURTHY, K.; TEWARI, J.; IRUDAYARAJ, J.; DEMIRCI, A. Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV light and infrared heating. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 93-104, 2010.

LAROUSI, M.; MENDIS, D. A.; ROSENBERG, M. Plasma interaction with microbes. **New Journal of Physics**, v. 5, n. 1, p. 41, 2003.

MARQUENIE, D., GEERAERD, A. H., LAMMERTYN, J., SOONTJENS, C., VAN IMPE, J. F., MICHIELS, C. W.; NICOLAÏ, B. N. Combinations of pulsed white light and UV-C or mild heat treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia fructigena*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p.185-196, 2003.

MARQUENIE, D.; MICHIELS, C. W.; VAN IMPE, J. F.; SCHREVEN, E.; NICOLAÏ, B. N. Pulsed white light in combination with UV-C and heat to reduce storage rot of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 28, p. 455-461, 2003.

MARSILI, L.; ESPIE, S.; ANDERSON, J.G.; MACGREGOR, S.J. Plasma inactivation of food-related microorganisms in liquids. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 65, p. 507–513, 2002.

MISRA, N.N.; JO, C. Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 64, p. 74-86, 2017.

MOISAN, M., BARBEAU, J., CREVIER, M.C., PELLETIER, J., PHILIP, N., SAOUDI, B. Plasma sterilization: methods and mechanisms. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p. 349–358, 2002.

NIERMAN, W. C.; YU, J.; FEDOROVA-ABRAMS, N. D.; LOSADA, L.; CLEVELAND, T. E.; BHATNAGAR, D.; BENNETT, J. W.; DEAN, R.; PAYNE, G. A. Genome Sequence of *Aspergillus flavus* NRRL 3357, a Strain That Causes Aflatoxin Contamination of Food and Feed. **Genome Announcements**, v.3, n.2, p. 1-8, 2015.

OMS-OLIU, G.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Pulsed light treatments for food preservation. A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p.13-23, 2010.

OMS-OLIU, G.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Pulsed light treatments for food preservation. A review. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.1, p. 13–23, 2010.

PANKAJ, S.K; MISRA, N.N.; CULLEN ,P.J. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 153–157, 2013.

ROWAN, N. J.; VALDRAMIDIS, V. P.; GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. A review of quantitative methods to describe efficacy of pulsed light generated inactivation data that embraces the occurrence of viable but non culturable state microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 44, n.1, p. 79–92, 2015.

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.

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**, v. 161, p. 107–111, 2013.

THIRUMDAS, R.; SARANGAPANI, C.; ANNAPURE, U. S. Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. **Food Biophysics**, v.10, n.1, p. 1- 11, 2015.

WEKHOF, A. Desinfection with flash lamps. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 54, p. 264-275, 2000.

WILLIAMS, J.H.; PHILLIPS, T.D.; JOLLY, P.E.; STILES, J.K.; JOLLY, C.M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1106–1122, 2004.

WRIGHT, J. R.; SUMNER, S. S.; HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D.; ZOECKLEIN, B. W. Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider. **Journal of Food Protection**, v.63, n.5, p.563–567, 2000.

YANG, L.; CHEN, J.; GAO, J. Low temperature argon plasma sterilization effect on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanisms. **Journal of Electrostatics**, v. 67, p. 646–651, 2009.

ZENKLUSEN, M. H.; CORONEL, M. B.; CASTRO, M. Á.; ALZAMORA, S. M.; GONZÁLEZ, H. H. L. Inactivation of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus flavus* in malting barley by pulsed light and impact on germination capacity and microstructure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 45, p. 161–168, 2018.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA PULSADA E PLASMA FRIO A BAIXA PRESSÃO NA AFLATOXINA B1

RESUMO

A luz ultravioleta pulsada (UV-p) e o plasma frio a baixa pressão (PFBP) são novas tecnologias com potencial para degradar e desintoxicar alimentos contaminados por aflatoxinas. Um estudo de degradação da Aflatoxina B1 (AFB1) em solução aquosa foi realizado utilizando UV-p e PFBP em diferentes concentrações iniciais de AFB1. Na concentração inicial de $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AFB1 tratamento UV-p reduziu 95% a AFB1; enquanto para o PFBP a redução foi de 84 % para concentração inicial de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A degradação de AFB1 mostrou seguir uma cinética de reação de primeira ordem ($R^2 \geq 0,95$). Após o tratamento com UV-p foram formados 4 compostos e para o PFBP 2 compostos que foram identificados, com base em baixo erro de massa e alta propriedade de correspondência por cromatografia líquida de ultra-desempenho - espectrometria de massa acoplado ao sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (UPLC-Q-TOF MS). Como os tratamentos resultaram na degradação da AFB1 in situ, a toxicidade dos subprodutos residuais de AFB1 após os tratamentos foram avaliados. A toxicidade foi estimada utilizando o teste de letalidade de artêmia (*Artemia salina*). A toxicidade da AFB1 foi significativamente diminuída. Os resultados obtidos sugerem que as tecnologias tem um potencial promissor para degradar, desintoxicar e inativar a AFB1.

Palavras-chave: Cinética de degradação, UPLC-QTOF e Artemia Salina.

ABSTRACT

Pulsed ultraviolet light (UV-p) and cold plasma at low pressure (PFBP) are new technologies with the potential to degrade and detoxify food

contaminated by aflatoxins. A degradation study of Aflatoxin B1 (AFB1) in aqueous solution was performed using UV-p and PFBP at different initial concentrations of AFB1. At the initial concentration of $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of AFB1 UV-p treatment reduced 95% to AFB1; while for PFBP the reduction was 84% at the initial concentration of $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The degradation of AFB1 showed a first order reaction kinetics ($R^2 \geq 0.95$). After treatment with UV-p 4 compounds were formed and for the PFBP 2 compounds were identified, based on low mass error and high correspondence property by ultra-performance liquid chromatography - mass spectrometry coupled to the Quadruple / Flight Time (UPLC-Q-TOF MS). As the treatments resulted in the degradation of AFB1 in situ, the toxicity of residual AFB1 by-products after the treatments were evaluated. Toxicity was estimated using the artemia saline lethality test. The toxicity of AFB1 was significantly decreased. The results obtained suggest that the technologies have a promising potential to degrade, detoxify and inactivate AFB1.

Key words: Degradation kinetics, UPLC-QTOF and Artemia salina.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são micotoxinas, bisfuranocumarinas derivadas de um decacetídeo. São metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (A.), principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* e eventualmente por *A. nomius*. Estes fungos crescem rapidamente sob condições favoráveis de temperatura e de umidade nos grãos, sementes e uma grande variedade de outros alimentos (Hayes et al., 1984; Oliveira e Germano, 1997, Frisvad et al., 2007). São 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B1, B2, G1 e G2 (Organización Panamericana de la Salud, 1983). O *A. flavus* produz apenas aflatoxinas do grupo B, enquanto as outras duas espécies produzem aflatoxinas dos grupos B e G (Creppy, 2002; Baptista et al., 2002).

A aflatoxina B1 é considerada a mais tóxica e com maior poder carcinogênico dentre as micotoxinas (Iarc, 2002; Pereira E Santos, 2011), além de ser também a mais frequentemente encontrada em alimentos.

Vários tratamentos químicos, físicos e biológicos têm sido estudados para degradar aflatoxinas e eliminar a viabilidade dos fungos, mas todos têm limitações significativas devido à falta de adequação para uso em alimentos sólidos, degradação incompleta, retenção de toxicidade residual, alteração química de nutrientes no substrato alimentar, ou a criação de subprodutos residuais indesejáveis (Samarajeewa et al., 1990; Wang et al., 2016).

Luz ultravioleta pulsada (UV-p) é uma tecnologia não térmica que utiliza pulsos de luz de alta potência e curta duração (1 μ s - 0,1 s) e um amplo espectro de luz policromática de UV para infravermelho próximo (100-1100 nm), emitida por lâmpadas de flash de gás inerte (Oms-Oliu, Martín-Belloso e Soliva-Fortuny, 2010). Essa tecnologia, conhecida desde os anos 1980, foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1996. A utilização de UV-p é uma alternativa ao tratamento com luz ultravioleta contínua, por ser rápido e com ausência de compostos residuais e químicos (Oms-Oliu et al., 2009).

Plasma é o quarto estado da matéria, que é um gás ionizado contendo átomos ou moléculas em um estado metaestável com uma carga elétrica líquida zero (Misra et al., 2016; Devi et al., 2017). As espécies oxidativas produzidas durante a descarga (reativas de oxigênio e as espécies de nitrogênio) podem causar a peroxidação de lipídios e a oxidação de proteínas e de DNA (Montie et al., 2000). As espécies químicas reativas geradas a partir do nitrogênio no ar têm a capacidade de inativar microrganismos. A geração dessas espécies depende dos parâmetros críticos de controle, tais como a pressão de gás, composição, temperatura, teor de umidade e propriedades de excitação do plasma (Arjunan e Clyne, 2011; Ehlbeck et al. 2011.; Misra et al. 2011, Du et al 2012).

Considerando as vantagens das tecnologias de UV-p e PFBP, o objetivo deste trabalho foi comparar e avaliar a eficiência das duas tecnologias estudando níveis de energia diferentes e tempos diferentes por meio da cinética de degradação e a toxicidade da Aflatoxina B1 após aplicado os tratamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamento por UV-p

Para os tratamentos de luz UV-p, foi utilizada uma câmara UV-p (SteriBeam, modelo XeMaticA-2LXL) com duas lâmpadas de xénon posicionadas lateralmente, com capacidade para um pulso a cada 15 segundos e energia de $0,3\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}\text{ pulso}^{-1}$ (para pulsos com 100% de potência das lâmpadas). Foram utilizadas as fluências de 6, 9 e $12\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Tratamento por PFBP

Os tratamentos de plasma a frio foram realizados utilizando um sistema de plasma de mesa PE-100 (Plasma Etch, EUA). O plasma foi gerado em Ar sintético e nitrogênio (grau FID 4.5, pureza 99,95%, White Martins, Brasil) aplicando um campo elétrico de 80 kHz através do eletrodo. O processo foi realizado no modo plasma indireto, o que significa que o plasma foi gerado e depois alimentado na câmara de processamento, que continha a amostra. Usou-se o fluxo de $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de gás para formação do plasma, e os tratamentos foram realizados nos tempos de 10, 20 e 30 min sob condições de vácuo (30 kPa).

Cinética de degradação da Aflatoxina B1 por UV-p e PFBP

Para experiências de degradação utilizando UV-p, as soluções aquosas de AFB1 em três concentrações diferentes ($0,2$; 2 e $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), foram irradiadas com lâmpadas Xenon em fluências diferentes (0 , 6 , 9 e $12\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Utilizando PFBP, as soluções aquosas de AFB1 em três concentrações diferentes ($0,2$; 2 e $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), foram expostas ao plasma gerado utilizando ar sintético em fluxos de $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em três diferentes tempos (10, 20 e 30 min).

Após aplicado os tratamentos as amostras foram coletadas e analisadas quantitativamente diretamente pelo UPLC-Q-DA para a quantidade de compostos de interesse restante na solução.

A constante de velocidade de reação (k) e meia-vida ($t_{1/2}$) foram determinados conforme o modelo da cinética adequado para quantificação da aflatoxinas após os tratamentos serem aplicados. Para calcular a constante de velocidade de reação utilizou-se a equação 1 e o meia-vida equação 2.

$$C = C_0 \times \exp(-k \times t) \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (2)$$

Quantificação AFB1

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Uv-Vis. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis, água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando nas condições: inicial 2% B, 80% B (9 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 µl.

Análise cromatográfica dos produtos de degradação da Aflatoxina B1

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 µl.

Condições do Massas de Alta resolução - XEVO-QToF

O modo ESI⁻ foi usado na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L·h⁻¹, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

Toxicidade por meio do bioensaio com *Artemia salina*

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados em solução salina 3%, em temperatura ambiente (25 °C), com aeração por 24 horas para a eclosão dos ovos.

Para avaliação da toxicidade da Aflatoxina B1, foram preparadas concentrações distintas AFB1, 0,01; 0,03; 0,3; 1; 2; 4; 10 a 30,0 µg·mL⁻¹. De cada concentração foi retirada uma alíquota de 30 mL e em seguida adicionada 10 larvas de *Artemia salina*. Após 24 horas, verificou-se quantas larvas permaneciam vivas. A porcentagem de mortalidade foi relativamente ajustada à porcentagem de controle da mortalidade, seguindo a fórmula de Abbot (Huber, 1984):

$$P = \frac{P_i - C}{1 - C} \quad (3)$$

onde P_i é a resposta dose não-zero observada e C é a mortalidade do controle.

No experimento, o teste outlier foi realizado em dados, usando o método Dixon. Os valores duvidosos da mortalidade foram eliminados e os valores válidos foram utilizados para o cálculo da média, que é a média da mortalidade corrigida, definida como o eixo y . Os logaritmos das concentrações correspondentes foram definidos como eixo x . Nos parâmetros da curva dose-resposta (DRC) de AFB1, aplicou-se a regressão não linear (GraphPad Prism versão 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) utilizando o modelo Dse-Resp:

$$E = A1 + \left(\frac{A2 - A1}{1 + 10 \exp(\log x - C) p} \right) \quad (4)$$

A expressão da função inversa é:

$$C = \frac{\log(E - A1) - \log(A2 - E)}{p - \log x} \quad (5)$$

Em que $A1$, $A2$ são linhas assintóticas inferiores e superiores da DRC; $\log x$ é a ordenada do ponto médio da DRC; e p é o gradiente do ponto médio da DRC.

A toxicidade de AFB1 foi avaliada pela mortalidade das Artemias salinas registrada a cada 12 h até atingir 50% de sobrevivência (tempo letal de 50%, LD50).

Análise Estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 5 repetições. A análise de variância foi calculada e a significância do teste F foi avaliada ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram comparadas pelo intervalo de confiança e as diferenças apresentadas graficamente. Quando necessário foi realizada análise de regressão. Para os cálculos estatísticos foi o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Degradação de AFB1 em várias concentrações iniciais e cinéticas

As porcentagens de AFB1 nas três concentrações diminuíram com o tempo de exposição a UV-p, e a taxa de degradação após aplicar $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ atingiu 87,25%; 92,18% e 94,47% para as concentrações de 0,2; 2 e $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AFB1 respectivamente. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na porcentagem residual entre as 3 concentrações, implicando que a quantidade inicial de AFB1 no regime selecionado não teve efeito sobre a degradação de AFB1. Wang et al. (2018), encontrou redução de $96,6 \% \pm 4,8\%$ de AFB1 após 12 segundos utilizando intensidade de $2,86 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ por segundo, valor este próximo ao encontrado no presente trabalho. E Moreau et al. (2011), observou redução de 92,7% de AFB1 aplicando $8 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Moreau et al. (2011) relataram que as regiões visível e infravermelha do UV-p não contribuíram para os processos fotoquímicos responsáveis pela destruição de micotoxinas. Assim, o espectro de comprimento de onda UV e intensidade luminosa da UV-p são os principais fatores responsáveis pela degradação de aflatoxinas.

