

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LUCAS FERREIRA LOPES

**ISOTIOCIANATO DE ALILA COMO UM FUMIGANTE NATURAL PARA
PROTEGER GRÃOS DE SOJA E FEIJÃO PRETO CONTRA O CRESCIMENTO DE
ASPERGILLUS PARASITICUS E A PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS**

(Gaseous allyl isothiocyanate to protect soya and black beans against the growth of
Aspergillus parasiticus and aflatoxin production)

CURITIBA

2018

LUCAS FERREIRA LOPES

**ISOTIOCIANATO DE ALILA COMO UM FUMIGANTE NATURAL PARA
PROTEGER GRÃOS DE SOJA E FEIJÃO PRETO CONTRA O CRESCIMENTO DE
ASPERGILLUS PARASITICUS E A PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS**

(Gaseous allyl isothiocyanate to protect soya and black beans against the growth of
Aspergillus parasiticus and aflatoxin production)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, com a linha de pesquisa Antimicrobianos Naturais em Ração Animal da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Fernando Bittencourt
Luciano

CURITIBA

2018

**ATA Nº 0126 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIA ANIMAL DO ALUNO LUCAS FERREIRA LOPES**

Aos vinte e sete dias do mês de julho do ano de dois mil e dezoito, às 14 horas, realizou-se na sala de Pós 07, 2º andar, Bloco Amarelo, Escola de Ciências da Vida, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da dissertação do mestrando Lucas Ferreira Lopes, intitulada: **“ISOTIOCIANATO DE ALILA COMO UM FUMIGANTE NATURAL PARA PROTEGER GRÃOS DE SOJA E FEIJÃO PRETO CONTRA O CRESCIMENTO DE ASPERGILLUS PARASITICUS E A PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS”**. O mestrando concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Fernando Bittencourt Luciano (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Luciano Aparecido Panagio (UEL) e Keliani Bordin (PUCPR). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada aprovada.

Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano (Presidente)

Assinatura _____

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio (UEL)

Assinatura _____

Profa. Dra. Keliani Bordin (PUCPR)

Assinatura Keliani Bordin

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 27 de julho de 2018.

Caroline Nocera Bertton

Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Renata Ernlund Freitas de Macedo

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
ABREVIACÕES.....	viii
AGRADECIMENTOS	x
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	xii
RESUMO GERAL.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1. Dados estatísticos de produção e consumo.....	1
1.2. Problemática da contaminação fúngica e micotoxigênica em grãos estocados.....	2
1.3. Legislação brasileira e mundial associada a presença de micotoxinas nos alimentos.....	4
1.4. Métodos de inibição de crescimento fúngico e eliminação micotoxigenica	5
1.5. Justificativa.....	6
1.6. Objetivos	7
1.7. Hipóteses	7
REFERÊNCIAS	8
CAPÍTULO 2.....	12
ISOTIOCIANATO DE ALILA COMO UM FUMIGANTE NATURAL PARA PROTEGER GRÃOS DE SOJA E FEIJÃO CONTRA O CRESCIMENTO DE <i>ASPERGILLUS PARASITICUS</i> CECT 2681 E A PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS	12
<i>ABSTRACT</i>	13
<i>RESUMO</i>	14
1. Introdução	15
2. Material e Métodos	19
2.1. Material	19
2.2. Preparo do inóculo de <i>Aspergillus parasiticus</i>	19
2.3. Preparo dos jarros contento soja ou feijões para tratamento.....	20
2.4. Análise microbiológica	21
2.5. Extração de aflatoxinas.....	21
2.6. Quantificação de aflatoxinas	22
2.7. Determinação da umidade dos grãos	23
2.8. Análise estatística	23

3. Resultados e Discussão	24
3.1. Inibição do crescimento fúngico.....	24
3.2. Curva de Umidade	25
3.3. Determinação da concentração de aflatoxinas em soja e feijão contaminados com <i>A. parasiticus</i> CECT 2681	28
4. Conclusão.....	32
REFERÊNCIAS	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de aflatoxinas em amostras de soja e feijões submetidas a tratamentos com AITC gasoso em UR=85% durante 35 dias, resultados estão representados em médias \pm desvio padrão. Letras diferentes, na mesma linha, mostram diferença significativa ($P \leq 0,05$).....	31
--	----

Lista de Figuras

- Figura 1. Esquema do processo de fumigação. Feijões contaminados com *A. parasiticus* e placa de Petri contendo solução de KCl acima da base rígida. Papel filtro contendo diferentes concentrações de AITC adicionados a tampa interna dos jarros. O jarro foi hermeticamente fechado e a volatilização do AITC ocorreu em temperatura ambiente. Os jarros foram mantidos sob observação durante 35 dias..... 21
- Figura 2. População de *A. parasiticus* CECT 2681 em feijões e soja tratados com diferentes concentrações de AITC em UR=85% após 35 dias de tratamento. O limite de detecção do experimento foi de 1,05 log CFU g⁻¹. Os valores são representados em média ± desvio padrão (log UFC g⁻¹). Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos em feijões (P ≤ 0,05). Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos em soja (P ≤ 0,05)..... 25
- Figura 3. Umidade de feijão e soja mantidos a UR=85% durante 35 dias de estocagem..... 27
- Figura 4. Dias corridos após o início do experimento, para uma percepção a olho nu do crescimento fúngico em amostras de feijão preto e soja. Os resultados são apresentados em média ± desvio padrão. Letras diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos em ambas as matrizes (P≤0,05)..... 27

ABREVIATÓES

AITC: Isotiocianato de Alila

ITC: Isotiocianato

CECT: Coleção Espanhola de Culturas Tipo

HPLC-FLD: High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence Detector

LMT: Limite Máximo Tolerado

IARC: International Agency for Research on Cancer

AF: Aflatoxina

PDA: Ágar Batata Dextrose

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

HDL: High Density Lipoproteins

LDL: Low Density Lipoproteins

UR: Umidade Relativa

“Mas, sejam fortes e não desanimem, pois o trabalho de vocês será recompensado”

2 Crônicas 15:7

“Quando tiver que escolher entre estar certo e ser gentil, escolha ser gentil”

Dr. Wayne W. Dyer

AGRADECIMENTOS

Há uma semana o formato destes agradecimentos era outro, há uma semana a minha vida e de minha família foi estremecida com a notícia do falecimento de uma das pessoas mais maravilhosas que habitaram essa terra, um exemplo de mulher, que com meu avô, foram um exemplo de casa, ambos sempre de bem com a vida e dispostos a ajudar quem precisasse, sem motivo e sem esperar algo em troca. Você gerou aquele que me gerou, me viu nascer, viu meus primeiros passos, me recebia juntamente com meu pai, todos os dias, todas as manhãs, com o café na mesa e um sorriso no rosto. Vó, Leonídia Guimarães Lopes, você partiu cedo demais para ver mais essa conquista em minha vida, porém esteja onde estiver eu te agradeço e te dedico este texto, tenho certeza de que a senhora está muito orgulhosa de mim.

De origem latina, a palavra “Conquista”, significa obter por esforço com aprendizado. E quantas conquistas obtive desde que mergulhei de cabeça no mundo da pesquisa. Não foi fácil, alguns dias pareciam intermináveis e a vontade de desistir de tudo vinha à tona, por isso devo primeiramente agradecer a Deus por me ajudar a seguir em frente, para ele toda a honra, glória e agradecimentos pelo dom da vida, por me sustentar, me dar ânimo, por não desistir de mim, mas principalmente por fazer da minha vontade a sua vontade e tornar projetos antes impossíveis, na minha cabeça, possíveis.

Agradeço aos meus pais, Marcos e Lucimara, por todos os ensinamentos, valores passados, amor incondicional, mesmo quando eu não queria falar sobre meus problemas, obrigado por todo o sacrifício feito para que eu pudesse viver o que eu estou vivendo agora, obrigado por tornar os meus sonhos os seus sonhos.

Ao meu irmão, Matheus, familiares e amigos por todas as palavras de força quando o mundo parecia estar sobre meus ombros, obrigado por me tirarem de casa para me distrair, quando eu não tinha capacidade de interpretar mais nenhuma palavra lida.

Ao Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano, por todos os ensinamentos passados ao longo destes 5 anos, pela disposição em sempre me ajudar, pela alta exigência em meus trabalhos, o que me ajudou a crescer como pessoa e como profissional, por todas as oportunidades que me abriram os olhos para todo um novo

mundo que eu apenas podia imaginar, mas principalmente por acreditar em mim e por toda a confiança depositada. O senhor deixou de ser apenas um professor e se tornou um grande amigo para o qual desejo todo o sucesso.

A minha coordenadora Diana Fachin e demais professores da Graduação em Engenharia de Alimentos, por todos os ensinamentos passados, mas principalmente pela ajuda em diversas barreiras enfrentadas, pela compreensão, auxílio e ombro amigo durante todo esse tempo.

A Alberto, Anne, Gabriel, Gabriela, Karla, Keliani, Jéssica, Natan, Paloma e Tiago, por serem, além de parceiros de laboratório, grandes amigos pessoais com os quais aprendi muito, sempre dispostos a ajudar ou simplesmente estar ao meu lado quando as coisas estavam complicadas, obrigado por todas as risadas no laboratório e por tornarem este projeto mais fácil de ser executado.