O efeito das concentrações iniciais de AFB1 por UV-p está apresentado na Figura 1. A concentração inicial de AFB1 foi de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e

5,0 mg·L⁻¹, respectivamente. Os declínios observados na curva de degradação decorrem do processo de degradação causado pela UV-p.

Pode-se observar que não houve diferença significativa de três taxas de fotodegradação de AFB1 em cada intervalo de tempo nas três curvas de degradação ($p > 0,05$), indicando que não há efeito da concentração inicial na faixa selecionada na fotodegradação do AFB1, que está de acordo com a característica do modelo de cinética de primeira ordem (Liu e Lu, 2008; Liu et al., 2011).

Portanto, observa-se que a cinética da degradação de AFB1 no UV-p foi melhor descrita com modelo cinético dinâmico de primeira ordem. A variação da concentração de AFB1 com o tempo de irradiação pode ser observado na Figura 2, e os parâmetros obtidos são mostrados na Tabela 1. A relação linear entre $\ln(C_t/C_0)$ e tempo indicaram que a degradação de AFB1 seguiu cinética de primeira ordem. Na Tabela 1 mostra observa-se o valor de R^2 de 0,98 para o modelo cinético de reação de primeira ordem. Ao comparar o R^2 , o erro quadrático médio, pode-se concluir que o modelo cinético de reação de primeira ordem apresentou um bom ajuste para descrever a degradação de AFB1. Sendo assim, a concentração inicial não esta relacionada com k , que é uma característica da cinética de reação de primeira ordem. Liu et al. (2010), encontrou para AFB1 um modelo cinético de primeira ordem e Wang et al. (2018), encontrou para AFB1 um modelo de segunda ordem justificando a complexidade da toxina e o uso de material sólido no experimento.

O tempo de meia-vida $t_{1/2}$ da AFB1, o tempo necessária para que sua concentração decaia para metade de seu valor inicial, é a constante de velocidade pela equação: $t_{1/2} = \ln 2 / k$. isto pode ser observado na Tabela 1 que os valores de k e $t_{1/2}$ são quase o mesmo para diferentes concentrações iniciais de AFB1 e que ambos não tem ligação com a concentração inicial de AFB1 (Liu et al., 2010).

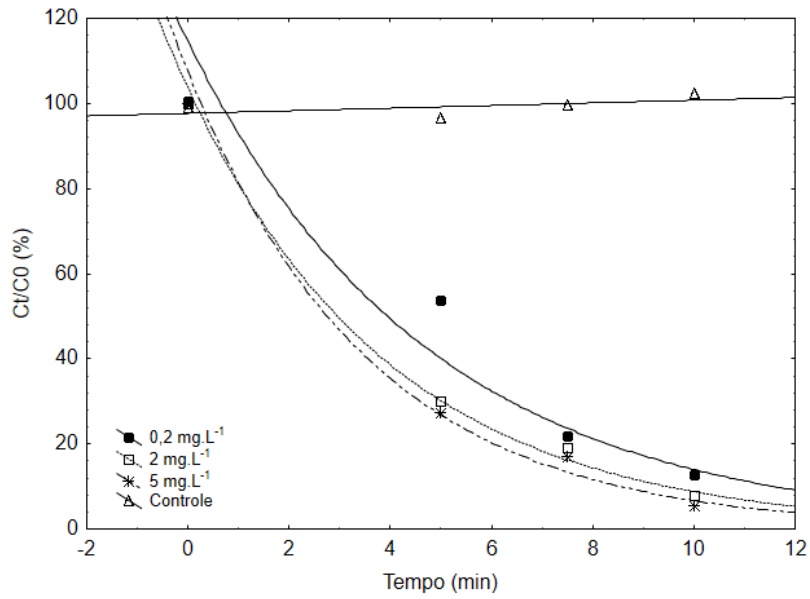


Figura 1 - Curva de degradação da AFB1 em solução em várias concentrações iniciais usando UV-p.

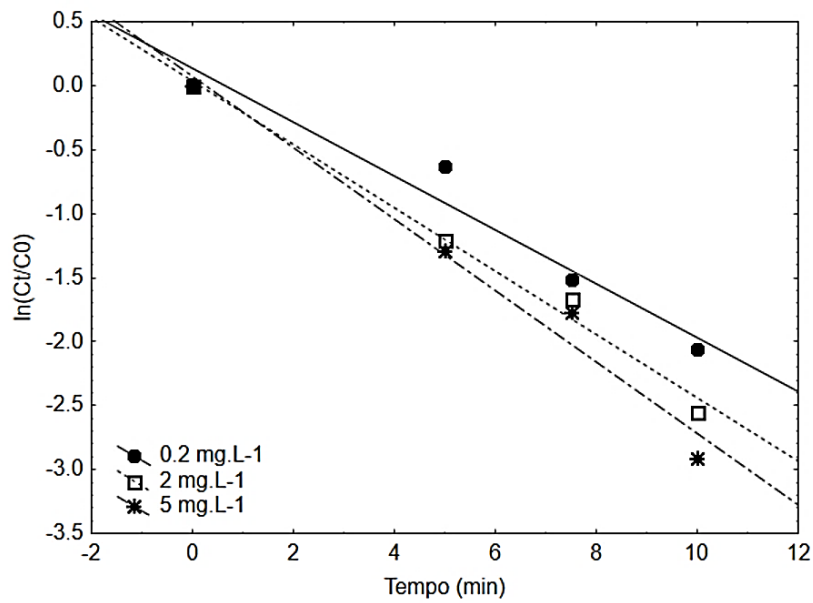


Figura 2 – Cinética de degradação da AFB1 em várias concentrações iniciais usando UV-p.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos de AFB1 em diferentes concentrações iniciais usando UV-p

Concentrações iniciais	Equação	R ²	K (min ⁻¹)	T _{1/2} (min)
0,2 mg·L ⁻¹	Ln(C ₀ /C _t) = -0,19392*t	0,98041	-0,19392	3,57
2 mg·L ⁻¹	Ln(C ₀ /C _t) = -0,24270*t	0,99614	-0,24270	2,86
5 mg·L ⁻¹	Ln(C ₀ /C _t) = -0,26957*t	0,99179	-0,26957	2,57

De acordo com a Figura 1, pode-se observar que nenhuma alteração no conteúdo de AFB1 no controle foi registrada, durante todo o período experimental. As porcentagens de AFB1 nas três concentrações diminuíram acentuadamente juntamente com o tempo de exposição ao plasma, e a taxa de degradação após 30 minutos de tratamento atingiu 77,86%; 84,04% e 83,03% para as concentrações de 0,2; 2 e 5 mg·L⁻¹ respectivamente.

Wang et al.(2015), conseguiram redução de 88,3 % de AFB1 usando plasma de baixa temperatura por frequência de rádio. Basaran et al. (2008), obtiveram redução de 88,96% na AFB1 usando plasma frio a baixa pressão (15 Pa). Estes resultados estão de acordo com os do presente trabalho, sendo mais elevados devido a diferença nos equipamentos e voltagem empregada, pois quanto maior a intensidade de voltagem maior a degradação (Shi et al., 2017).

O efeito da concentração inicial na degradação de AFB1 por Plasma frio é apresentada na Figura 3. As concentrações iniciais AFB1 foram 0,2, 2,0 e 5,0 mg·L⁻¹, e não houve detecção de alterações apresentadas em experiências em branco com diferentes concentrações (resultados exemplificados por um referente a uma concentração inicial de 2 mg·L⁻¹ mostrados na Fig. 3). Portanto, os declínios observados na curva de degradação surgem do processo de degradação. Pode-se observar que não há diferença significativa nas três curvas de degradação, indicando que o efeito da concentração inicial é pequena, o que está de acordo com a característica do modelo de cinética de primeira ordem.

Para explorar o comportamento de degradação de AFB1 por plasma frio, a cinética de degradação foi estudada. O comportamento da degradação

cinética com o tempo de exposição em função da quantidade inicial de AFB1 é mostrado na Figura 4 e os parâmetros estudados estão listados na Tabela 2. A relação linear entre $\ln (C_t/C_0)$ e o tempo de exposição indicou que a degradação seguiu uma reação de primeira ordem ($R^2 > 0,96$), dada pela equação $C_t = C_0 e^{-kt}$, em que C_0 e C_t foram a quantidade de AFB1 restante no tempo 0 e t, e k foi a constante de primeira ordem. O tempo de meia-vida $t_{1/2}$ da AFB1, foi calculada de acordo com a equação $t_{1/2} = 0,693/k$. Pode ser visto na Tabela 2 que os valores de k e $t_{1/2}$ foram praticamente os mesmos para diferentes quantidades iniciais de AFB1.

No trabalho de Shi et al. (2017) usando plasma frio atmosférico de alta voltagem (200 W e 50 Hz gerando 90 kV) explicaram a degradação da AFB1 com modelo de primeira ordem. Wang et al. (2015), encontraram um modelo de primeira ordem para a degradação de AFB1 usando plasma de baixa temperatura por frequência de rádio.

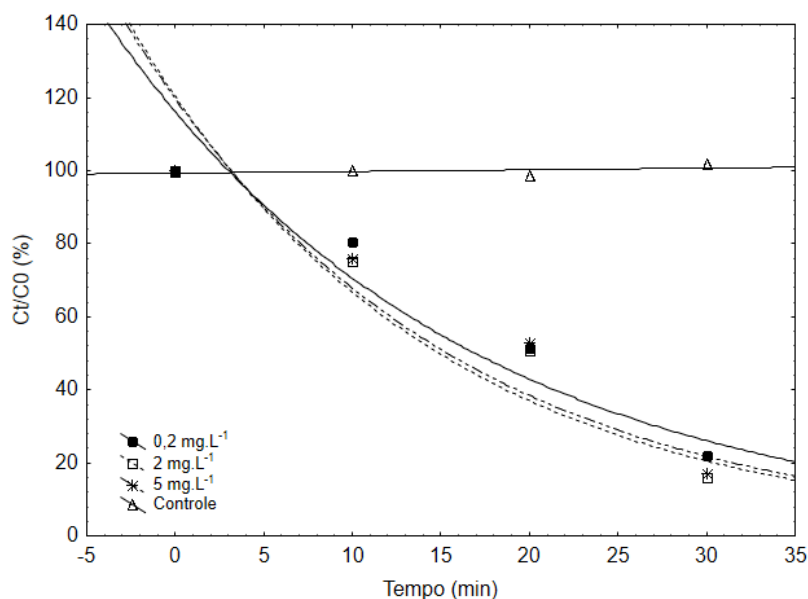


Figura 3 - Curva de degradação da AFB1 em várias concentrações iniciais usando PFBP.

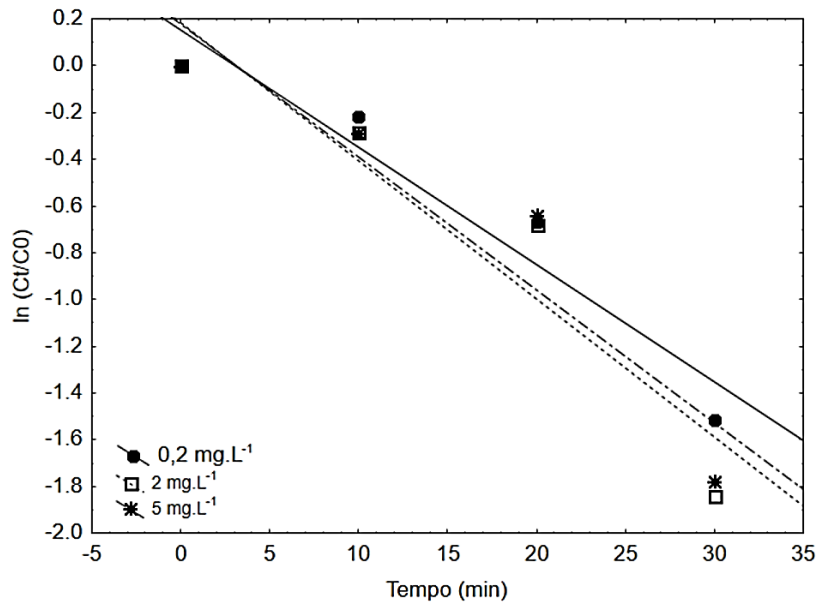


Figura 4– Cinética de degradação da AFB1 em várias concentrações iniciais usando PFBP.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de AFB1 em diferentes concentrações iniciais usando PFBP

Concentrações iniciais	Equação	R ²	K (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)
0,2 mg·L ⁻¹	Ln(C ₀ /C _t) = -0,04362*t	0,95266	-0,04362	15,89
2 mg·L ⁻¹	Ln(C ₀ /C _t) = -0,05113*t	0,93364	-0,05113	13,55
5 mg·L ⁻¹	Ln(C ₀ /C _t) = -0,04927*t	0,9311	-0,04927	14,07

Tanto no tratamento com o UV-p e com PFBP, o meio da reação influencia a taxa de reação. Cooper et al. (1989), relataram que em meio aquoso a luz ultravioleta poderia produzir partículas ativas, como elétrons hidratados, oxigênio de estado único, radical peróxi, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, que promoviam a degradação de organismos. No caso do Plasma os íons gerados pelo plasma interagem com as moléculas de água formando espécies reativas.

Formação dos produtos de degradação da AFB1

Produtos de degradação Aflatoxina B1 tratada com UV-p

É aparente na Figura 5 que AFB1 é degradado, levando à formação de novos compostos denotados 'A', 'B', 'C' e 'D', que não foram detectados no controle (Figura 6). Os espectros de absorção ultravioleta destes três compostos são semelhantes aos do AFB1. Assim, estes novos compostos foram considerados como produtos de degradação da AFB1.

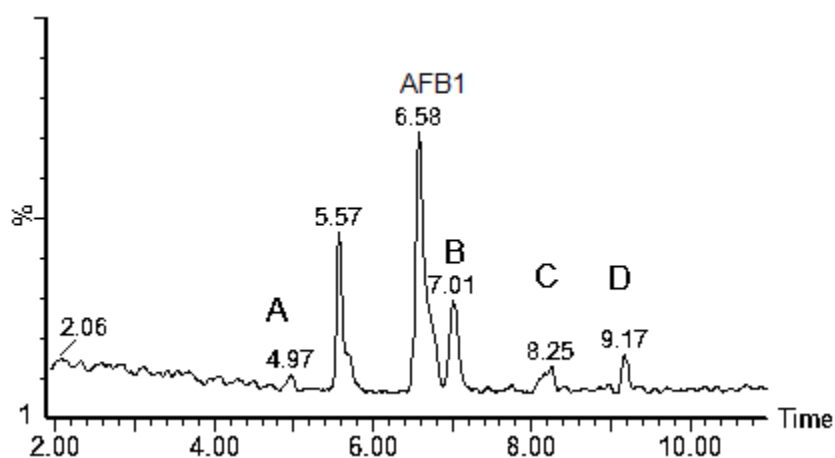


Figura 5: Cromatograma com produtos de degradação da AFB1 em solução após tratamento com UV-p.

Não havia padrões disponíveis com os quais combinar os tempos de retenção do detector de arranjo de diodos UPLC (DAD), de modo que os produtos de fotodegradação foram identificados por UPLC-Q-TOF MS. A análise de UPLC-MS sugeriu que A (massa molecular m/z 331,08), B (m/z 219,17), C (m/z 279,09) e D (m/z 237,11) foram os produtos da degradação de AFB1. Para o componente AFB1, $m/z = 313,07$ estava em boa concordância com a massa molecular do composto original (AFB1). Massas precisas, fórmulas moleculares, erro de massa (mDa e ppm), equivalentes de dupla ligação (DBE) e valor de i-FIT (normal) (a probabilidade de o padrão isotópico da composição elementar corresponder a um cluster de picos no espectro), de estas quatro moléculas protonadas, são mostradas na Tabela 3 usando a ferramenta de composição elementar incorporada no software MassLynx 4.1. As especificações do Synapt Q-TOF indicam um erro de massa

máximo de 10 ppm para o intervalo de massas discutido neste artigo. Neste trabalho, a massa exata e a fórmula molecular do íon parente foram usadas como outra massa para verificar a precisão do sistema Synapt Q-TOF. Como é aparente na Tabela 3, a massa experimental do íon parental (AFB1) dado pelo sistema Synapt Q-TOF é 313,0690, que é 2,2 mDa menor que a massa teórica, 313,0712, e a fórmula molecular proposta, C₁₇H₁₃O₆, é a mesma que a fórmula molecular teórica. Os erros de massa dos três produtos de degradação foram todos inferiores a 10 ppm e os seus valores i-FIT (Norm) foram todos 0, o que indicou pelo menos 95% de confiança na precisão da composição sugerida.

Pode-se deduzir que uma reação de fotoadição induzida por água pode ocorrer na ligação C (8) –C (9) que produz A a partir de AFB1. A ligação C (8) – C (9) e a ligação O (1) -C (14) são dois sítios ativos de AFB1 (Samarajeewa et al., 1990) e são fáceis de serem reduzidos para ligações saturadas mais estáveis na reação fotoquímica; assim, esses três produtos de fotorredução ou fotoadição, seriam mais estáveis do que o composto original. Esses princípios fotoquímicos foram usados aqui para propor a via de fotodegradação de AFB1 (Liu et al., 2010).

Os produtos de degradação deste estudo diferem dos produtos encontrados por Liu et al. (2016), usando irradiação. E apenas um produto (m/z 331) deste trabalho assemelhasse ao de Liu et al. (2010).

As fragmentações destes compostos precursores são mostradas como inserções na Figura 7. As massas precisas e fórmulas moleculares dos íons (Tabela 3) foram obtidas utilizando o software MassLynx 4.1.

Tabela 3: Fórmulas propostas para AFB1 e seus produtos de degradação da UV-p obtidos usando Q-TOF-MS

Composto	Massa observada (m/z)	Massa calculada (m/z)	Erro massa		DBE	Fórmula molecular	i-FIT	i-FIT (normal)
			mDa	ppm				
AFB1	313,0690	313,0712	-2,2	-7,0	11,5	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	166,5	0,0
A	331,0783	331,0818	-3,5	-10,6	10,5	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	159,7	0,0
B	219,1736	219,1749	-1,3	-5,9	4,5	C ₁₅ H ₂₃ O	118,7	0,0
C	279,0931	279,0927	0,4	1,4	-1,5	C ₇ H ₁₉ O ₁₁	65,3	0,0
D	237,1139	237,1127	1,2	5,1	5,5	C ₁₃ H ₁₇ O ₄	56,1	0,0

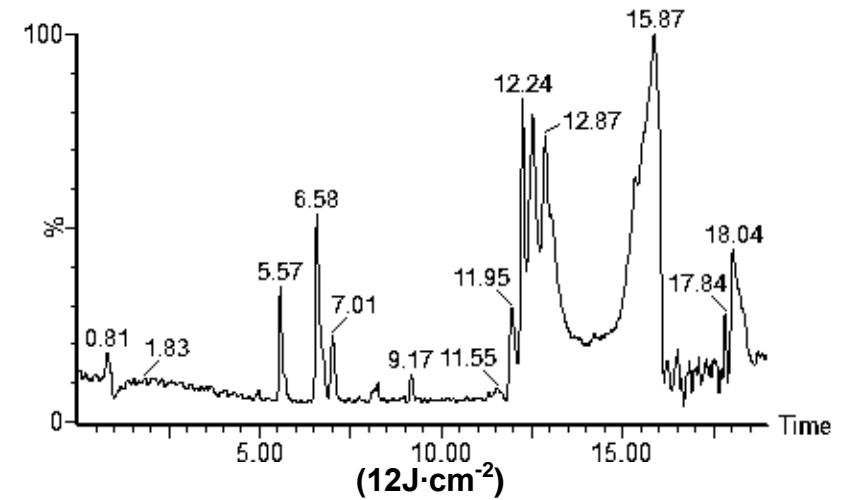
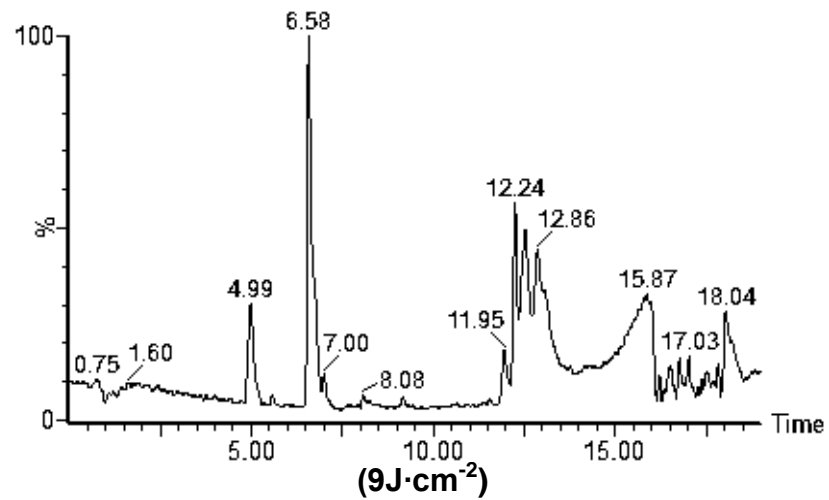
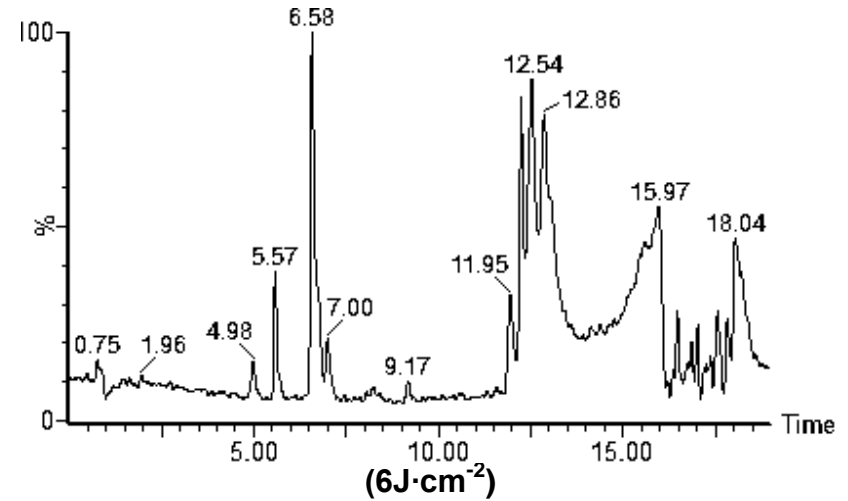
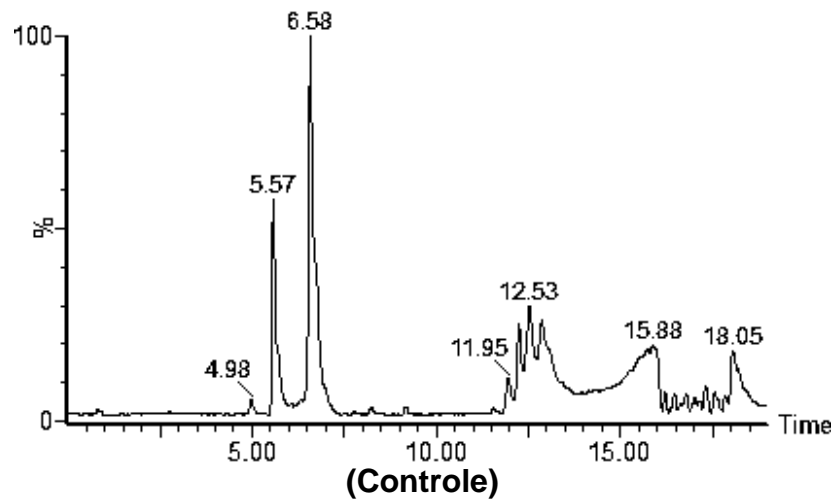
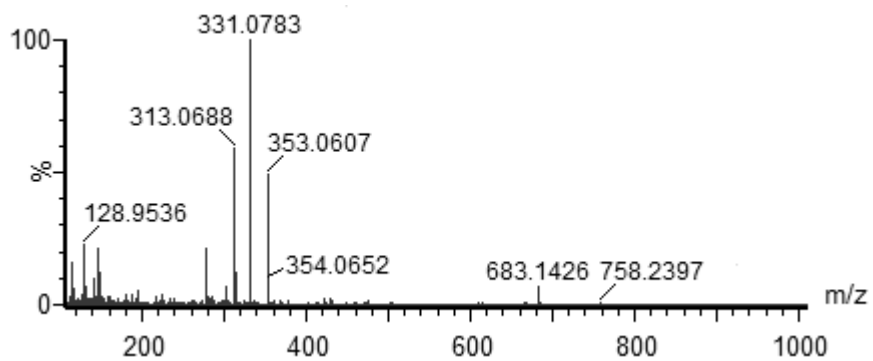
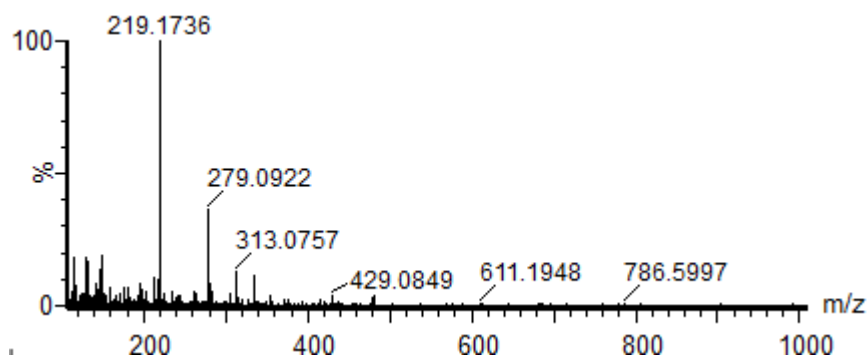


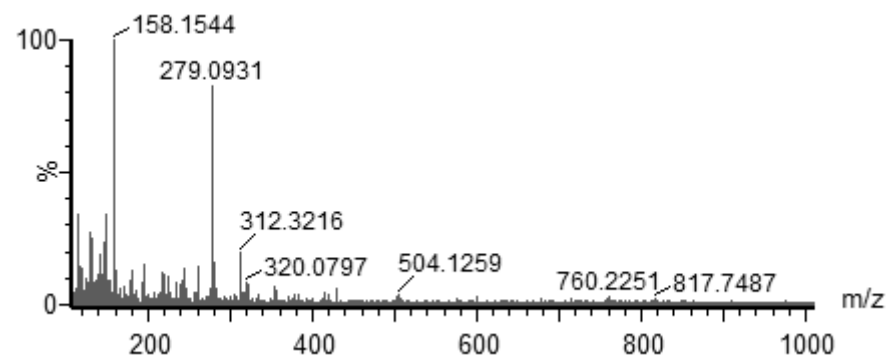
Figura 6: Cromatogramas da AFB1 tratada com UV-p.



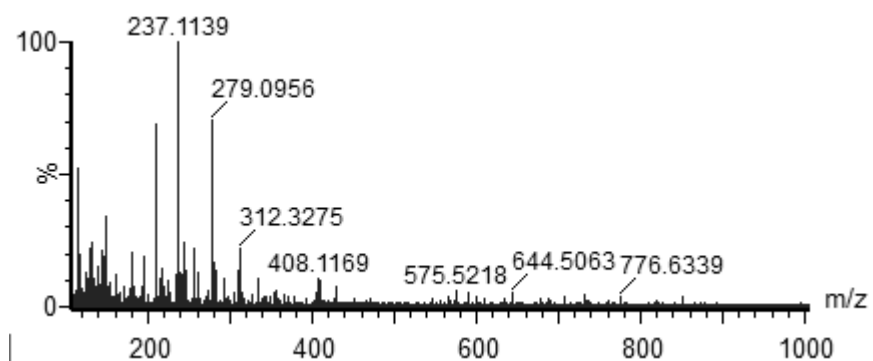
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 7: Espectros TOF MS-MS e proposta de fragmentação de produtos de degradação na presença de irradiação UV-p. As fragmentações propostas são mostrado como uma inserção.