Aos laboratoristas, professores, coordenadores e funcionários da PUCPR, principalmente aos que exercem suas funções na Usina Piloto e no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por todo o auxílio, paciência e conhecimento passado.

A PUCPR e o núcleo de pesquisa PIBIC pela concessão da bolsa PIBIC Master.

A banca de qualificação e defesa, pela presença e todas as críticas construtivas feitas para que possa melhorar e crescer cada vez mais.

A todos que presenciaram e participaram de forma direta ou indireta para a construção deste trabalho.

Obrigado!

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos. O *Capítulo 1* apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema e os objetivos de estudo. O *Capítulo 2* trata-se de artigo científico completo, contendo referências, e formatado nas normas da revista para o qual será submetido. O *Capítulo 3* finaliza esta dissertação com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

RESUMO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de soja, colhendo 114,9 milhões de toneladas deste grão na safra 2017. Além disso, o feijão é uma leguminosa de grande consumo no Brasil com uma produção de 3,3 milhões de toneladas na safra 2017. O clima tropical do Brasil é bastante favorável para o crescimento de fungos em grãos estocados e, conseqüentemente, micotoxinas são comumente encontradas neste tipo de produto, ocasionando um risco à saúde de humanos e animais. Desta maneira, o isotiocianato de alila (AITC), um composto volátil derivado da mostarda negra e marrom, foi utilizado para fumigar grãos de soja e feijão preto para evitar o crescimento de *Aspergillus parasiticus* produtor de aflatoxinas. Amostras contendo 50 g de soja ou feijão foram inoculadas com 10^4 esporos g^{-1} de *A. parasiticus* CECT 2681 e estocados em jarros de vidro herméticos. A umidade relativa de 85% foi controlada utilizando uma solução supersaturada de KCl, simulando a umidade em diversas localidades produtoras de soja no Brasil. As amostras foram tratadas com 0, 1, 5 ou 25 $\mu L L^{-1}$ de AITC e analisadas depois de 35 d. A contagem microbiana foi realizada através da homogeneização e diluição seriada das amostras em água de peptona 0,1%, seguido de semeadura em ágar batata dextrose acidificado (pH 3,5). As aflatoxinas foram extraídas, concentradas com colunas de imunoafinidade e quantificadas por HPLC-FLD. A umidade dos grãos também foi mensurada ao final do experimento. Os resultados demonstraram que uma redução de 2 e 4 log UFC g^{-1} de *A. parasiticus* em soja foi produzida pelo AITC em fase gasosa nas doses de 5 $\mu L L^{-1}$ e 25 $\mu L L^{-1}$, respectivamente. De maneira similar, reduções de 2 e 5 log UFC g^{-1} de *A. parasiticus* foi observada para os tratamentos de 5 $\mu L L^{-1}$ e 25 $\mu L L^{-1}$ em feijão. Além disso, a produção de aflatoxinas foi totalmente inibida com o tratamento de 25 $\mu L L^{-1}$ em ambos os grãos, enquanto uma inibição de ~90% foi observada a 5 $\mu L L^{-1}$. O AITC na dose de 1 $\mu L L^{-1}$ não inibiu o crescimento fúngico em soja e a produção de aflatoxinas em soja e feijão. A umidade dos grãos de soja aumentou de 14 para 18% e dos grãos de feijão de 14,5 para 19% durante a estocagem a UR=85% por 35 d, mostrando a necessidade de utilizar sistemas de ventilação mais eficientes como mais uma barreira contra a contaminação fúngica. Assim, a fumigação com AITC pode ser uma alternativa para inibir o crescimento de *A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas

durante a estocagem de feijão e soja. Uma vez que estes grãos são processados termicamente antes do consumo, o AITC é capaz de evaporar, em sua maioria, não impactando nas características sensoriais.

Palavras-chave: micotoxinas; conservante natural; estocagem; soja; feijão; fungos; fumigação

ABSTRACT

Soya beans have been widely planted as source of vegetable oil, biodiesel and as a major ingredient in foods and animal feed. Brazil is the second largest producer (114.9 million ton in the 2017 harvest) and the largest exporter of soy in the world. In addition, beans are the staple food in Brazil, with a production of 3.3 million tons in 2017. As tropical country, Brazil has a favorable climate for the growth of spoilage fungi in grains and, consequently, mycotoxins are commonly found in stored crops, which poses as a threat to the health of humans and animals. Therefore, allyl isothiocyanate, a natural volatile compound derived from brown and black mustard, was used to fumigate soy and beans and avoid the growth of aflatoxin-producer *Aspergillus parasiticus*. Samples containing 50 g of soy or black beans were inoculated with 10^4 spores g^{-1} of *A. parasiticus* CECT 2681 and stored in hermetic glass jars. The relative humidity was controlled using saturated solutions of KCl, which gives a RH of 85% simulating the average RH of fields in areas of Southern Brazil. Samples were treated with 0, 1, 5 or 25 $\mu L L^{-1}$ of gaseous AITC and analyzed after 35 d. Microbial counting was performed by homogenizing and serially diluting the samples in peptone water and plating in acidified (pH 3.5) potato dextrose agar. Aflatoxins were extracted, concentrated with immunoaffinity columns and quantified by HPLC-FLD. Humidity of the grains was also followed during the storage. Results have shown that a 2 and 4 log CFU g^{-1} reduction of *A. parasiticus* in soy was produced by gaseous AITC at 5 $\mu L L^{-1}$ and 25 $\mu L L^{-1}$, respectively. Similarly, 2 and 5 log CFU g^{-1} reduction of *A. parasiticus* was found in black beans treated with 5 $\mu L L^{-1}$ and 25 $\mu L L^{-1}$ of AITC. Moreover, aflatoxin production was totally inhibited by 25 $\mu L L^{-1}$ of AITC in both grains, whereas ~90% inhibition was found at 5 $\mu L L^{-1}$. Gaseous AITC at 1 $\mu L L^{-1}$ did not inhibit fungal growth in soy and aflatoxin production in soy and black beans. Humidity of soya beans increased from 14 to 18% and from 14.5 to 19% in black beans during storage. Therefore, fumigation of AITC may be an alternative to avoid the growth of *A. parasiticus* and aflatoxin production in stored black and soya beans. Since these beans are thermally processed before consumption, AITC will evaporate and may not impact their sensory characteristics.

Keywords: mycotoxins; natural antimicrobial; storage; soy; beans; fungi; fumigation

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Dados estatísticos de produção e consumo

O Brasil é o segundo maior produtor de soja (*Glycine max*) do mundo, com uma colheita total de 114,9 milhões de toneladas nas três safras do ano de 2017, que corresponderam a um plantio de 33,9 milhões de hectares. A expectativa para 2018, segundo o IBGE (2018), é que o investimento aplicado ao cultivo do grão aumente em 3% a área de plantio e conseqüentemente a safra. O feijão (*Phaseolus vulgaris*) também é um grão que aparece em destaque no mercado brasileiro, base da alimentação popular, rico em fibras, ferro e vitamina B9, além de ser considerado fonte de proteínas e ômega 3. Em 2017 os brasileiros consumiram 3,5 milhões de toneladas do grão, assim, o Brasil vem investindo para se tornar autossuficiente na produção do grão, sem a necessidade de importar de países como Argentina, China e México (CONAB, 2018). A produção em 2018 é estimada em 3,4 milhões de toneladas cultivadas em 3,1 milhões de hectares, 2,8% superior à safra anterior (IBGE, 2018).

Na ração animal o feijão triturado ou banda de feijão, oriundo do processamento, que não possui grande valor comercial para consumo humano, é grandemente utilizado na alimentação de vacas leiteiras durante a etapa de amamentação, compondo em até 20% a ração, principalmente pelo seu alto valor proteico, que varia de 22% a 26%. Na alimentação de suínos está presente em todas as fases de desenvolvimento, menos no período pré-inicial, podendo compor 5%, 20% e 25% das rações durante as fases iniciais, de recria e terminação, respectivamente. Nos períodos de gestação e lactação compõe entre 5% e 10% a alimentação dos suínos (Magalhães et al., 2008, Azevedo, 2007). Estudos realizados por Castro et. al (2014) mostraram uma viabilização na substituição de até 50% do farelo de milho e soja por triturado de feijão nas rações, sem alterar no ganho de peso de suínos.

Além do óleo, a soja vem ganhando mais presença na alimentação humana, não só para pessoas com restrições alimentares, como vegetarianos, mas também para quem está criando alternativas para diminuir o consumo da

proteína animal, seja pelo custo da carne, que aumentou em média 3,2% em 2017, ou pela opção de uma alimentação mais saudável, já que a soja é rica em proteínas, vitamina K, ferro, cálcio, isoflavonas, que contribuem para a manutenção do equilíbrio hormonal, além de auxiliarem na redução do colesterol ruim, LDL, e aumento do bom, HDL (Peixoto et al., 2011). Desde que o *Food and Drugs Administration* (FDA) e a ANVISA aprovaram a proteína de soja como alimento funcional, a soja passou a estar mais presente nas cozinhas com uma variedade de utilizações. A soja é um grão equilibrado em nutrientes, composta por 20% de gordura, 40% de proteína e 30% de carboidratos, que juntamente com o feijão, arroz, milho, trigo e demais grãos compõem em média 50% do total de calorias da ingestão diária da população mundial (Turek et al., 2013; Cunha et al., 2015).