Produtos de degradação Aflatoxina B1 tratada com Plasma frio a baixa pressão

Na Figura 8 apresenta-se um cromatograma de uma amostra de AFB1 e os compostos formados após o tratamento com PFBP. Na figura 9 estão os cromatogramas totais de íons da amostra de AFB1 não tratada e de uma amostra tratada pelo PFBP em diferentes tempos.

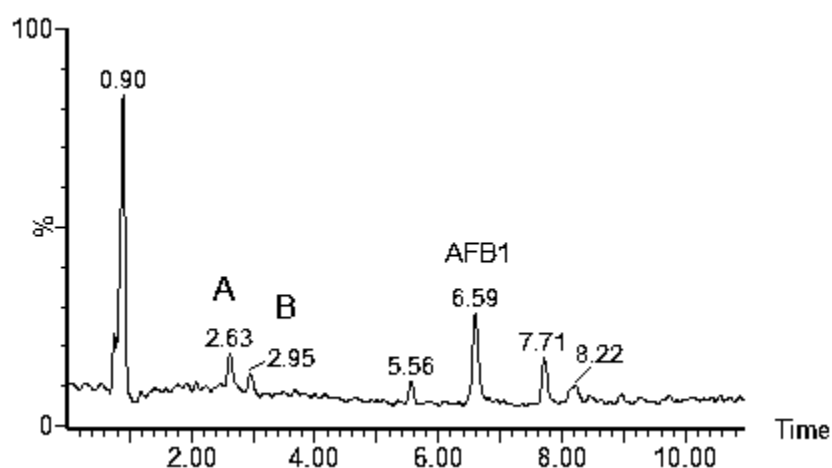


Figura 8: Cromatograma com produtos de degradação da AFB1 após tratamento com PFBP.

Na Figura 10 observa-se alteração no valor da resposta para AFB1 e produtos de degradação com aumento do tempo de tratamento com Plasma. Com o aumento do tempo de tratamento verifica-se que a AFB1 foi gradualmente decomposta. O pico que surge com o tempo de retenção de 8,22 minutos, depois de 10 minutos de tratamento, diminuiu com o tempo sugerindo que este pode ser um produto de reação intermediário, que foi posteriormente convertido em outros produtos de degradação.

As fórmulas moleculares da degradação produtos de AFB1, e seus produtos de degradação por plasma estão resumidos na Tabela 3. Comparado com a massa teórica obtidos a partir da fórmula molecular proposta, a massa determinada por meio de TOF-MS tinha menos de 10 ppm erro. Os resultados mostraram que desde que as massas do produto sejam determinadas com precisão, a composição elementar poderia ser determinado considerando todas as possíveis composições elementares.

Como o tratamento de Plasma frio é um processo não térmico, a temperatura da amostra, durante o tratamento com plasma, fica em torno de

40 ° C, que está bem abaixo da temperatura (160°C) necessária para a decomposição térmica de AFB1 (Wang et al., 2016). A intensidade de emissão de luz Ultravioleta durante aplicação do plasma frio atmosférico é menor que $50 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Laroussi e Leipold, 2005), que é mais baixo do que o necessário (1820 a $1300 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$) para degradação da aflatoxina (Liu et al., 2010), sendo assim, insignificante. Acredita-se que as espécies reativas geradas pelo gás utilizado durante o tratamento com plasma é responsável pela degradação da aflatoxina. Quando o ar foi aplicado como gás, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio foram geradas, que foram responsáveis pela eliminação de patógenos de origem alimentar, pesticidas, e outros compostos químicos indesejáveis. (McClurkin-Moore et al., 2017; Misra et al., 2014a e Misra et al., 2014b).

Shi et al. (2017), acreditam que as espécies reativas de oxigênio, em vez das espécies de nitrogênio, desempenham um papel importante na degradação da aflatoxina durante tratamento com plasma frio atmosférico de alta voltagem. Porque houve menor degradação da aflatoxina tratada com nitrogênio puro do que com ar, e há menores concentrações de ozônio e outras espécies oxidantes geradas em nitrogênio gasoso do que no ar. E não encontram molécula de nitrogênio nos produtos de degradação da AFB1 após o tratamento. O que também foi constatado no presente estudo.

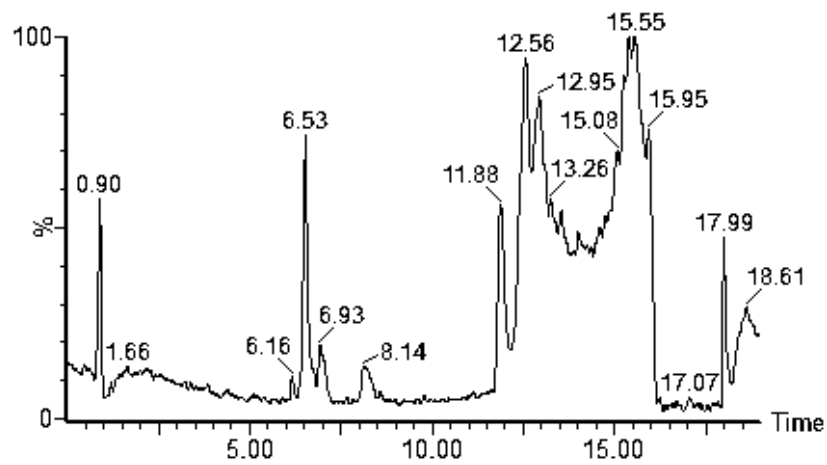
Diferentes métodos de geração de plasma, tais como plasma de argônio induzido por micro-ondas, plasma de gás nitrogênio por indução estática, plasma frio por rádio frequência, e Plasma frio atmosférico, geram plasma com diferentes perfis reativos envolvendo diferentes mecanismos de reação para degradação da aflatoxina (Shi et al., 2017).

Os produtos encontrados neste trabalho diferem dos produtos encontrados no trabalho de plasma frio por radiofrequência (Wang et a., 2015) gerado com ar e dois produtos apresentados neste estudo (m/z 261 e 305), são iguais aos encontrados em um trabalho utilizando plasma frio atmosférico de alta voltagem (Shi et al. 2017). O $\text{OH}\cdot$ e $\text{H}\cdot$ radicais foram gerados e também foram relatados como principais espécies reativas para degradação de aflatoxinas para ambos trabalhos.

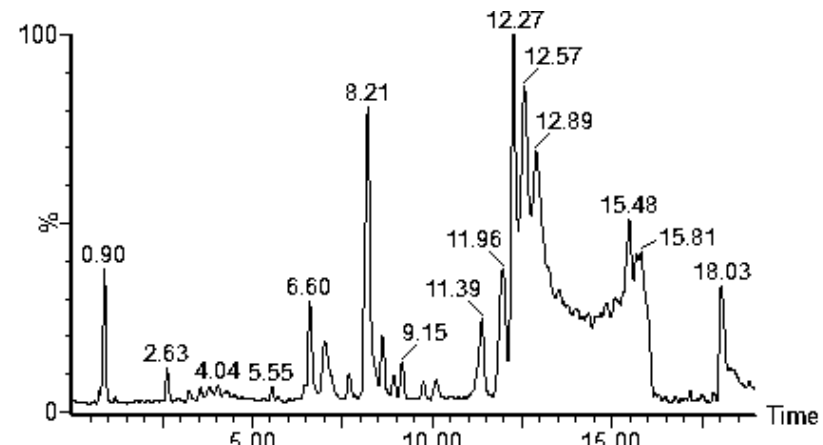
Tabela 4: Fórmulas propostas para AFB1 e seus produtos de degradação com PFBP obtidos usando Q-TOF-MS

Composto	Massa observada (m/z)	Massa calculada (m/z)	Erro massa		DBE	Fórmula molecular	i-FIT	i-FIT (normal)
			mDa	ppm				
AFB1	313,0739	313,0712	2,7	8,6	11,5	C17H13O6	115,0	0,0
A	261,1363	261,1338	2,5	9,6	2,5	C12H21O6	71,4	0,0
B	305,1622	305,1600	2,2	7,2	2,5	C14H25O7	67,0	0,0

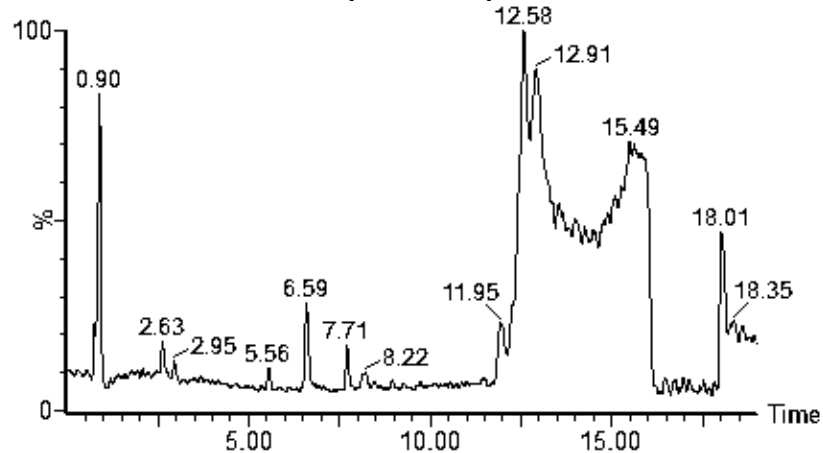
Na Figura 11 são apresentadas as fragmentações dos compostos formados após aplicação do tratamento do PFBP.



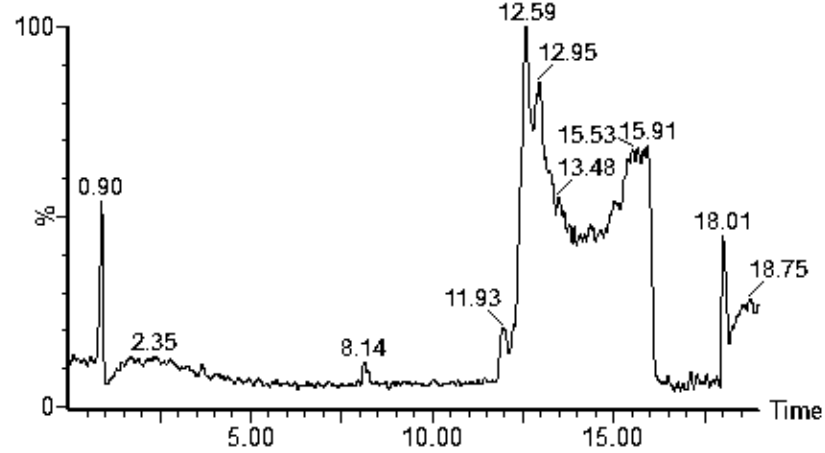
(Controle)



(10 minutos)

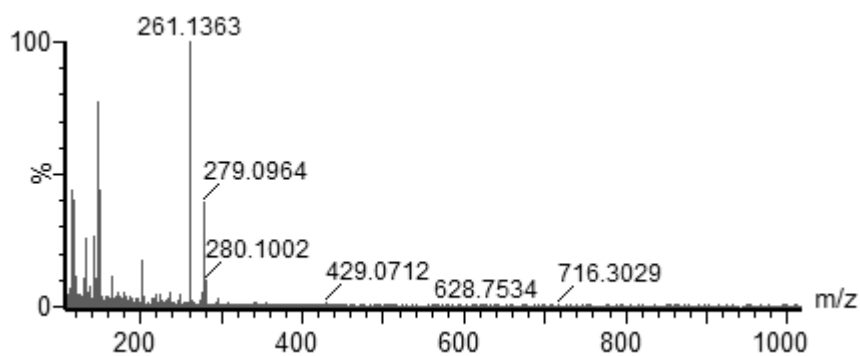


(20 minutos)

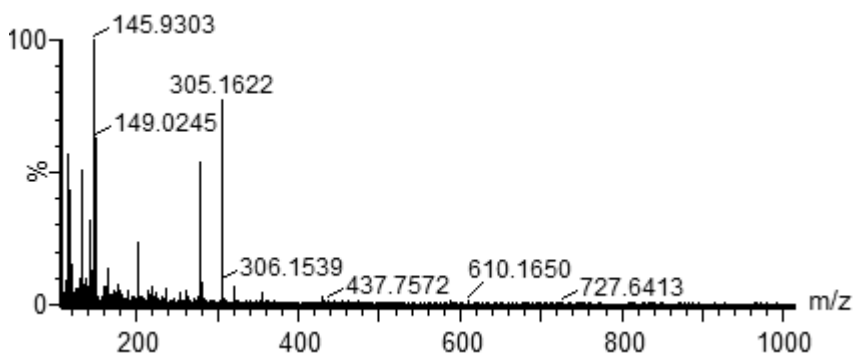


(30 minutos)

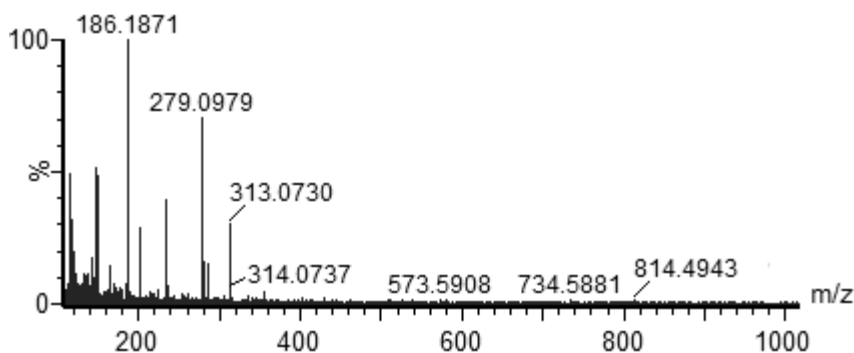
Figura 10: Cromatogramas da AFB1 tratada com Plasma de ar sintético com fluxo de $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



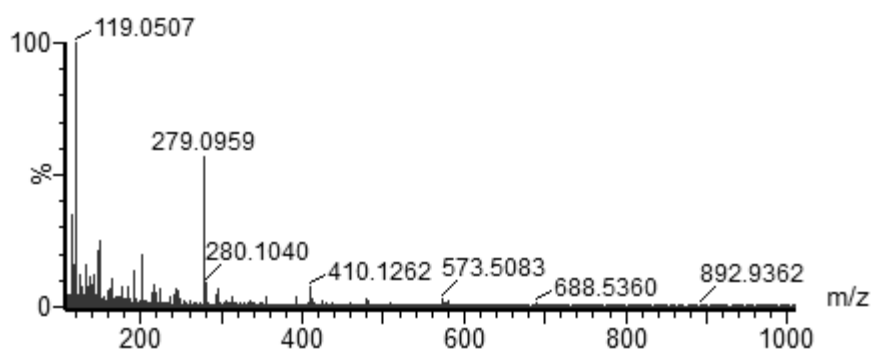
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 11: Espectros TOF MS-MS e proposta de fragmentação de produtos de degradação na presença de irradiação Plasma frio. As fragmentações propostas são mostrado como uma inserção.

Ensaio de Toxicidade

A toxicidade de AFB1 foi medida para estabelecer a concentração de aflatoxina B1 letal para 50% dos náuplios após 24 h (DL50). O DRC completo para AFB1 é mostrado na Figura 12, e os valores de DL 50 como calculados pela regressão do modelo Dose-Resp são mostrados na Tabela 5. A maior toxicidade de AFB1 é evidente nos valores de DL50 de $1,409 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A seleção das concentrações de AFB1 e AFB2 utilizadas nos testes de citotoxicidade foi baseada nestes resultados.

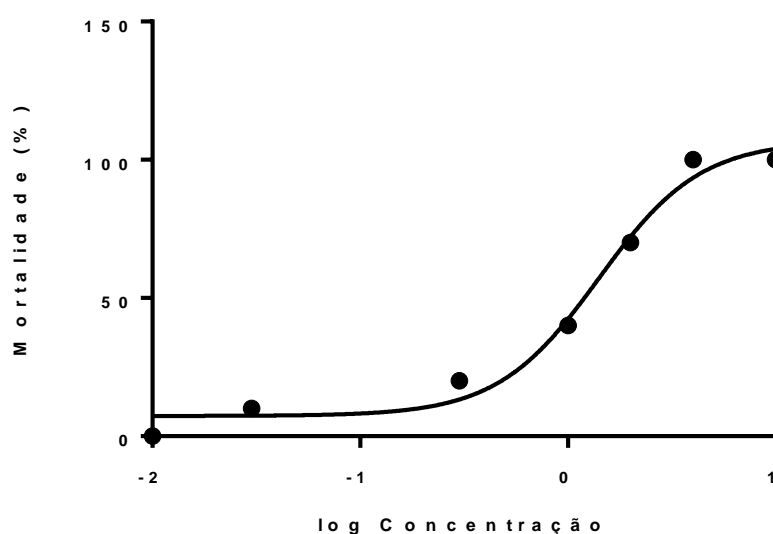


Figura 12: Curva de Dose-resposta de toxicidade de AFB1 tratada com luz pulsada e plasma frio usando Artêmia Salina.

Tabela 5: Parâmetros coletivos para DRC de AFB1 para Artemia Salina.

Amostra	Parâmetros da Regressão				R	LC _{50-24h} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	A1 ^a	A2 ^a	Log x ^b	p ^c		
AFB1	7,333	106,9	0,1489	1,781	0,9834	1,409

^a A1, A2, são linhas assintóticas da curva de regressão.

^b log x é a ordenada do ponto médio da curva de regressão.

^c p é o gradiente do ponto médio da curva de regressão.

O efeito do UV-p e Plasma na toxicidade de AFB1 foi determinado utilizando o ensaio de letalidade da Artemia Salina em que o tempo necessário

para uma taxa de mortalidade de 50% (DL50) foi medida como um indicador do citotoxicidade AFB1 com e sem tratamento. Como mostrado na Figura 13 a toxicidade de $1,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ aflatoxina na *Artemia Salina* foi evidente com os valores mais baixos de 43,5 h para AFB1. No entanto, a redução na toxicidade das aflatoxinas após tratamento com UV-p e Plasma foi evidente na recuperação dos valores de DL50 após o tratamento para 61,5 h para UV-p e 56,25 h para Plasma. Houve diferença significativa ($a < 0,05$) no tempo de sobrevivência entre os tratamentos controle, UV-p e Plasma. Estes resultados estão de acordo com os de Wang et al. (2016), que afirma que nos tempos alcançados de sobrevivência, ocorreu a degradação completa da toxicidade da AFB1 pelos tratamentos empregados.

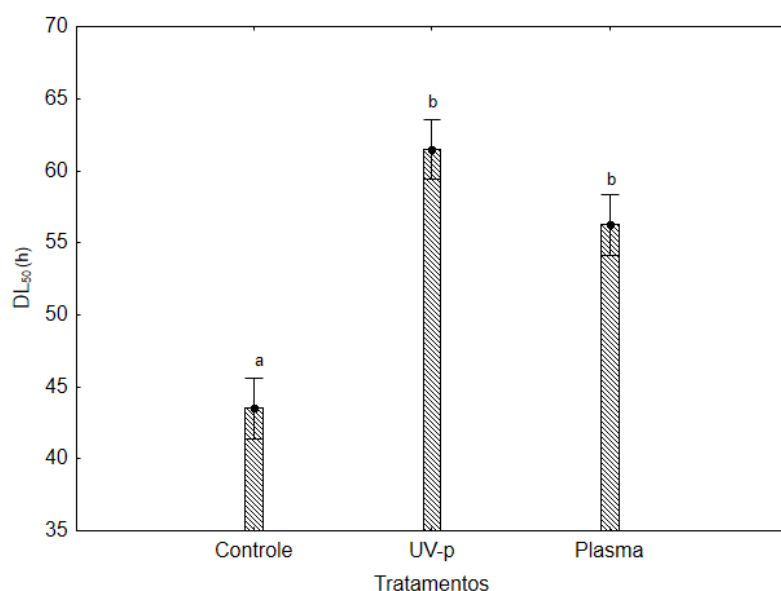


Figura 13: Efeito da luz pulsada e do Plasma no LT50 de *Artemia salina* pelo tratamento de AFB1 para tempos diferentes ($P < 0,05$).

O sistema de anel de furofurano nas aflatoxinas está associado ao alto nível de citotoxicidade desses compostos. Os efeitos tóxicos das aflatoxinas causam um dano sistêmico aos animais, resultante da inibição da síntese de RNA e DNA e da interferência na síntese de proteínas. Devido a redução da toxicidade pelos tratamentos é provável que os tratamentos tenham causado degradação do sistema de anéis críticos furofurano nestes compostos (Wang et al., 2016).

CONCLUSÕES

Conclui-se que os tratamentos com UV-p e plasma frio a baixa pressão são tecnologias promissora na degradação da aflatoxina B1. Demonstrou-se que a degradação de AFB1 por UV-p e Plasma frio a baixa pressão segue cinética da reação de primeira ordem ($R^2 > 0,95$). Quatro produtos de degradação de AFB1 em solução aquosa foram identificados por UPLC-Q-TOF/MS, para tratamento com UV-p e dois para o Plasma. O ensaio com *Artemia Salina* foi empregado para avaliar a toxicidade residual dos produtos de degradação de AFB1 em solução aquosa, e os resultados indicaram que a Toxicidade das amostras tratadas diminuiu significativamente em comparação com amostras não tratadas, mas não desapareceram completamente, permitindo sua utilização em Alimentos por serem tecnologias físicas e devido à alta porcentagem de degradação e redução da toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARJUNAN, K.P.; CLYNE, A.M. Hydroxyl radical and hydrogen peroxide are primarily responsible for dielectric barrier discharge plasma induced angiogenesis. **Plasma Processes and Polymers**, v. 8, 1154–1164, 2011.

BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLÓRIA, E. M.; SALGADO, J. M.; VIZIOLI, M. R. Formas termolisada e viva de leveduras na redução de toxicidade causada por aflatoxinas. **Scientia agrícola**. v.59, n.2, p.257-260, 2002.

BASARAN, P.; BASARAN-AKGUL, N.; OKSUZ, L. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. **Food Microbiology**, v. 25, p. 626–632, 2008.

COOPER, W.J.; ZIKA, R.G.; PETASNE, R.G.; FISCHER, A.M. Sunlight-induced photochemistry of humic substances in natural waters: major reactive species, in *Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 333–362, 1989.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

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**, v. 77, p. 187-191, 2017.

DU, C.M.; WANG, J.; ZHANG, L.; LI, H.X.; LIU, H.; XIONG, Y. The application of a non-thermal plasma generated by gas – liquid gliding arc discharge in sterilization. **New Journal of Physics**, v. 14, p. 1-16, 2012.

EHLBECK, J.; SCHNABEL, U.; POLAK, M.; WINTER, J.; WOEDTKE, T.; BRANDENBURG, R.; HAGEN, T.; WELTMANN, K.D. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, p. 1-18, 2011.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T.O.; VRIES, R.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F.J.; EHRLICH, K.; SAMSON, R.A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 59, n. 1, p. 31-37, 2007.

HAYES, R. B.; VAN NIEUWENHUIZE, J. P.; RAATGEVE, J. W.; TEN KATE, F. J. W. Aflatoxin Exposures in the Industrial Setting: an Epidemiological Study of Mortality. **Food and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 39-43, 1984.

International Agency for Research on Cancer e IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monogr eval carcinog risks hum, v. 82, p. 171-300, 2002.

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

LIU, B.; LU, R. Chemical Kinetics, Physical chemistry. Huazhong University of Science and Technology Press, Wu Han, China, 2008.

LIU, R. J.; JIN, Q. Z.; TAO, G. J.; SHAN, L.; LIU, Y. F.; WANG, X. G. LC-MS and UPLC-Quadrupole Time-of-Flight MS for Identification of Photodegradation Products of Aflatoxin B-1. **Chromatographia**, v. 71, 107–112, 2010.

LIU, R.; JIN, Q.; HUANG, J.; LIU, Y.; WANG, X.; MAO, W.; WANG, S. Photodegradation of Aflatoxin B1 in peanut oil. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 5, p. 843–849, 2011.

LIU, R.; JIN, Q.; TAO, G.; SHAN, L.; HUANG, J.; LIU, Y.; WANG, X.; MAO, W.; WANG, S. Photodegradation kinetics and byproducts identification of the Aflatoxin B1 in aqueous medium by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, p. 553-559, 2010.

MCCLURKIN-MOORE, J. D.; ILELEJI, K. E.; KEENER, K. M. The Effect of High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Treatment on the Shelf-Life of Distillers Wet Grains. **Food Bioprocess Technology**, p.1–10, 2017.

MISRA, N. N.; PANKAJ, S. K.; SEGAT, A.; ISHIKAWA, K. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 55, p. 39-47, 2016.

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**, v. 125, p.131–138, 2014b.

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

MISRA, N.N.; TIWARI, B.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S.; CULLEN, P. J. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p.159–170, 2011.

MONTIE, T.C.; KELLY-WINTENBERG, K.; ROTH, J.R. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for

sterilization of surfaces and materials. *IEEE Transactions on Plasma Science*, v.28, p.41–50, 2000.

MOREAU, M.; LESCURE, G.; AGOULON, A.; SVINAREFF, P.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation. **Journal of Applied Toxicology**, v.33, n.5, p. 357-363, 2011.

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. 417-24, 1997.

OMS-OLIU, G.; AGUILÓ-AGUAYO, I.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Effects of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Postharvest Biology and Technology**, v.56, p. 216–222, 2010.

OMS-OLIU, G.; ODRIOZOLA-SERRANO, ISABEL.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1312–1319, 2009.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Micotoxinas. Washington, 1983. (Critérios de Salud Ambiental, 11).

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxina e seu poder carcinogênico. **Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 147-165, 2011.

SAMARAJEEWA, U.; SEN, A. C.; COHEN, M. D.; WEI, C. I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 6, p. 489-501, 1990.

SAMARAJEEWA, U.; SEN, A. C.; COHEN, M. D.; WEI, C. I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 489-501, 1990.

SHI, H.; ILELEJI, K.; STROSHINE, R.L.; KEENER, K.; JENSEN, J. L. Reduction of Aflatoxin in Corn by High Voltage Atmospheric Cold Plasma. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 6, p. 1042–1052, 2017.

WANG, B.; MAHONEY, N. E.; KHIR, R.; WU, B.; ZHOU, C.; PANA, Z.; MA, H. Degradation kinetics of aflatoxin B1 and B2 in solid medium by using pulsed light irradiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9058>

WANG, B.; MAHONEY, N. E.; PAN, Z.; KHIR, R.; WU, B.; MA, H.; ZHAO, L. Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. **Food Control**, v. 59, p. 461-467, 2016.

WANG, SQ.; HUANG, GQ.; LI, YP.; XIAO, JX.; ZHANG, Y.; JIANG, WL. Degradation of aflatoxin B1 by low-temperature radio frequency plasma and degradation product elucidation. **European Food Research and Technology**, v.241, n.1, p.103-113, 2015.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DAS CASTANHAS DO PARÁ E DE CAJU CONTAMINADAS COM AFLATOXINA B1 E TRATADAS COM LUZ ULTRAVIOLETA PULSADA E PLASMA FRIO A BAIXA PRESSÃO

RESUMO

As castanhas de caju e do Pará são alimentos muito consumidos devido sua composição e funcionalidade. As castanhas são produtos muito susceptíveis ao ataque de fungos e produção de micotoxinas, como a aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Muitas técnicas têm sido estudadas para evitar o crescimento de fungos e redução da formação de micotoxinas. No presente estudo foram utilizadas a luz pulsada (UV-p) e o Plasma frio a baixa pressão (PFBP) para descontaminar castanhas de caju e do Pará contaminadas com Aflatoxina B1 (AFB1). As castanhas foram inoculadas com aflatoxina AFB1, em seguida tratadas com UV-p e PFBP. O tratamento de 12J·cm⁻² de UV-p reduziu 58% de AFB1 em caju e 91% em castanha do Pará. O PFBP frio reduziu 73% de AFB1 em caju e 65,3% em castanha do Pará. Como os tratamentos UV-p resultam na degradação da aflatoxina, foram feitas avaliações de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e oxidação lipídica nas castanhas antes e após os tratamentos. Não houve alteração na capacidade antioxidante e índice de peróxido. Houve pequena alteração na acidez das castanhas de caju e quanto os compostos fenólicos observou-se redução nas duas castanhas após aplicar o PFBP. Os resultados obtidos sugerem que a tecnologia UV-p e PFBP tem um potencial promissor para degradar aflatoxinas em castanhas.

Palavras-chave: ABTS, Descontaminação, micotoxinas e polifenóis.