Na alimentação animal, 2/3 de todo o farelo de soja é destinado a alimentação de aves e suínos. O terço restante compõe parte da dieta de bovinos e outros animais fora da linha de corte, como animais de companhia. Base da composição da ração, o farelo é oriundo da produção do óleo vegetal de soja, que é reprocessado com injeção de vapor e posteriormente seco para facilitar a digestão e eliminar possíveis contaminantes (Bellaver e Junior, 2015).

1.2. Problemática da contaminação fúngica e micotoxigenica em grãos estocados

As condições climáticas do Brasil, proporcionam um binômio temperatura-umidade apropriado para o desenvolvimento de fungos, os quais são contaminantes naturais dos grãos. Já no campo estes fungos são capazes de degradar os alimentos, provocando diversas alterações físicas e químicas, além de perdas econômicas nas lavouras de todo o mundo que chegaram a US\$ 1 trilhão em 2015 (Silva et al., 2015). A contaminação se agrava ainda mais devido as más condições de armazenamento dos grãos durante a estocagem em silos, que em sua maioria não possuem sistemas de exaustão adequados ou, quando possuem, não são acionados com frequência devido ao custo energético extra do produtor. Os grãos de soja e feijão são extremamente porosos, sendo assim, o mal acondicionamento pode fazer com que impurezas adentrem nos espaços intergranulares, diminuindo a porosidade do grão, dificultando ainda mais a aeração (Oliveira et al., 2010). Além disso, o não

incentivo de órgãos superiores e não bonificação pelo grão de alta qualidade também influencia diretamente em manter a situação estagnada por parte do produtor. Apesar disso, hoje já existem penalizações por parte dos compradores de grãos em relação a produtos com alto teor de umidade, onde o percentual de umidade acima do ideal é multiplicado por um fator de penalização que varia entre 1,5 e 2,0 e tal valor passa a ser descontado do valor acordado para o pagamento das sacas, contudo esta ação é meramente comercial e visando o lucro, visto que o comprador está pagando por água no lugar do grão, não possuindo nenhum interesse em penalizar e conscientizar pelos problemas que a alta umidade do grão pode trazer a saúde humana e animal (Astoreca et al., 2012; Azaiez et al., 2013).

Alguns destes fungos presentes nos grãos podem ser produtores de micotoxinas, metabólitos secundários que exercem efeitos tóxico variados em humanos e animais, dentre eles, mutagenicidade, teratogenicidade, carcinogenicidade e imunossupressão, além de redução de ganho de peso, necrose, fibrose e hemorragias em aves, suínos e bovinos (Fonseca, 2010). Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são produtores de micotoxinas como aflatoxinas, tricotecenos, ocratoxinas e fumonisinas, porém o número de micotoxinas descobertas está crescendo constantemente, assim como a rigorosidade das legislações que regulam os níveis máximos tolerados destas substâncias em alimentos e rações. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), aproximadamente 25% de todos os grãos do mundo estão contaminados com micotoxinas em níveis acima do permitido, levando à uma perda anual de 1 bilhão de toneladas de grãos e somente na América do Norte (FAO, 2004; Nazareth, 2016; Wagacha e Muthomi, 2008).

Segundo Nazareth et al. (2018) as micotoxinas são produzidas pelos fungos em condições específicas de temperatura e umidade, além do nível estresse em que este fungo está exposto, visto que a toxina surge como forma de defesa do microrganismo. Além disso a presença do fungo não necessariamente confirma a presença da micotoxina, assim como a não presença visual do fungo justificaria a ausência de micotoxinas.

Estas toxinas são em sua maioria termoresistentes, isto é, mesmo que submetidas a tratamentos rigorosos de temperatura, não sofrem alterações, portanto se um fungo micotoxigênico foi capaz de se desenvolver em um

alimento que posteriormente sofreu um tratamento térmico, apesar da destruição do fungo, suas toxinas apodem estar presentes sem grandes alterações. Em estudo realizado por Silva et al. (2002), em amostras de feijão foram detectadas aflatoxinas B₁ e G₁ em concentrações de 2,5 ppb e 2,0 ppb, após cozimento do grão a 116°C durante 30 minutos, ainda se detectou micotoxinas nas mesmas concentrações encontradas antes do tratamento térmico, mostrando a grande dificuldade da eliminação deste composto mesmo em altas temperaturas.

Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são de extrema importância, principalmente em países tropicais. Produzidas por fungos como *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*, estas micotoxinas podem ser classificadas nos grupos B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo que a aflatoxina B₁ é classificada como grupo 1A pela IARC, onde existe a comprovação da mutagenicidade, carcinogenicidade (composto com maior potencial carcinogênico conhecido até hoje), teratogenicidade e imunossupressão em humanos, além disso, animais como aves, suínos e bovinos, quando ingerem este metabólito, ainda sofrem com a redução do ganho de peso, necrose, fibrose e hemorragias, problemas nos rins e fígado além da alta taxa de mortalidade das crias, problemas que além de comprometer o bem estar animal, trazem perdas enormes ao produtor (Costa, 2009; Fonseca, 2010).

1.3. Legislação brasileira e mundial associada a presença de micotoxinas nos alimentos

No Brasil a legislação relacionada a limites aceitáveis de micotoxinas em alimentos é muito branda e incompleta, principalmente quando comparada as legislações de outros 100 países que possuem uma alta fiscalização em cima destes compostos. A legislação que rege esses limites hoje é a resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC N^o 7 de 18 de fevereiro de 2011. Infelizmente não existe um limite máximo tolerado (LMT) de aflatoxinas em soja e diversos outros grãos. Para o feijão, o valor da soma dos grupos B₁, B₂, G₁ e G₂ de aflatoxinas não deve ultrapassar os 5 µg kg⁻¹ para alimentação humana e 50 µg kg⁻¹ no geral em ração animal. Países do Mercosul, como Argentina e Uruguai, são mais rigorosos com relação ao LMT em soja, onde a quantidade de AFs não deve ser superior aos 30 µg kg⁻¹.

Estudos realizados anteriormente em 8 variedades de soja diferentes, mostraram que todas as amostras apresentavam algum nível de contaminação com AFB1, que variaram de 1,6 a 9,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Oliveira, 2010). Outro estudo realizado com amostras de feijão mostrou que de 89 amostras, 3,4% apresentavam contaminação com um ou mais tipos de aflatoxinas em nível médio de 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Savi et al., 2014).

1.4. Métodos de inibição de crescimento fúngico e eliminação micotoxigenica

Métodos para o controle de fungos e micotoxinas em grãos são normalmente preventivos, incluindo boas práticas de manejo na agricultura e secagem adequada dos grãos após a colheita. Muitos ácidos como o propiônico e benzoático são utilizados nos silos de armazenagem pós colheita, como um método químico bastante inciso no processo de controle fúngico. Tais ácidos são utilizados em concentrações de até 250 ppm, normalmente na forma sólida diretamente aplicada sobre os grãos, mantendo resíduos mesmo após processamento. O controle das micotoxinas não é diferente, uma vez que o fungo já se instalou no grão e começou a produzi-lá, tratamentos térmicos na faixa dos 100°C não são o suficiente para destruí-las. Sendo assim, são adicionados adsorventes de micotoxinas, como argila e carvão mineral na tentativa de controle. O problema é que assim como os ácidos de controle fúngico, estes adsorventes também são mantidos nos grãos e possivelmente serão consumidos pelos animais em suas rações, interferindo diretamente no ganho de peso e problemas de saúde. Recentemente há um grande interesse no uso de antimicrobianos naturais para o controle de patógenos em alimentos devido à sua aceitação e segurança para os consumidores. Os isotiocianatos (ITCs) são alguns dos antimicrobianos mais potentes originários de plantas, capazes de inibir o crescimento de leveduras, fungos filamentosos e bactérias. O grupo isotiocianato contém um carbono fortemente eletrofílico ($-\text{N}=\text{C}=\text{S}$), que possibilita a reação de ITCs com diversos compostos. Sua ação antifúngica se deve principalmente à sua alta lipofilicidade que permite reação com a membrana celular dos microrganismos, que quando danificadas tornam-se permeáveis, alterando principalmente a homeostase celular que leva a um derramamento do conteúdo intracelular do microrganismo. Assim, os ITCs são

bons candidatos para reagir com estas toxinas, formando estruturas que tem menor ou nenhuma toxicidade. (Meca et al., 2012; Azaiez et al., 2013; Manyes et al., 2014; Luciano et al., 2014).