ABSTRACT

Cashew nuts and Pará nuts are heavily consumed due to their composition and functionality. Chestnuts are very susceptible to fungal attack and mycotoxin production, such as aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Many techniques have been studied to prevent fungal growth and reduce the formation of mycotoxins. In the present study, pulsed light (UV-p) and cold plasma at low pressure (PFBP) were used to decontaminate Cashew nuts and Pará contaminated with Aflatoxin B1 (AFB1). The nuts were inoculated with aflatoxin AFB1, then treated with UV-p and PFBP. The treatment of $12\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ of UV-p reduced 58% of AFB1 in cashew and 91% in Pará chestnut. Cold PFBP reduced 73% of AFB1 in cashew and 65.3% in Pará chestnut. UV-p results in the degradation of aflatoxin, phenolic compounds, antioxidant capacity and lipid oxidation were evaluated in the nuts before and after treatments. There was no change in antioxidant capacity and peroxide index. There was a small change in the acidity of the cashew nuts and, as for the phenolic compounds, there was a reduction in the two nuts after applying the PFBP. The results obtained suggest that UV-p and PFBP technology has a promising potential to degrade aflatoxins in nuts.

Key words: ABTS, Decontamination, mycotoxins and polyphenols.

INTRODUÇÃO

Muitos alimentos como grãos, milho, nozes, amendoim, caroço de algodão, pistache, castanha do Pará, dentre outros, são suscetíveis a contaminação pelo fungo filamentoso *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que produzem aflatoxinas como metabólitos secundários. Pelo menos 18 aflatoxinas diferentes foram isoladas, mas a Aflatoxina B1 (AFB1) é a que mais preocupa devido a suas propriedades tóxicas e cancerígenas (Yu et al., 2005; Wang et al., 2016).

As castanhas do Pará e de caju são commodities importantes de exportação como também são consumidas no país devido aos benefícios apresentados, com o seu consumo em função da sua composição nutricional.

Entretanto a castanha pode conter um composto tóxico conhecido como aflatoxina, que é produzida devido ao ataque de fungos, durante à produção, transporte e armazenamento inadequados, favorecendo a produção de micotoxinas (aflatoxinas) (Brasil, 2010; Milhome et al., 2014; Amazônia, 2014).

Aflatoxinas causam numerosos efeitos agudos ou crônicos, tais como carcinogenicidade, indução de tumores, teratogenicidade, genotoxicidade, cirrose hepática aguda, distúrbios hormonais, comprometimento do sistema nervoso dentre outros (Eaton e Gallagher, 1994; Loughheed et al., 1995; Oyelami et al., 1997; Yu e Yuan 2004).

Muitas técnicas têm sido estudadas para evitar o crescimento de fungos e redução da formação de micotoxinas. Estes incluem métodos físicos (por exemplo, irradiação), tratamentos químicos (amônia, peróxido de hidrogênio, etileno e outros) e métodos de controle biológico (Samarajeewa et al., 1990; Gunterus et al., 2007; Wang et al., 2016).

Luz pulsada (UV-p) é uma tecnologia "não-térmica" aprovada pelo FDA (FDA, 1996). A tecnologia consiste em curtos pulsos, de alta intensidade e de amplo espectro de radiação. Moreau et al. (2011) relataram degradação de zearalenona, desoxinivalenol, Aflatoxina AFB1 e Ocratoxina.

O plasma frio, também é uma tecnologia "não-térmica", que é um gás parcialmente ionizado (Scholtz et al., 2015). Tem como aplicação evitar formação de biofilmes e eliminar micro-organismos, é utilizado em materiais que são sensíveis aos produtos químicos e/ou calor, evitando que substâncias químicas deixem componentes remanescentes na superfície (Kramer et al., 2015). Novas aplicações de plasma frio têm sido propostas no setor de processamento de alimentos, como a degradação da atividade de enzimas, em alguns casos com melhora na qualidade do produto (Pankaj et al., 2013; Surowsky et al., 2013; Tappi et al., 2014).

Assim, neste trabalho será utilizado a Luz Pulsada e o Plasma Frio para degradar aflatoxina em castanhas de caju e castanhas do Pará, de forma que esses tratamentos causem mínimas alterações nas características físicas e químicas das castanhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamento de Luz pulsada

Para os tratamentos de luz UV-p, foi utilizada uma câmara UV-p (SteriBeam, modelo XeMaticA-2LXL) com duas lâmpadas de xénon posicionadas lateralmente, com capacidade para um pulso a cada 15 segundos e energia de $0,3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{pulso}^{-1}$ (para pulsos com 100% de potência das lâmpadas).

Tratamento por plasma a frio

Os tratamentos de plasma a frio foram realizados utilizando um sistema de plasma de mesa PE-100 (Plasma Etch, EUA). O plasma foi gerado em Ar sintético e nitrogênio (grau FID 4.5, pureza 99,95%, White Martins, Brasil), aplicando um campo elétrico de 80 kHz através do eletrodo. O processo foi realizado no modo plasma indireto, o que significa que o plasma foi gerado e depois alimentado na câmara de processamento, que continha a amostra.

Extração Aflatoxina das castanhas

Para extração da Aflatoxina, foi pesada 25 g da amostra moída com 5g de cloreto de sódio (NaCl) e colocada em triturador adicionado 125 mL de Metanol:água (60:40). A mistura foi realizada em liquidificador por 1 minuto e depois filtrada em recipiente limpo. Foi pipetado 20 mL do extrato filtrado e diluído em 20 mL de água purificada. O extrato diluído foi filtrado através de filtro de microfibra de vidro em recipiente limpo. 10 mL do extrato foi eluído através da coluna Aflatest® a uma taxa de 1-2 gotas por segundo, em seguida foi injetado 20 mL de água purificada a uma taxa de 2 gotas por segundo. E em seguida 1 mL de metanol grau HPLC a uma taxa de 1 gota por segundo e recolher o eluato em cubeta, adicionar 1 mL de água purificada e injetar no HPLC (Manual Aflatest, 2016).

Avaliação UV-p e PFBP em castanhas de caju e do Pará com AFB1

As castanhas foram descontaminadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5 %, enxaguou-se três vezes em água destilada estéril e secou-se com papel absorvente estéril. Depois disso, as castanhas foram secas sob uma capa de fluxo laminar por várias horas (Selcuk et al., 2008). Então aplicou-se a

solução contendo AFB1 (). As castanhas contaminadas com Aflatoxina B1 foram expostas a energia de $12\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ utilizando UV-p e plasma de ar sintético com fluxo de $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 30 minutos. As castanhas tratadas passaram pelo processo de extração da Aflatoxina B1 descrito no item 4.9 e a Aflatoxina do extrato foi quantificada utilizando UPLC-Q-DA. As análises foram feitas em 5 repetições.

Quantificação AFB1

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Uv-Vis. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, $1,7\ \mu\text{m}$), temperatura fixa de $40\ ^\circ\text{C}$, fases móveis, água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando nas condições: inicial 2% B, 80% B (9 min), fluxo de $0,4\ \text{mL} / \text{min}$ e volume de injeção de $5\ \mu\text{L}$.

Efeito UV-p e plasma em castanhas

Capacidade antioxidante

Para análise de capacidade antioxidante foi utilizado o método de sequestro do radical ABTS - 2,2'-Azinobis-bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) que foi primeiramente proposto por Miller et al. (1993), seguindo-se algumas modificações sugeridas por Rufino et al. (2007a).

Para preparo da curva em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de $30\ \mu\text{L}$ das soluções de trolox ($100\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$, $1.000\ \mu\text{M}$, $1.500\ \mu\text{M}$ e $2.000\ \mu\text{M}$) para tubos de ensaios e, em seguida, adicionou-se $3,0\ \text{mL}$ de solução do radical ABTS em agitador de tubos, o qual foi homogeneizado e realizado a leitura após 6 minutos em espectrofotômetro (Cary 50 Bio – Varian UV-Visible spectrophotometer) a $734\ \text{nm}$, utilizando álcool etílico como branco (RUFINO et al. 2007a).

A partir do extrato elaborado, prepara-se três diluições diferentes em tubos de ensaio, em triplicata. Adicionou-se $30\ \mu\text{L}$ de cada diluição nos tubos e

acrescentou-se 3,0 mL do radical ABTS, homogeneizando-se. Esperou-se 6 minutos para realizar a leitura (RUFINO et al., 2007a).

Compostos fenólicos

Obtenção dos extratos

Foram pesados 4 gramas de castanha triturada em tubos de centrifuga, adicionou-se 4 mL de metanol P.A. 50% que ficaram em repouso por 60 minutos no escuro. Em seguida centrifugou-se durante 15 minutos a 15000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e recolhido em um balão de 10 mL e foi adicionado ao resíduo 4 mL de acetona P.A. 70% e ficou em repouso por 60 minutos no escuro e então centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos, sobrenadante foi recolhido no mesmo balão de 10 mL e completado com água destilada.

Determinação dos polifenóis extraíveis totais

Em tubos foi preparado 200 µL do extrato e para o branco 250 µL de água, adicionar nos tubos 250 µL do reativo de Fenol Folin Ciocateau, 500 µL de solução de Carbonato de sódio anidro 20%, 500 µL de água destilada, os tubos foram homogeneizados e deixados sob-reposo no escuro por 30 minutos. A mistura foi transferida para microplacas e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplaca a 700 nm.

Oxidação lipídica

Primeiramente foi realizada a extração à frio do óleo das castanhas por meio de prensagem. Após a extração do óleo foram realizadas a análise de acidez e índice de peróxido.

Determinação do Índice Acidez

Pesou-se 2 g da amostra em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 mL de solução de éter-álcool (2:1) neutra e duas gotas do indicador fenolftaleína. Titular com solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01 M até o aparecimento da coloração rósea, a qual deverá persistir por 30 segundos (Instituto Adolf Lutz, 1985). Foi utilizada a equação 1 para cálculo do índice de acidez:

$$\frac{V \times f \times 5,61}{P} = \text{índice de acidez} \quad (1)$$

Em que: V é o volume gasto na titulação; f é o fator da solução de hidróxido de sódio; P é o número de gramas da amostra.

Determinação do Índice de Peróxido

Pesou-se (5 ± 0,05) g da amostra em um frasco Erlenmeyer de 250 mL (ou 125 mL). Adicionou-se 30 mL da solução ácido acético-clorofórmio 3:1 e agitou-se até a dissolução da amostra. Adicionou-se 0,5 mL da solução saturada de KI e deixe em repouso ao abrigo da luz por exatamente um minuto. Acrescentou-se 30 mL de água e titule com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N ou 0,01 N, com constante agitação. Continuou-se a titulação até que a coloração amarela tenha quase desaparecida. Adicionou-se 0,5 mL de solução de amido indicadora e continuou-se a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul. Preparou-se uma prova em branco, nas mesmas condições e titulou-se. A equação 2 foi utilizada para cálculo do índice de peróxido (IP):

$$IP = \frac{(A - B) \times N \times f \times 1000}{P} \quad (2)$$

Em que : A = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação da amostra; B = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação do branco; N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio; f = fator da solução de tiosulfato de sódio; P = nº de g da amostra.

Análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e 5 repetições. A análise de variância foi calculada e a significância do teste F foi avaliada ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram comparadas pelo intervalo de confiança e as diferenças apresentadas

graficamente. Para os cálculos estatísticos foi o programa Statistical Analysis Systems (SAS), versão 9.2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de AFB1 em castanhas de caju e castanhas Pará após os tratamentos de UV-p e PFBP estão apresentadas nas Figuras 1 e 2. As castanhas de caju irradiadas com $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ apresentaram uma redução de 58% na AFB1 (de 25 para $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e de 73% redução na AFB1 (de 25 para $6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) quando tratada com PFBP (fluxo de 30 de ar sintético por 30 minutos). As castanhas do Pará irradiadas com $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ apresentaram uma redução de 91% na AFB1 (de 24,8 para $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e 65,3% de redução na AFB1 (de 24,8 para $8,6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) quando tratada com PFBP (fluxo de 30 de ar sintético por 30 minutos).

Na Figura 1, pode-se observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as castanhas tratadas e as que não foram tratadas, não havendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre os dois tratamentos aplicados. Sendo assim, no caso da castanha de caju, os dois tratamentos poderiam ser empregados com o objetivo de reduzir a concentração de AFB1. No caso da castanha do Pará, (Figura 2), houve diferença entre as castanhas não tratadas e as tratadas e as tratadas com UV-p e PFBP também diferiram.

A taxa de degradação da aflatoxina em castanha de caju foi muito maior no tratamento com plasma que na UV-p. Para castanha do Pará a taxa de degradação foi maior quando se aplicou UV-p. A eficiência do tratamento de UV-p é influenciada pela superfície do produto analisada. Isso porque observa-se que o tratamento foi mais eficiente na castanha do Pará que na castanha de caju, que apresenta mais ranhuras e uma superfície menos uniforme. Este “Efeito sombra” influencia grandemente a eficácia do tratamento com UV-p, sendo um desafio a ser superado (Wang et al., 2016). O plasma facilmente se espalha em pequenas cavidades, uniformemente, dissipando seu conteúdo de espécies reativas através da superfície exposta (Kramer et al., 2015).

Tratamento de irradiação de Luz pulsada em arroz e farelo de arroz usando fluência de $84,4 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ obteve uma redução de 75% na concentração de aflatoxina e com fluência de $16,1 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ a redução foi de 90,3% (Wang et al., 2016). Para o tratamento UV-p no presente estudo, uma fluência de $12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ houve uma redução de 53% na castanha de caju e 91% na castanha do Pará. A diferença na concentração final de aflatoxina se deve a diferença na fluência aplicada. A eficácia da degradação da aflatoxina foi atribuída à alta intensidade do UV-p, mas a amplo espectro de comprimentos de onda no UV-p também foi um fator que influenciou a taxa de degradação da aflatoxina.

Shi et al. (2017), observaram que a aflatoxina no milho foi degradada em 62% e 82% por 1 e 10 min. de tratamento com PFBP de alta voltagem com umidade relativa do ar de 40%, respectivamente. Siciliano et al. (2016), usando plasma frio atmosférico com 1000 W por 12 min obtiveram redução de 70% de Aflatoxina em avelãs.

Basaran et al. (2008), estudaram o efeito do plasma sobre a degradação de aflatoxinas em pistache, nozes e amendoim, e o tratamento de 20 min com plasma resultou em uma redução de 50% no total de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2). Park et al. (2007) relataram que as aflatoxinas foram completamente removidas após 5 s de aplicação do plasma de argônio induzido por micro-ondas, à pressão atmosférica. Estes resultados sugerem que sistemas de plasma podem ter fortes potenciais para degradar micotoxinas e pode ser utilizado de forma eficaz na conservação de alimentos. Devi et al. (2017), trabalhando com plasma frio, em 40 W e 15 min e 60 W e 12 min, obteve, em amendoins tratados com plasma mais de 70% e 90% de redução no conteúdo de AFB1, respectivamente.

Os resultados diferem do presente trabalho, devido a diferença no modelo do equipamento, potência utilizada e tipo do gás utilizado na formação do plasma, haja vista que a composição do gás e a potência interferem no resultado do plasma.

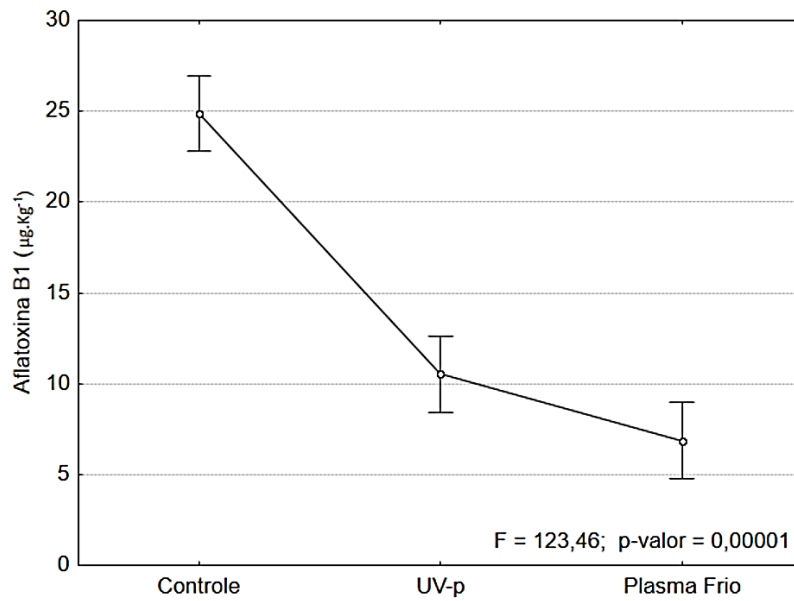


Figura 1. Média e intervalo de confiança para Aflatoxina B1 das castanhas de caju nos diferentes tratamentos.

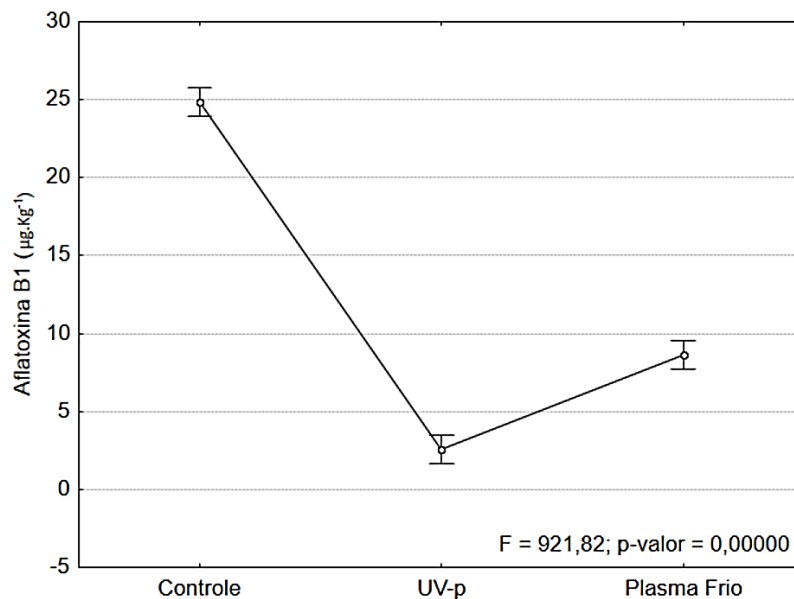


Figura 2. Média e intervalo de confiança para Aflatoxina B1 das castanhas do Pará nos diferentes tratamentos.

Nas Figuras 3 e 4 estão apresentados os resultados para compostos fenólicos em castanhas de caju e do Pará antes e após os tratamentos de plasma frio e Luz pulsada. O resultado para castanha de caju in natura está de acordo com o encontrado por Chandrasekara e Shahidi (2011) e o de castanha do Pará assemelhasse com o encontrado por John e Shahidi (2010). Valores

de compostos fenólicos inferiores aos relatados por Kornsteiner et al. (2006), pode estar relacionado a fatores agronômicos e ambientais, pois os mesmos desempenham papéis importantes na composição fenólica (Tomàs-Barberà et al., 2001).

As castanhas de caju tratadas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, pois observa-se uma redução na concentração de compostos fenólicos das castanhas tratadas, de 51% para UV-p e 46% para PFBP. Para castanha do Pará, as castanhas tratadas com UV-p não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação a castanha não tratada e a tratada com plasma diferiu estatisticamente das demais, apresentando redução de 33% de compostos fenólicos em relação ao controle.

Em um trabalho com cogumelos em que se aplicou UV-p, foi constatada que a aplicação de UV-p não teve um impacto sobre o conteúdo fenólico inicial de cogumelos frescos cortados. Mas em um dos tratamentos foi observado redução substancial em comparação com outros tratamentos. Este fenômeno poderia ser associado com uma aceleração da descompartimentalização celular, que permite compostos fenólicos entrar em contato com tirosina. (Oms-Oliu et al., 2010).

Sob condições de luz em excesso, as respostas defensivas de frutas dependem da genética, intensidade de radiação, tempo de exposição e como da maturidade fisiológica (González-Aguilar et al., 2010). No entanto, as respostas das plantas à radiação UV são altamente dependentes das espécies frutíferas, fase ontogênica, dose de UV, e da superfície exposta (Venditti e D'hallewin, 2014).

Os trabalhos de Grzegorzewski et al. (2010, 2011), consideram o efeito do plasma frio sobre o conteúdo fenólico total de alface-de-cordeiro. Os autores observaram que o tratamento provocou uma redução do teor de fenólico na folha, embora a matriz de planta atuou como uma proteção contra a oxidação de compostos bioativos por espécies reativas geradas pelo plasma. Embora o mecanismo ainda não esteja claro, estima-se que a degradação é uma resposta da capacidade conhecida de compostos fenólicos de eliminar os radicais livres (capacidade antioxidante) (Makris e Rossiter, 2002).

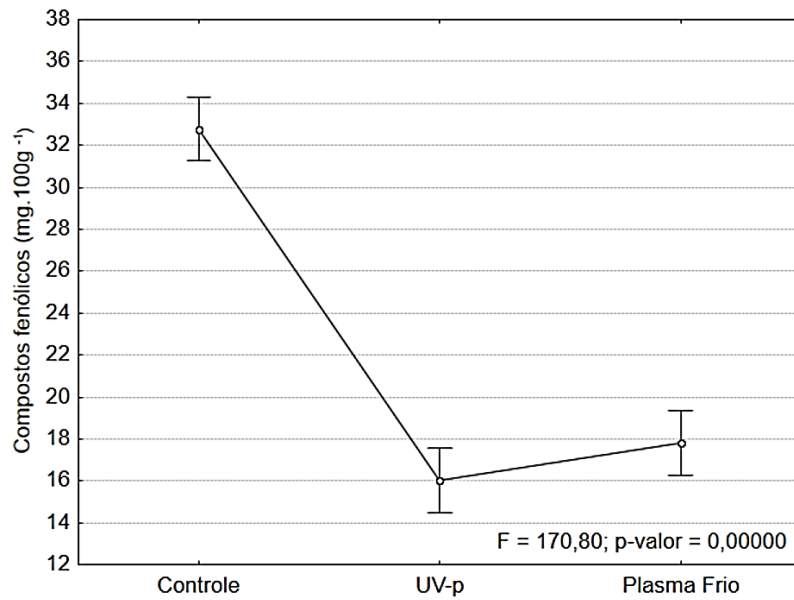


Figura 3. Média e intervalo de confiança para compostos fenólicos das castanhas de caju nos diferentes tratamentos.

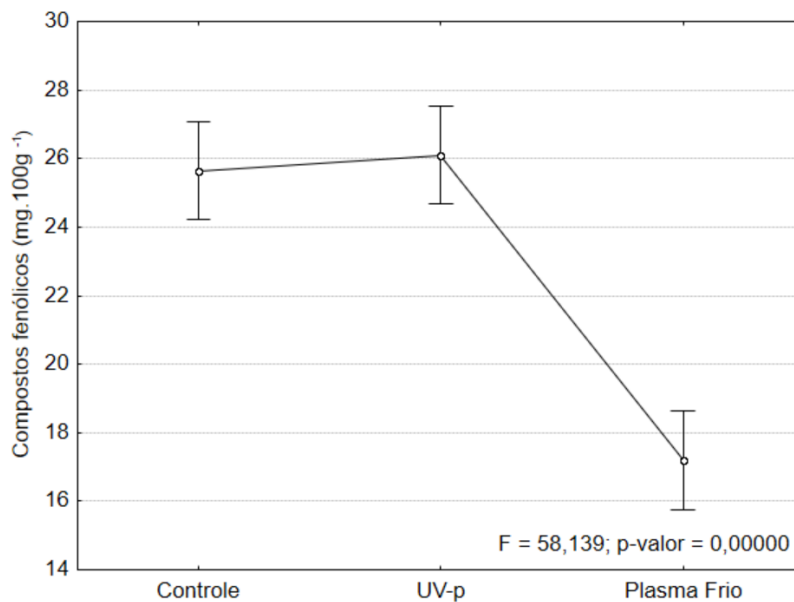


Figura 4. Média e intervalo de confiança para compostos fenólicos das castanhas do Pará nos diferentes tratamentos.

Nas Figuras 5 e 6 estão apresentadas as médias da capacidade antioxidante das castanhas de caju e do Pará antes e após tratamento com Luz pulsada e Plasma frio. Não foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) entre o controle e os tratamentos para as duas castanhas. Os tratamentos não interferiram na capacidade desses compostos considerados antioxidantes das castanhas.

Tratamento pós-colheita com UV-C não teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o capacidade antioxidante de tomates (Jagadeesh et al., 2011) e cogumelos (Guan, Fanb e Yan, 2012). Considera-se que a capacidade antioxidante está relacionada com os compostos fenólicos presentes, mas como houve alteração nesse não é considerável, não houve alteração na capacidade antioxidante.

Pasquali et al. (2016), aplicaram a tecnologia de Plasma frio (15 ou 30 min), em radicchio e verificaram que a capacidade antioxidante obtida pelas técnicas de ABTS e ORAC não diminuiu significativamente ($p < 0,05$) e concluíram que o plasma frio não afetou a concentração de compostos fenólicos.

Ramazzina et al. (2015), mostraram que os tratamentos de plasma, de 10 e 20 min não tiveram efeito significativo sobre a capacidade antioxidante e teor de antioxidantes de kiwis recém-cortados. Mesmo que as espécies reativas no plasma poderia ter causado a oxidação de compostos fenólicos individuais responsáveis pela atividade antioxidante de kiwis minimamente processado, este efeito foi neutralizada por mecanismos de resposta do tecido.

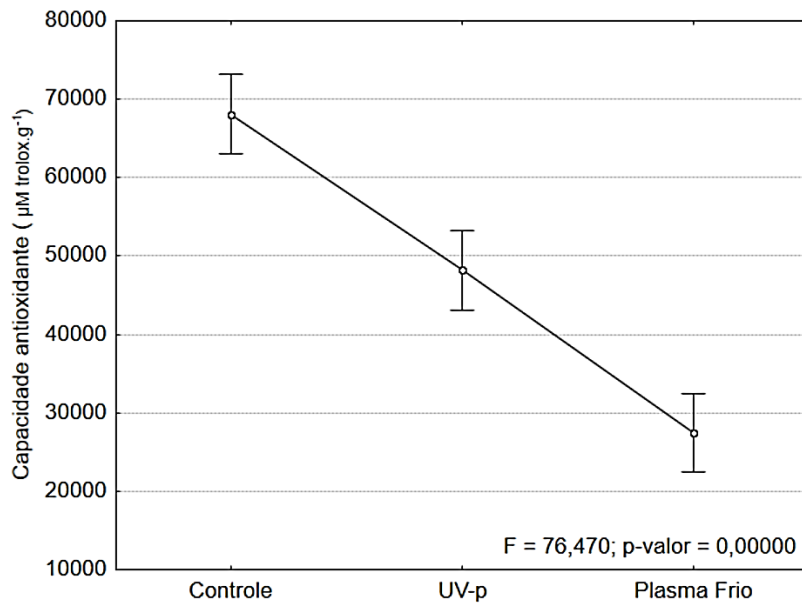


Figura 5. Média e intervalo de confiança para capacidade antioxidante das castanhas de caju nos diferentes tratamentos.

Vários resultados de estudos indicaram que a peroxidação de lipídeos de membrana ocorrem com irradiação UV-próximo, e que o grau de peroxidação está relacionado com o grau de insaturação dos ácidos graxos, e aumenta com o aumento da intensidade da radiação (CHAMBERLAIN e MOSS, 1987; KRAMER et al., 1991).

O plasma frio aplicado em alimentos ricos em ácidos graxos também podem causar a oxidação do ácido linolênico, pois as espécies reativas e o efeito da luz ultravioleta que são o mecanismo de efeito do Plasma quando em contato com o ácido linolênico remove o átomo de hidrogênio ligado ao carbono 11 ou 14, causando sua oxidação. Pois estes são reativos na presença de espécies reativas.

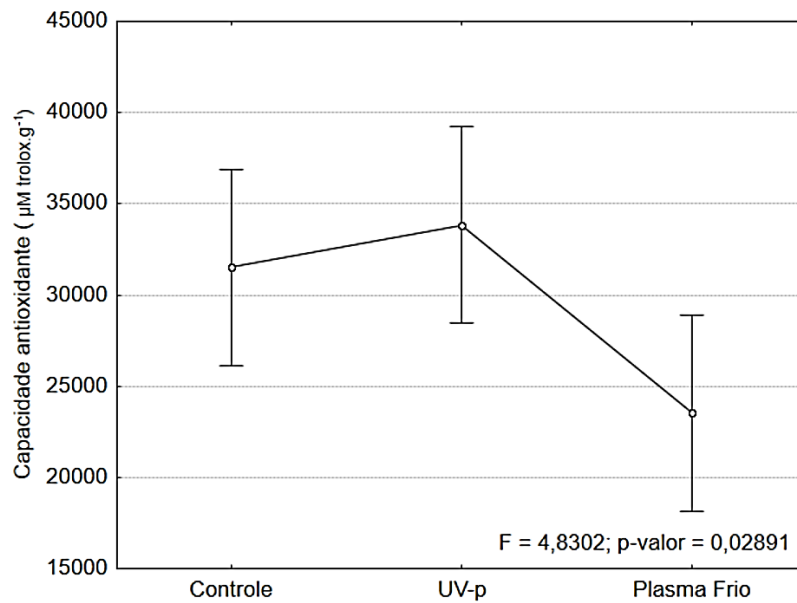


Figura 6. Média e intervalo de confiança para capacidade antioxidante das castanhas do Pará nos diferentes tratamentos.