O isotiocianato de alila (AITC) é o principal componente do óleo essencial de plantas da família *Brassicaceae*, como a mostarda marrom (*Brassica juncea*), sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia e cosmética pelas suas características sensoriais. O AITC é produzido quando a sinigrina, comportada em vacúolos na planta, é hidrolisada ao reagir com a enzima mirosinase. Tal reação acontece principalmente como um mecanismo de defesa da planta ao ser injuriada por algum inseto, patógeno microbiano ou moagem, que rompe os vacúolos de substrato, fazendo com que a reação ocorra. O AITC é um composto volátil, o que facilita sua eliminação após sua ação no combate a fungos. Seu resíduo pode provocar uma leve irritação, principalmente nos olhos, por sua alta pungência. Além de ter sido considerado um dos mais potentes antimicrobianos de origem natural, o AITC é classificado como seguro pelo FDA, sem riscos para o consumo humano, com ação angiogênica, anti-inflamatória, neuroprotetora e anticarcinogênica (Quiles et al., 2015; Hontanaya et al., 2015). Saladino et al. (2016), utilizou a farinha de mostarda oriental hidratada para a produção do AITC e redução de aflatoxinas em piadina italiana (tipo de pão não fermentado), conseguindo uma redução acima de 70% das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. Outro estudo feito por Hontanaya et al. (2015) utilizando o mesmo princípio com a farinha de mostarda, aplicou o AITC em sementes oleaginosas como amendoim e nozes, sendo capaz de inibir totalmente o crescimento de *Aspergillus parasiticus* e a produção das aflatoxinas. Apesar de ser um óleo essencial natural, o AITC já é produzido de forma sintética, viabilizando e facilitando sua comercialização em alta escala, atualmente 1L do produto de alta qualidade possui o custo de US\$ 9,00, valor muito diferente do que seria encontrado caso fosse um produto obtido exclusivamente de fontes naturais, abrindo possibilidades para aplicação industrial em larga escala.

1.5. Justificativa

sistema precário de estocagem de grãos vem se tornando um fator que compromete a segurança alimentar e agrava a contaminação de alimentos

destinados a alimentação humana e animal pelo favorecimento do desenvolvimento fúngico e conseqüentemente micotoxigenico. A legislação falha e incompleta também contribui para expansão do problema, já que a falta de fiscalização expõe brechas para situações de riscos. Associado a isso, a busca por uma alimentação livre de conservantes químicos, como sais ácidos para o controle fúngico e adsorventes de micotoxinas, abre portas para os óleos essenciais naturais agirem como substitutos na proteção destes grãos, visando além de fatores naturais, uma menor dose de utilização de conservantes que gera redução de custos para o produto.

1.6. Objetivos

Reduzir ou eliminar a população de *Aspergillus parasiticus* e suas aflatoxinas, em grãos de soja e feijão, armazenados in vitro sob condições de umidade relativa (UR) próxima a 85% durante 35 dias, com o auxílio de diferentes doses do óleo essencial natural isotiocianato de alila.

Determinar a menor dose de AITC capaz de eliminar os esporos de *Aspergillus parasiticus* e inibir a produção de aflatoxinas.

1.7. Hipóteses

H1: O AITC é capaz de reduzir ou eliminar o *Aspergillus parasiticus* e suas aflatoxinas em grãos de soja e feijões estocados em condições de armazenamento com UR = 85%.

REFERÊNCIAS

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre os limites máximos tolerados (LMT) para alimentos em micotoxinas em alimentos – Resolução N°7, de 18 de fevereiro de 2011.

Astorteca A, Vaamonde G, Dalcero A, Ramos AJ, Marín S. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus favus* from corn. International Journal of Food Microbiology. 2012; 156: 60-67.

Azaiez I, Meca G, Manyes L, Luciano FB, Fernández-Frazón M. Study of the chemical reduction of the fumonisins toxicity using allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in model solution and in food oriducts. Toxicon. 2013; 63: 137-146

Azevedo RL, Ribeiro GT, Azevedo CLL. Feijão Guandu: uma planta multiuso. Revista da Fapese. 2007; 3(2): 81-86.

Bellaver C, Júnior PNS. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. EMBRAPA. 2015.

CONAB. Análise mensal da produção de feijão. 2018; 1-6.

Costa AKF. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). Revista de Ciências Agrômicas. 2009; 40 (3): 455-460.

Cunha DS, Viana JS, Silva WM, Silva JM. Soja para o consumo humano: breve abordagem. Agrarian Academy. 2015; 2(3): 101-113.

FAO. Food Agriculture Organization United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins for 2003. FAO Food and Nutrition Paper. 2004; 0254-4725.

Fonseca H. Efeitos e sintomas da aflatoxina em animais e no homem. ESALQ USP. 2010.

Hontanaya C et al. Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. Food Control. 2015; 47: 154-160.

IBGE. Levantamento sistemático de produção agrícola. 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.htm>>. Acesso em 15 de maio de 2018.

Castro FG, Gorni M, Barbosa HP, Mendes AA, Campos BES, Moura MP. Grão de feijão cru em substituição à mistura de milho e farelo de soja para suínos em crescimento e terminação. Boletim de Indústria Animal. 2014; 41: 103-110.

Luciano FB, Meca G, Manyes L, Mañes, J. A chemical approach for the reduction of beauvericin in a solution model and in food systems. Food and Chemical Toxicology. 2014; 64: 270-274.

Magalhães ALR, Zorzi K, Queiroz AC, Mello R, Detnabb E, Pereira JC. Resíduo proveniente do beneficiamento do feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) em rações para vacas em lactação: consumo, digestibilidade, produção e composição do leite e eficiência de alimentação. Revista Brasileira de Zootecnia. 2008; 37(3): 529-537.

Manyes L, Ruiz MJ, Luciano FB, Meca G. Bioaccessibility and bioavailability of fumonisin B2 and its reaction products with isothiocyanates through a simulated gastrointestinal digestion system. Food Control. 2014; 37: 326-335.

Meca G, Luciano FB, Zhou T, Tsao R, Mañes J. Chemical reduction of the mycotoxin beauvericin using allyl isothiocyanate. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 1755-1762.

Nazareth TM, Bordin K, Manyes L, Meca L, Mañes J, Luciano FB. Gaseous allyl isothiocyanate to inhibit the production of aflatoxins, beauvericin and enniatins by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium poae* in wheat flour. *Food Control*. 2016; 62: 317-321.

Nazareth TM, Corrêa JA, Pinto ACSM, Palma JB, Meca G, Bordin K, Luciano FB. Evaluation of gaseous allyl isothiocyanate against the growth of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production in corns stored for 6 months. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018; 20: 35-42.

Oliveira MA, Lorini I, Mallmann C.A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. *Brazilian Journal of food technology*. 2010: 87-91.

Peixoto JC, Feijó AP, Santana AB. Benefícios da soja no controle da obesidade. *Revista eletrônica novo enfoque*. 2011; 12(12): 47-67.

Quiles JM et al. Influence of the antimicrobial compound allyl isothiocyanate against the *Aspergillus parasiticus* growth and its aflatoxins production in pizza crust. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 83: 222-228.

Saladino F, Bordin K, Manyes L, Luciano FB, Mañes J, Fernández-Franzón M, Reduction of the aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in Italian piadina by isothiocyanates. *Food Science Technology*. 2016; 70: 302–308.

Savi GD, Piacentini KC, Kreibich HH, Valmorbida R, Stein SM, Santos K, Martins C, Cugniers J, Scussel VM. Ocorrência de micotoxinas em grãos de

feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) comercializados no sul do Brasil. ABRAPOS. 2014: 445-450.

Silva ML, Sugayama R, Range LE, Ribeiro RC. Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas. 2015.

Tureck C, Correa VGG, Peralta RM, EA Koehnlein. Estimativa do consumo de vitaminas e minerais antioxidantes da dieta brasileira. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 2013; 33(3): 30-38.

Wagasha, JM, Muthomi JW. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 124: 1-12.

CAPÍTULO 2

ISOTIOCIANATO DE ALILA COMO UM FUMIGANTE NATURAL PARA PROTEGER GRÃOS DE SOJA E FEIJÃO CONTRA O CRESCIMENTO DE *ASPERGILLUS PARASITICUS* CECT 2681 E A PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS

Lucas Ferreira Lopes¹, Vitor Rampazzo Favoretto², Keliani Bordin¹,
Claudemir Zucareli², Fernando Bittencourt Luciano^{1*}

Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Rua Imaculada Conceição 1555, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brasil

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

² Departamento de Agricultura, Universidade estadual de Londrina, Londrina, Brasil

*Autor correspondente

Fernando Bittencourt Luciano
Escola de Ciências da Vida
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Rua Imaculada Conceição 1155
80215-901, Curitiba, PR
Brasil
e-mail: fernando.luciano@pucor.br
Telefone: +55 41 3271-2615

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficacy of gaseous AITC to inhibit growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxins production in soy and beans stored at RH 85% during 35 d. Samples containing 50 g of soy or black beans were inoculated with 10^4 spores g^{-1} of *A. parasiticus* CECT 2681 were treated with 0, 1, 5 or 25 $\mu L L^{-1}$ of gaseous AITC in hermetic glass jars. Microbial counting was performed by plating samples in potato dextrose agar after 35 d. Aflatoxins were extracted, concentrated with immunoaffinity columns and quantified by HPLC-FLD. Humidity of the grains was also followed during the storage. Results have shown that 2 and 4 log CFU g^{-1} reduction of *A. parasiticus* in soy was produced by 5 $\mu L L^{-1}$ and 25 $\mu L L^{-1}$ gaseous AITC, respectively. Similarly, 2 and 5 log CFU g^{-1} reduction of *A. parasiticus* was found in black beans treated with 5 $\mu L L^{-1}$ and 25 $\mu L L^{-1}$ of AITC. Moreover, aflatoxin production was totally inhibited by 25 $\mu L L^{-1}$ of AITC in both crops, whereas ~90% inhibition was found at 5 $\mu L L^{-1}$. Gaseous AITC at 1 $\mu L L^{-1}$ did not inhibit fungal growth in soy and aflatoxin production in soy and black beans. Humidity of soy beans increased from 14 to 18% and from 14.5 to 19% in black beans during storage. Therefore, fumigation of AITC may be an alternative to avoid the growth of *A. parasiticus* in stored soy and black beans.

Keywords

Mycotoxins; natural antimicrobial; storage; soy; black beans; fungal spoilage

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do AITC gasoso na inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus* e produção de suas aflatoxinas em grãos de soja e feijão estocados a UR 85% durante 35 d. Amostras contendo 50 g de soja ou feijões pretos foram inoculadas com 10^4 esporos g^{-1} de *A. parasiticus* CECT 2681 e tratadas com 0, 1, 5 or 25 $\mu L L^{-1}$ de AITC gasoso em jarros de vidro herméticos. A contagem microbiana foi feita através do plaqueamento das amostras em ágar batata dextrose após 35 d. As aflatoxinas foram extraídas, concentradas com colunas de imunoafinidade e quantificadas em HPLC-FLD. A umidade dos grãos também foi monitorada durante o período de estocagem. Os resultados mostraram uma redução de 2 e 4 log UFC g^{-1} de *A. parasiticus* em soja tratada com concentrações de 5 $\mu L L^{-1}$ e 25 $\mu L L^{-1}$ de AITC gasoso, respectivamente. Similarmente, uma redução de 2 e 5 log UFC g^{-1} de *A. parasiticus* foi encontrada em grãos de feijões preto tratados com 5 $\mu L L^{-1}$ e 25 $\mu L L^{-1}$ de AITC. Além disso, a produção de aflatoxinas foi completamente inibida pela concentração de 25 $\mu L L^{-1}$ de AITC em ambos os grãos, enquanto que uma inibição de ~90% foi encontrada em tratamentos de 5 $\mu L L^{-1}$. Concentrações de 1 $\mu L L^{-1}$ de AITC gasoso não foram capazes de inibir o crescimento fúngico em soja e a produção de aflatoxinas tanto na soja quanto no feijão. A umidade dos grãos de soja aumentou de 14 para 18% e passou 14,5 para 19% nos feijões durante o período de estocagem a UR 85%. Sendo assim, a fumigação com o AITC pode ser uma alternativa para reduzir o crescimento do *A. parasiticus* em grãos de soja e feijão durante o período de estocagem.

Keywords

Micotoxinas; antimicrobiano natural; estocagem; soja; feijão preto; deterioração fúngica.

1. Introdução

Com uma colheita de 114,9 milhões de toneladas de soja em 2017, o Brasil se destaca como segundo maior produtor do grão em todo o mundo, atrás apenas para os Estados Unidos. Dentro da realidade brasileira, o Paraná possui grande destaque, com 16% de todo o cultivo nacional, 10% a menos do que o primeiro colocado, Mato Grosso (IBGE, 2018). Matéria prima do principal óleo vegetal consumido no país, a soja vem ganhando espaço na alimentação dos brasileiros pela alta complexidade nutricional, principalmente em questão proteica, pois é composta de em média 40% de proteínas. É uma boa alternativa na substituição da proteína animal, seja pelo preço que sofre aumento considerável no mercado todos os anos ou pela simples opção da substituição do consumo de carne (Turek, 2013; Cunha, 2015). Na alimentação animal o farelo de soja se faz presente na maioria das composições utilizadas em animais de produção, sendo que 2/3 de todo o farelo de soja é destinado a alimentação de aves e suínos e o terço restante compõe parte da dieta de bovinos e outros animais. Base da composição da ração, o farelo é oriundo da produção do óleo vegetal de soja, que é reprocessado com injeção de vapor e posteriormente seco para eliminar possíveis contaminantes e agentes antinutricionais, inibidores de tripsina, que são responsáveis pela inadequada utilização da proteína no durante o processo de digestão dos animais. Contudo, sabe-se que este simples tratamento térmico pode não ser o suficiente para garantir a integridade e qualidade do farelo, o que traz sérias complicações para os animais que possuem a soja em sua dieta diária (Bellaver, 2015).

O feijão, grão rico em proteínas, ferro e ômega 3, é base da alimentação popular brasileira. Na alimentação animal compõe em média 20%

das rações de vacas leiteiras e suínos em diversas fases de desenvolvimento, O grão possui uma produção notável no Brasil, 3 milhões de toneladas em 2017, valor que ainda precisa crescer para deixar de depender de importação de países como Argentina, China e México, já que o consumo do grão por parte dos brasileiros é de 3,5 milhões de toneladas por ano (Magalhães et al., 2008; Azevedo et al., 2007; IBGE, 2018; CONAB, 2018).

A precariedade no sistema de armazenamento de ambos os grãos, que ocorre em silos sem sistema de ventilação e controle de umidade adequada, associado ao clima tropical brasileiro, proporcionam o ambiente perfeito para fungos se desenvolverem. Estes fungos são contaminantes naturais dos grãos mesmo antes da colheita, presentes abundantemente no solo e ar, gerando perdas econômicas nas lavouras de todo o mundo, que chegaram a US\$ 1 trilhão em 2014 (Oliveira e Mallman, 2010; Astorteca et al., 2012; Silva, 2015; Azaiez et al., 2013). O problema se agrava quando alguns destes fungos contaminantes são produtores de micotoxinas, metabólitos secundários que exercem efeitos tóxico variados em humanos e animais. Estes compostos causam mutagenicidade, teratogenicidade, carcinogenicidade e imunossupressão, além da redução de ganho de peso, necrose, fibrose e hemorragias em aves, suínos e bovinos (Fonseca, 2010). Dentre os fungos micotoxigênicos, o *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius* são os principais produtores de aflatoxinas (AFs), que estão divididas em quatro subclasses, B₁, B₂, G₁ e G₂. A AFB₁ é a mais abundante e mais tóxica, sendo a substância com maior potencial carcinogênico conhecido, classificada como grupo 1A pela IARC (*International Agency For Research On*

Cancer), grupo onde existe a comprovação do efeito mutagênico e carcinogênico em humanos (Costa et al., 2009).

No Brasil, a legislação que rege os limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos é a resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 e ainda não foi determinado um valor máximo de aflatoxinas em soja e diversos outros grãos. Para o feijão, o valor da soma dos grupos de aflatoxinas não deve ultrapassar os 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para alimentação humana e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no geral em ração animal. Outros países do Mercosul, estabelecem que a quantidade de AFs em soja não deve ser superior aos 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

O AITC é o principal componente do óleo essencial de mostarda marrom. É um composto volátil, o que facilita sua ação e eliminação, e tem sido considerado um dos mais potentes antimicrobianos de origem natural. Além disso é considerado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como um componente seguro e sem riscos para o consumo humano. Diferente do que é encontrado atualmente no campo, químicos para fumigação utilizados sem grande controle, o AITC provém de fontes naturais, podendo ser utilizado sem causar danos à saúde do produtor e do consumidor, sejam eles humanos ou animais. Sua vantagem quando comparado a demais óleos essenciais no combate aos fungos é a possibilidade de produção sintética em larga escala do óleo, barateando seu custo final para o produto. (Quiles et al., 2015; Hontanaya et al., 2015).

Existem diversas teorias relacionando a reação do AITC com os microrganismos até a sua morte, porém em sua maioria tal eliminação se deve a alta atração lipofílica do óleo que possibilita sua reação com a membrana

celular dos microrganismos, danificando-a e tornando-a mais permeável, gerando assim um desequilíbrio no pH que leva ao derramamento do conteúdo intracelular. O grupo isotiocianato contém um carbono fortemente eletrofílico que possibilita a reação de ITCs diretamente com micotoxinas que possuem um grupo amínico ou hidroxila livre e facilmente disponível para reação (Meca et al., 2012; Azaiez et al., 2013; Manyez et al., 2014; Luciano et al., 2014).

Visto a necessidade de substituir compostos antifúngicos sintéticos e outros químicos utilizados nos processos de fumigação, o presente estudo possui como objetivo reduzir ou eliminar a população de *Aspergillus parasiticus* e suas aflatoxinas, em grãos de soja e feijão, armazenados in vitro sob condições de umidade relativa (UR) próxima a 85%, simulando condições de armazenagem, durante 35 dias, com o auxílio de diferentes doses do óleo essencial natural isotiocianato de alila Além disso, a umidade no grão será monitorada afim de obter-se uma curva para associá-la com o desenvolvimento fúngico.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Aflatoxinas B1, B2, isotiocianato de alila (AITC), acetonitrila, metanol, cloreto de potássio, cloreto de sódio, ácido tartárico por Sigma Aldrich (St. Louis, USA), água ultrapura (<18 MΩ.cm resistivity) obtida através *Milli-Q water purification system* (Millipore, Bedford, MA, USA). A cepa de *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 foi cedida pela Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valência, Espanha). Água peptonada, ágar batata dextrose (PDA) e caldo tripton de soja (TSB) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.2. Preparo do inóculo de *Aspergillus parasiticus*

A cepa de *Aspergillus parasiticus* CECT 2681, produtora de aflatoxinas, encontrava-se congelada a uma temperatura de -80°C. A mesma foi suspendida, após o total descongelamento em temperatura ambiente, em caldo TSB e incubada por 48 horas a uma temperatura de 25°C. Após este período, inoculou-se 200 µL da solução fúngica em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA) acidificadas (pH 3,5) com solução de ácido tartárico 10%, para inibir o crescimento de outros microrganismos. As placas foram incubadas por 7 dias, ou até a observação da formação de esporos, a 25°C.