As castanhas são ricas em gordura e por isso foi estudado a oxidação de lipídeos por meio da análise de acidez e peróxido no óleo das castanhas. Não houve alteração no índice de peróxido após os tratamentos de UV-p e PFBP nas castanhas de Caju e do Pará. Não foi observada diferença na acidez do óleo da castanha do Pará após os tratamentos (Figura 7). Para castanha de Caju foi observado aumento na acidez do óleo após o tratamento com UV-p (Figura 8). O aumento observado pode ser devido à ação de enzimas lipídicas liberadas das células da fruta e favorecido pela intensidade do tratamento com UV-p (Elez-Martínez et al., 2005).

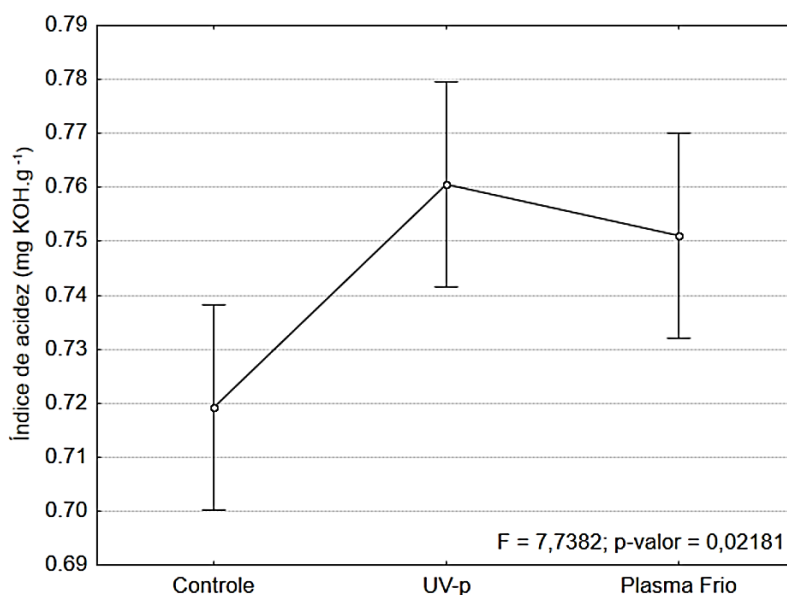


Figura 7. Média e intervalo de confiança para o índice de acidez das castanhas de caju nos diferentes tratamentos.

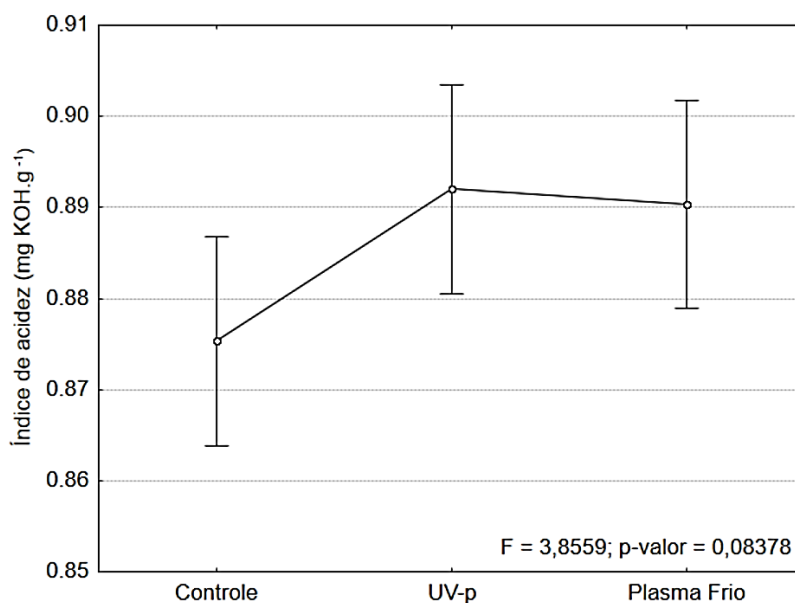


Figura 8. Média e intervalo de confiança para o índice de acidez das castanhas do Pará nos diferentes tratamentos.

Com os resultados sugere-se que UV-p não afetou drasticamente a estabilidade da fração lipídica, o que poderia estar relacionado com a presença de antioxidantes (por exemplo, tocoferóis, polifenóis), ainda não degradados pelos tratamentos. Resistência à oxidação do óleo contido em matrizes complexas como frutas vem de um equilíbrio delicado entre substâncias pró-

oxidantes, antioxidantes e condições de processo, que poderia favorecer ou retardar a oxidação lipídica (Nicoli et al., 1999; Wagner et al., 2002; Aguiló-Aguayo et al., 2014). A indução de processos oxidativos pelo processamento de UV-p ainda é uma das desvantagens para alguns alimentos ricos em gordura, como carnes (Wambura e Verghese, 2011; Hierro et al., 2011).

No presente trabalho foram encontrados resultados diferentes para as castanhas de caju e castanhas do Pará e as diferenças das respostas observadas devem-se às peculiaridades da matriz estudada, fisiologia e superfície exposta, sendo necessários mais estudos para diferentes alimentos.

CONCLUSÕES

Houve redução na concentração de aflatoxina B1 de castanhas de caju e do Pará tratadas com UV-p e Plasma frio. O tratamento de Plasma apresentou o mesmo comportamento na redução da AFB1 para os dois tipos de castanha. O tratamento de UV-p apresentou maior redução da AFB1 na castanha do Pará o que se deve a maior regularidade na superfície de contato.

Para as duas castanhas tratadas com Plasma houve ocorrência redução dos compostos fenólicos, devido a provável ação dos radicais livres gerados pelo plasma. A UV-p causou redução de compostos fenólicos na castanha de caju, que pode ter ocorrido devido a composição desta. Os tratamentos utilizados na pesquisa não alteraram a capacidade antioxidante das castanhas. Não foi observada alteração na concentração de Peróxido após os tratamentos e a Acidez também não sofreu grandes alterações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAZÔNIA. No Amazonas, exportação de castanha enfrenta barreiras. 2014. Disponível em: <<http://amazonia.org.br/2014/09/no-amazonas-exporta%C3%A7%C3%A3o-de-castanha-enfrenta-barreiras/>>. Acesso em 27 de fevereiro de 2016.

BASARAN, P.; BASARAN-AKGUL, N.; OKSUZ, L. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. **Food Microbiology**, v. 25, p. 626–632, 2008.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 11, de 22 de março de 2010.

CHANDRASEKARA, N.; SHAHIDI, F. Effect of Roasting on Phenolic Content and Antioxidant Activities of Whole Cashew Nuts, Kernels, and Testa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5006–5014, 2011.

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**, v. 77, p.187-191, 2017.

EATON, D.L.; GALLAGHER, E.P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology**, 34, p. 135–172, 1994.

ELEZ-MARTÍNEZ, P.; SOLIVA-FORTUNY, R. C.; GORINSTEIN, S.; MARTÍN-BELLOSO, O. Natural antioxidants preserve the lipid oxidative stability of minimally processed avocado puree. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 5, p. S325-S329, 2005.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; VILLA-RODRIGUEZ, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; YAHIA, E. M. Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. Review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 475–482, 2010.

GRZEGORZEWSKI, F.; EHLBECK, J.; SCHLÜTER, O.; KROH, L. W.; ROHN, S. Treating lamb's lettuce with a cold plasma e Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. **LWT-Food Science and Technology**, v.44, p. 2285-2289, 2011.

GRZEGORZEWSKI, F.; ROHN, S.; KROH, L. W.; GEYER, M.; SCHLÜTER, O. Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. **Food Chemistry**, v. 122, p.1145-1152, 2010.

GUAN, W.; FANB, X.; YAN, R. Effects of UV-C treatment on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, microbial loads, and quality of button mushrooms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 64, n.1, p. 119–125, 2012.

GUNTERUS, A.; ROZE, L.V.; BEAUDRY, R.; LINZ, J.E. Ethylene inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* grown on peanuts. **Food Microbiology**, v. 24, p. 658–663, 2007.

HIERRO, E.; BARROSO, E.; HOZ, L.; ORDÓÑEZ, J. A.; MANZANO, S.; FERNÁNDEZ, M. Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 275–281, 2011.

JAGADEESH, S.L.; CHARLES, M.T.; GARIEPY, Y.; GOYETTE, B.; RAGHAVAN, G.S.V.; VIGNEAULT, C. Influence of post-harvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1463–1472, 2011.

JOHN, J. A.; FERREIDON, S. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 196 – 209, 2010.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, v. 98, p. 381–387, 2006.

KRAMER, A.; BEKESCHUS, S.; MATTHES, R.; BENDER, C.; STOPE, M. B.; NAPP, M.; LADEMANN, O.; LADEMANN, J.; WELTMANN, K.; SCHAUER, F. Cold Physical Plasmas in the Field of Hygiene—Relevance, Significance, and Future Applications. **Plasma Processes and Polymers**, v.12, p.1410–1422, 2015.

LOUGHEED, M.D.; ROOS, J.O.; WADDEL, W.R.; MUNT, P.W. Desquamative interstitial pneumonitis and diffuse alveolar damage in textile workers. Potential role of mycotoxins. **Chest** , v.108, p. 1196–1200, 1995.

MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: a preliminary investigation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 1, 103-113, 2002.

MILHOME, M.A.L.; LIMA, C.G.; LIMA, L.K. de; LIMA, F.A.F.; SOUSA, D.O.B.; NASCIMENTO, R.F. Occurrence of aflatoxins in cashew nuts produced in northeastern brazil. **Food Control**, v. 42, p. 34-37, 2014.

MOREAU, M.; LESCURE, G.; AGOULON, A.; SVINAREFF, P.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation. **Journal of Applied Toxicology**, v.33, n.5, p. 357-363, 2011.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 94-100, 1999.

OMS-OLIU, G.; AGUILÓ-AGUAYO, INGRID.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Effects of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Postharvest Biology and Technology**, v.56, p. 216–222, 2010.

OYELAMI, O.A.; MAXWELL, S.M.; ADELUSOLA, K.A.; ALADEKOMA, T.A.; OYELESE, A.O. Aflatoxins in the lungs of children with kwashiorkor and children with miscellaneous diseases in Nigeria. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 51, p. 623–628, 1997.

PANKAJ, S.K.; MISRA, N.N.; CULLEN, P.J. Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p.153–157, 2013.

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 & Coatings Technology**, v. 201, p. 5733–5737, 2007.

PASQUALI, F.; STRATAKOS, A. CH.; 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**, v. 60, p. 552-559, 2016.

RAMAZZINA, I.; BERARDINELLI, A.; RIZZI, F.; TAPPI, S.; RAGNI, L.; SACCHETTI, G. Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 107, p. 55-65, 2015.

SAMARAJEEWA, U.; SEN, A. C.; COHEN, M. D.; WEI, C. I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 6, p. 489-501, 1990.

SCHOLTZ, V.; PAZLAROVA, J.; SOUSKOVA, H.; KHUN, J.; JULAK, J. Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1108–1119, 2015.

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.

SHI, H.; ILELEJI, K.; STROSHINE, R. L.; KEENER, K.; JENSEN, J. L. Reduction of Aflatoxin in Corn by High Voltage Atmospheric Cold Plasma. **Food and Bioprocess Technology**, v.10, p. 1042-1052, 2017.

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**, v.8, n.5, p. 125, 2016.

SUROWSKY, B.; FISCHER, A.; SCHLUETER, O.; KNORR, D. Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.19, p.146–152, 2013.

TAPPI, S.; BERARDINELLI, A.; RAGNI, L.; DALLA ROSA, M.; GUARNIERI, A.; ROCCULI, P. Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples.

Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 21, p. 114-122, 2014.

TOMÀS-BARBERÀN, F. A.; GIL, M. I.; GREMIN, P.; WATERHOUSE, A. L.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. HPLC-DAD–ESI-MS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4748–4760, 2001.

VENDITTI, T.; D’HALLEWIN, G. Use of ultraviolet radiation to increase the health-promoting properties of fruits and vegetables. **Stewart Postharvest Review**, v. 3, p. 1-3, 2014.

WAGNER, K. H.; DERKITS, S.; HERR, M.; SCHUCH, S.; ELMADFA, I. Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucoseglycine model. **Food Chemistry**, v. 78, n.3, p. 375-382, 2002.

WAMBURA, P.; VERGHESE, M. Effect of pulsed ultraviolet light on quality of sliced ham. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 2173-2179, 2011.

WANG, B.; MAHONEY, N. E.; PAN, Z.; KHIR, R.; WU, B.; MA, H.; ZHAO, L. Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B1 and B2 in rough rice and rice bran. **Food Control**, v. 59, p. 461-467, 2016.

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana Micologia**, v. 22, p. 194-202, 2005.

YU, M.C.; YUAN, J.M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, p. S72–S78, 2004.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos estudos desenvolvidos pode-se concluir que:

As tecnologias de UV-p e Plasma foram eficientes em reduzir *Aspergillus flavus* em solução aquosa e quando o fungo estava inoculado nas castanhas de caju e do Pará também foi constatada redução máxima de 4 ciclos log na concentração de *A. flavus*, mas em proporção menor que em solução aquosa devido a morfologia das castanhas.

No estudo com a AFB1 em solução aquosa as tecnologias de UV-p e Plasma degradaram a AFB1 a níveis de 95% e 84% respectivamente e produtos da degradação foram encontrados com auxílio do UPLC-Q-TOF MS. E a toxicidade da AFB1 após tratamento foi significativamente diminuída, demonstrando que o residual da degradação apresenta menor letalidade.

Ao realizar o estudo da AFB1 aplicada nas castanhas de caju e do Pará observou-se redução da micotoxina nas castanhas tratadas. E ao avaliar algumas características químicas das castanhas após tratamento, verificou-se redução dos compostos fenólicos, devido a provável ação dos radicais livres gerados pelo plasma. E a capacidade antioxidante e Acidez do óleo das castanhas não apresentaram alteração.

Portanto com base nestes relatos, as tecnologias de UV-p e plasma frio podem ser consideradas ferramentas promissoras na degradação de compostos indesejáveis como a AFB1 e na eliminação de microrganismos, sem causar grandes alteração em algumas características químicas do alimento.