Após o tempo de incubação, as placas de Petri foram cobertas com 5 mL de solução de NaCl 0,9% estéril. Agitou-se as placas para que a solução salina pudesse colher o maior número possível de esporos e por fim depositou-se o sobrenadante em um tubo Falcon estéril de 15 mL. Para a contagem dos esporos, 100 µL do sobrenadante foi transferido para uma câmara de Neubauer espelhada (Blaubrand 7186 05; Wertheim, Germany), onde foi feita a

contagem de esporos, em duplicata, por microscopia óptica com lente de aumento 40X (Nikon E200 POL's, New York, USA). A solução de esporos foi diluída, também em solução salina, até obter-se uma concentração final de 10^6 esporos mL^{-1} .

2.3. Preparo dos jarros contento soja ou feijões para tratamento

A soja e os feijões foram porcionados em amostras de 50 g, contaminadas com *A. parasiticus* em uma concentração final de 10^4 esporos g^{-1} . As amostras contaminadas foram adicionadas sobre uma base rígida e transferidas para jarros de 830 mL. Além disso, placas de Petri de 50 mm contendo 15 mL de solução supersaturada de KCl foram adicionadas sobre a base a fim de gerar umidade relativa de aproximadamente 85% no interior dos jarros, simulando um ambiente extrapolado de mal acondicionamento de grãos em silos no período de pré-processamento (Figura 1). Por fim, filtros de 2,5 x 2,5 cm contendo concentrações capazes de gerar 0, 1, 5 ou 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ de AITC gasoso foram preparados e adicionados no parte interna das tampas dos jarros. Amostras do grupo controle foram preparadas sem AITC. Os jarros foram hermeticamente fechados para fumigação das amostras, e deixados a temperatura ambiente de aproximadamente 20°C durante 35 dias. Cada um dos tratamentos mais o grupo controle foram preparados em triplicata ($n=3$). (Lopes et al., 2017)



Figura 1 - Esquema do processo de fumigação. Feijões contaminados com *A. parasiticus* e placa de Petri contendo solução de KCl acima da base rígida. Papel filtro contendo diferentes concentrações de AITC adicionados a tampa interna dos jarros. O jarro foi hermeticamente fechado e a volatilização do AITC ocorreu em temperatura ambiente. Os jarros foram mantidos sob observação durante 35 dias.

2.4. Análise microbiológica

Após 35 dias de observação, adicionou-se 25 g de amostras de feijão ou soja a 225 mL de solução de NaCl 0,9% estéril dentro de sacos de homogeneização, homogeneizou-se em *stomacher* por 1 minuto e então fez-se a diluição seriada até 10^{-5} , também em solução salina estéril. Inoculou-se 100 μ L de cada uma das diluições em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA) acidificado com ácido tartárico 10% (pH 3,5). As placas foram incubadas a 25°C por até 7 dias para a contagem de colônias. Cada uma das diluições foi executada em triplicata nas placas obtendo assim um $n=9$, os resultados foram apresentados em log UFC g^{-1} . (Lopes et al., 2017)

2.5. Extração de aflatoxinas

Amostras de 5 g de feijões ou soja, trituradas, foram pesadas e adicionadas juntamente com 1 g de cloreto de sódio e 15 mL de metanol:água (80:20, v/v) em tubos falcon de 50 mL. Os tubos foram homogeneizados em

ultraturrax (Tecnal, Piracicaba, Brasil) durante 3 minutos e a mistura foi filtrada (Whatman N° 1 filter) e diluída cinco vezes com água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O extrato foi filtrado novamente (Whatman N° 1 filter) e 15 mL foram adicionados em colunas de imunoafinidade *aflatest* (Vicam, Watertown, MA). As colunas foram lavadas com 20 mL de água Milli-Q e as aflatoxinas foram eluídas com 1 mL de metanol. Este concentrado foi seco em fluxo de ar (Tecnal, Piracicaba, Brasil). Por fim as aflatoxinas foram derivatizadas adicionando 200 µL de n-hexano e 200 µL de ácido trifluoroacético (TFA). Na derivatização a amostra foi mantida a 40°C durante 10 minutos, seguida por secagem em fluxo de ar e ressuspensão em 1 mL de metanol:água (50:50 v/v).

2.6. Quantificação de aflatoxinas

Após purificação das amostras com coluna de imunoafinidade, injetou-se 20 µL de amostra em HPLC (1220 infinity, Agilent, Santa Clara, USA) com detector de fluorescência (1260 infinity, Agilent). Uma coluna C18 (Phenomenex, Torrance, USA) 4,6 x 150 mm, com um tamanho de partícula de 3 µm foi utilizada como fase estacionária. A fase móvel isocrática foi composta por água/metanol/acetonitrila (60:20:20, v/v/v) com um fluxo de 0,8 mL min⁻¹. O detector de fluorescência foi ajustado a 366 nm de excitação e 428 nm de emissão.

A calibração das curvas foi determinada injetando padrões de aflatoxinas em diferentes concentrações (1 µg L⁻¹ a 10.000 µg L⁻¹), relacionando a área do pico com a quantidade de micotoxinas. Matrizes de soja e feijão também foram inoculadas com concentrações conhecidas (10, 100 e 500 µg L⁻¹) de AFB₁, AFB₂, purificadas com colunas de imunoafinidade, e injetadas nas mesmas

condições descritas acima, afim de observar o efeito matriz dos grãos sobre as micotoxinas, visto que a soja possui um alto teor lipídico e o feijão preto uma pigmentação que podem interferir diretamente nos resultados quantitativos. Os resultados observados serviram para obter dados relacionados a porcentagem de recuperação do método assim como mudanças no tempo de retenção das mesmas.

2.7. Determinação da umidade dos grãos

Amostras de 25 g de soja ou feijões foram inseridas dentro de jarros de vidro herméticos de 830 mL com placas de Petri contendo 15 mL de solução salina saturada de KCl, para simular a umidade ambiente de 85%, assim como no teste de crescimento fúngico a produção de aflatoxinas. Os jarros foram hermeticamente fechados e as umidades foram avaliadas nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35. Os jarros correspondentes a cada dia foram abertos e as amostras foram pesadas em cadinhos de porcelana, e colocadas em estufa à 105°C por 24 horas (AOAC, 1995), posteriormente as amostras foram pesadas novamente para obtenção da nova umidade. Os testes foram realizados em triplicata (n=3) em cada um dos dias.

2.8. Análise estatística

O software Graphpad Prism version 6.0 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA) foi utilizado para a análise estatística dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a diferença entre os grupos amostrais foi realizado utilizando o teste one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância considerado foi de 5% ($P \leq 0.05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Inibição do crescimento fúngico

A Figura 2 representa a população fúngica após os 35 dias de tratamento. Foi possível observar uma redução de 2 e 4 log UFC g⁻¹ de *A. parasiticus* nas amostras de soja tratadas com 5 e 25 µL L⁻¹ de AITC volátil, respectivamente. Os resultados obtidos nas amostras de feijão foram semelhantes, havendo uma redução de 2 log UFC g⁻¹ para tratamentos com 1 e 5 µL L⁻¹ de AITC e 5 log UFC g⁻¹ para o tratamento com 25 µL L⁻¹ de AITC volátil. As amostras de soja tratadas com 1 µL L⁻¹ de AITC não apresentaram uma redução do crescimento fúngico e, portanto, não foram estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$) do grupo controle, onde houve um aumento de ~1,5 logs em relação a população inicial após os 35 dias de observação.

Tais valores encontrados são extremamente relevantes e capazes de mostrar a eficiência do AITC em doses muito baixas. Apesar de 25 µL L⁻¹ ter sido a maior dose utilizada ainda está muito longe do limite máximo de 500 ppm, permitido pela ANVISA de compostos químicos para tratamento fúngico. Ambas as matrizes se comportaram de forma muito parecida na redução das colônias de *A. parasiticus* apesar do tratamento com 1 µL L⁻¹ não ter apresentado grande efeito em amostras de soja, os demais tratamentos foram radicais na redução de colônias.

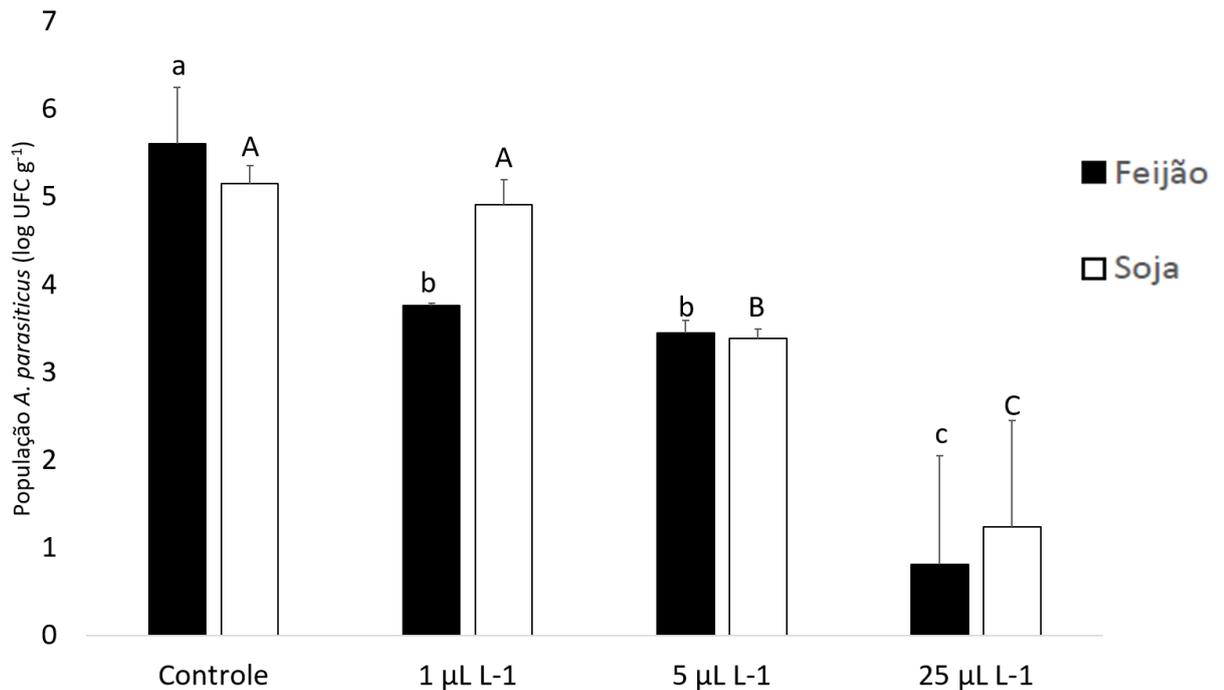


Figura 2 - População de *A. parasiticus* CECT 2681 em feijões e soja tratados com diferentes concentrações de AITC em UR=85% após 35 dias de tratamento. O limite de detecção do experimento foi de 1,05 log CFU g⁻¹. Os valores são representados em média ± desvio padrão (log UFC g⁻¹). Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos em feijões ($P \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos em soja ($P \leq 0,05$).

3.2. Curva de Umidade

É possível relacionar o fator crescimento fúngico com a umidade dos grãos conforme demonstrado na Figura 3, a umidade dos grãos de soja passou de um valor inicial de 14%, valor normalmente encontrado em um grão pós colheita, para 18%. Os grãos de feijão apresentaram um aumento de 14,5% para 19% de umidade após os 35 dias de em ambiente simulado de UR=85%. Este aumento de umidade é comum de ser encontrado em locais onde os grãos são acondicionados no interior de silos que não possuem exaustão ou que não possuem uma rotina de ativação de tal sistema. A umidade gerada no

interior destes equipamentos além de ideal para o desenvolvimento fúngico e micotoxinas, que são produzidas sob condições específicas de temperatura e umidade, geram perdas econômicas consideráveis para o produtor. Cada ponto percentual acima da umidade ideal é multiplicado por um valor de correção que varia entre 1,5% e 2% e esta porcentagem final obtida, juntamente com outros fatores como quantidade de impurezas e demais condições físico químicas dos grãos, é descontada no montante final que o produtor irá receber pela mercadoria (EMBRAPA, 2016). Apesar desta penalização ser meramente pensada por questões econômicas, já que o comprador estaria pagando por água no lugar do grão, é o início para uma forma de conscientização e possível penalização para o produtor. Contudo formas de bonificação devem ser pensadas, para que a melhoria nas práticas de manejo na lavoura sejam incentivadas e a tecnificação avance para reduzir a perda de alimentos, que é um grave problema mundial.

É possível ainda comparar a curva de umidade obtida com a Figura 4, que representa os dias corridos após o início do tratamento para que o primeiro sinal de aparecimento fúngico fosse observado a olho nu. Nas amostras de feijão o aparecimento do fungo foi em média 3 dias mais rápido quando comparado com a soja, isso porque logo na primeira semana o feijão já absorveu umidade suficiente para entrar em equilíbrio com o ambiente, tal absorção pode estar relacionada a sua grande porosidade e baixo teor de lipídios, quando comparamos suas características com grãos de soja. A umidade que chegou no percentual acima de 18% após 7 dias, foi determinante para o aparecimento rápido das colônias fúngicas, enquanto que nas amostras de soja tal equilíbrio foi mais gradual e o fungo demorou mais para se

desenvolver e chegar em uma população onde a sua observação fosse possível. Com aproximadamente 12 dias a umidade do grão de soja chegou a casa dos 17 pontos percentuais, onde as primeiras colônias começaram a ser observadas. Novamente reforçando o ponto da importância de se utilizar o controle da umidade como uma barreira física contra os microrganismos, pois certamente se os grãos fossem armazenados em sua umidade inicial, os fungos teriam muito mais dificuldade para se desenvolver. Umidade controlada e associada a utilização do AITC, podem ser suficientes para a inibição completa do *A. parasiticus* e produção de aflatoxinas.

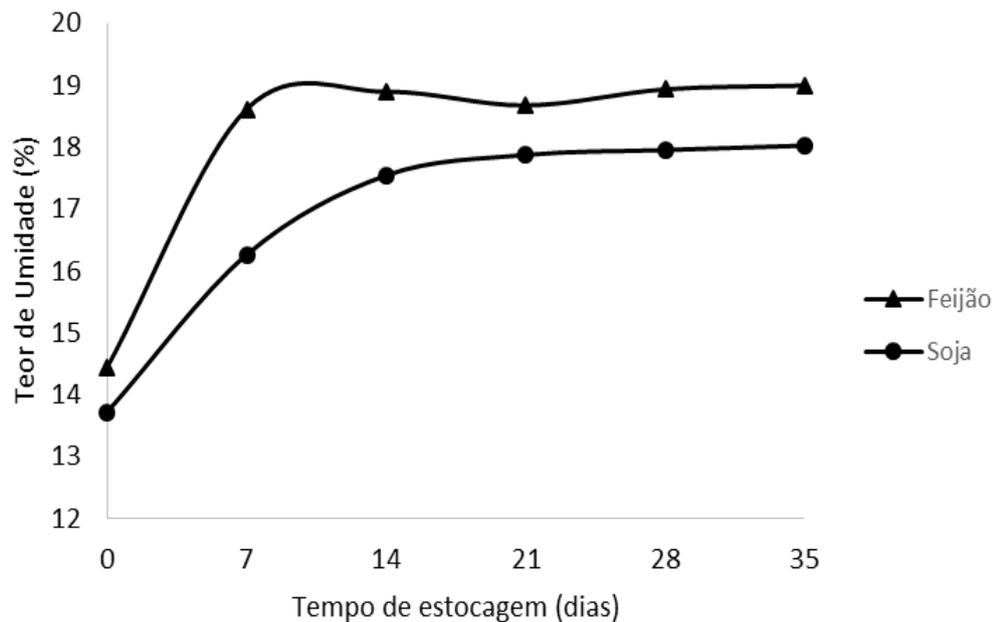


Figura 3 - Umidade de feijão e soja mantidos a UR=85% durante 35 dias de estocagem.

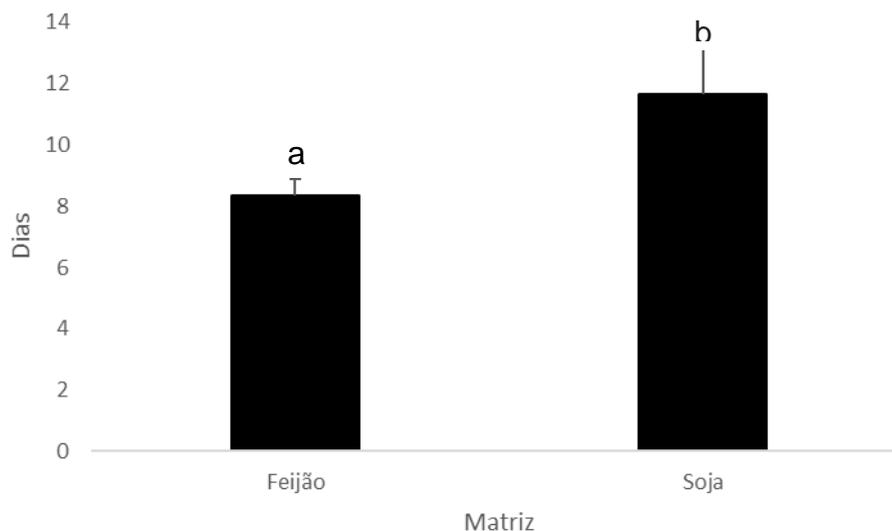


Figura 4 – Dias corridos após o início do experimento, para uma percepção a olho nu do crescimento fúngico em amostras de feijão preto e soja. Os resultados são apresentados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos em ambas as matrizes ($P \leq 0,05$).

3.3. Determinação da concentração de aflatoxinas em soja e feijão contaminados com *A. parasiticus* CECT 2681

Antes do início da quantificação das aflatoxinas das amostras, foram determinadas retas padrões, assim como valores de recuperação e efeito matriz. Para amostras de feijão houve uma recuperação média de 87,76% do padrão de aflatoxina B₁ e 84,15% de aflatoxina B₂, que geraram um efeito matriz de 90,56% e 86,58%, para cada aflatoxina, respectivamente. Nas amostras de soja a recuperação foi de 84,96% e 85,76% para AFB₁ e AFB₂, respectivamente, valor menor do que o recuperado em amostras de feijões. Isto possivelmente ocorreu devido ao alto teor de lipídios contidos nas amostras de soja, que dificultam a recuperação dos padrões. O efeito matriz encontrado foi de 83% e 86%, respectivamente. O limite de detecção (LOD) foi fixado em 0,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o de quantificação em 0,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Tais valores de recuperação são importantes para determinar quanto a matriz influencia na quantificação das micotoxinas, pois dificilmente 100% do padrão analítico que foi inoculado nas amostras seria recuperado, já que a soja e o feijão são matrizes complexas, com pigmentos, poros, altos teores de proteínas e lipídios que podem ligar-se as micotoxinas, dificultando a sua completa recuperação,

sendo assim o método de extração foi testado para garantir que um valor acima de 75% da micotoxina que contaminou a amostra, fosse recuperada com êxito.

A Tabela 1 apresenta os valores de aflatoxinas encontrados após quantificação por HPLC-FLC das amostras de soja e feijão submetidas a tratamento com o AITC durante 35 dias. Houve uma redução de 36% de AFB₁ no tratamento mais brando (1 $\mu\text{L L}^{-1}$) em amostras de feijões, enquanto que em tratamentos a partir de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ os teores de AFB₁ permaneceram abaixo de níveis quantificáveis. Além disso, todas as doses testadas inibiram totalmente (< LOD) a formação de AFB₂ em feijão.

Já para amostras de soja, os tratamentos com 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ mostraram um aumento em 53% de AFB₁ se comparadas ao grupo controle, porém esses valores não foram estatisticamente diferentes pela alta variação do desvio padrão, que se apresentou alto principalmente pela dificuldade de se trabalhar com fungos micotoxigênicos, algumas amostras apresentaram uma contaminação extremamente alta de aflatoxinas, enquanto em outras seu aparecimento foi sutil. Tal divergência também pode ser explicado pelo fato que a concentração de AITC não ter sido capaz de inibir o crescimento do fungo. Por outro lado, o AITC pode ter causado uma leve injúria, e tal injúria pode ter incentivado uma maior produção da micotoxina como um mecanismo de defesa por parte do *A. parasiticus*, como observado em estudos anteriores de Lopes et al. (2017), onde amostras tratadas em baixos níveis de AITC apresentaram uma produção maior de micotoxinas, quando comparadas a grupos controle. Contudo, analisando o tratamento na concentração de 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de AITC gasoso, foi possível verificar uma redução de 90% da AFB₁ em comparação com o grupo controle. Tratamentos com 25 $\mu\text{L L}^{-1}$ foram capazes de reduzir

totalmente a produção de aflatoxinas (< LOD). Não foram detectados quaisquer níveis de AFB₂ em soja, incluindo o grupo controle.

É interessante comparação de alguns dados que associam o desenvolvimento fúngico com a produção de aflatoxinas. Em amostras de soja, por exemplo, apesar do tratamento com 5 µL L⁻¹ de AITC ter sido capaz de reduzir apenas 2 logs da população fúngica, ele já foi capaz de inibir em 90% a concentração de aflatoxinas nas amostras. No feijão resultados similares foram encontrados. Apesar da não diferença estatística da população de *A. parasiticus* de amostras tratadas com 1 e 5 µL L⁻¹ de AITC, as amostras que sofreram tratamento mais brando apresentaram uma concentração de em média 47 ppb de aflatoxina B₁, enquanto que a concentração de micotoxinas ficou abaixo do limite de detecção nas amostras tratada com 5 µL L⁻¹ de AITC, mostrando mais uma vez o potencial do AITC não só em inibir o crescimento fúngico, mas também reagir com as micotoxinas, apesar de não se saber ao certo os produtos formados de tal reação.

O Brasil é um dos países que mais consome ácidos propiônicos, benzóicos e sórbico para o controle fúngico pós colheita. Estes ácidos são utilizados sem grande controle em concentrações de até 500 ppm, deixando possíveis resíduos nos grãos que mesmo após processamento podem surtir algum efeito no corpo de humanos e animais. A proposta de tratamento máxima apresentada no presente artigo é utilizar 25 ppm de um composto que além de natural, possui baixo custo, visto que é possível produzi-lo sinteticamente. Sua volatilidade também é apresentada como um fator positivo, sendo possível eliminar, em sua maioria, o AITC após exaustão ou processamento dos grãos. Utilizando doses 10 vezes menores do que outros químicos os resultados da

utilização do AITC são promissores, sendo uma real alternativa que possui todos os pilares para obter sucesso na indústria de controle fúngico.

Infelizmente quando o mecanismo de armazenamento dos grãos é falho e o controle fúngico não é o suficiente, há possibilidade de presença de micotoxinas nos grãos. Tratamentos térmicos e processamentos já não serão o suficiente para eliminação das toxinas e haverá necessidade de uso de adsorventes. O Brasil também bate recordes na utilização desses compostos, chegando a casa de 38 milhões de reais em gastos todos os anos. Esses adsorventes, são em sua maioria, argilas capazes de adsorver aflatoxinas dos grãos nas etapas de armazenamento. Estes adsorventes, quando consumidos pelos animais na ração, assim como as micotoxinas, também podem trazer sérios problemas relacionados ao ganho de peso e problemas gástricos dos animais. Sendo assim, seu uso deve ser criterioso, apenas para eliminar as micotoxinas. Por outro lado, o AITC também é capaz de reagir diretamente com as aflatoxinas, em baixas doses, eliminando-as dos grãos. Após um processamento posterior, o AITC pode também ser eliminado, deixando o grão livre de contaminação fúngica e micotoxigenica.

Tabela 1

Valores de aflatoxinas em amostras de soja e feijões submetidas a tratamentos com AITC gasoso em U 85% durante 35 dias, resultados estão representados em média \pm desvio padrão. Letras diferentes, na mesma coluna, mostram diferença significativa ($P \leq 0,05$). O limite de detecção (LOD) foi fixado em $0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$

Concentração de AITC Gasoso ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Matriz			
	Soja ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Feijão ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	AFB ₁	AFB ₂	AFB ₁	AFB ₂
0	51,97 \pm 36,96 ^{ab}	<LOD ^a	74,71 \pm 29,99 ^a	11,24 \pm 17,49 ^a
1	78,89 \pm 6,32 ^a	<LOD ^a	47,34 \pm 16,50 ^a	<LOD ^a
5	5,45 \pm 8,46 ^{bc}	<LOD ^a	<LOD ^b	<LOD ^a
25	<LOD ^c	<LOD ^a	<LOD ^b	<LOD ^a

4. Conclusão

O AITC volátil em concentrações $\geq 1 \mu\text{L L}^{-1}$, foi capaz de reduzir a população de *A. parasiticus* e reduzir/eliminar as aflatoxinas B₁ e B₂ de amostras de soja e feijões estocadas em condições de umidade relativa de 85%. Sendo assim o AITC, associado a outras barreiras, como a redução da umidade e sistema de exaustão adequado durante o armazenamento, pode ser um grande aliado no combate a fungos micotoxigênicos.

O AITC pode ser aplicado em processos de fumigação de grão, rações e alimentos para reduzir o crescimento de fungos e, conseqüentemente a produção de micotoxinas. Em questão de doses, sua utilização neste artigo foi 10 vezes menor do que concentrações de sais ácidos aplicados em grãos nos silos, apresentando um efeito excelente na redução fúngica. A utilização de baixas concentrações é fator determinante em questões comerciais, pois quanto menos do composto o produtor precisar utilizar, menor serão os custos. O AITC já é produzido de forma sintética. Portanto, seu uso pode ser amplo, pois não depende somente de fontes naturais. Este composto é altamente pungente, mas por sua alta volatilidade, ele pode ser eliminado após ter cumprido sua ação antimicrobiana, principalmente em alimentos que serão processados por moagem ou ação térmica após colheita, como é o caso do feijão e da soja.

Sua viabilidade vai além do laboratório, atingindo proporções industriais, por ser um composto de baixo custo e que é altamente eficaz em baixas concentrações, como apresentado neste trabalho: doses de $1 \mu\text{L L}^{-1}$ já apresentaram efeitos consideráveis na redução de fungos e micotoxinas em feijão. No presente trabalho, os grãos foram submetidos à uma estocagem em

ambiente simulando uma umidade forçada e extrapolada, fornecendo o ambiente ideal para o desenvolvimento fúngico. Mesmo assim o AITC superou as expectativas com uma elevada redução fúngica. Sendo assim o composto pode ser utilizado como um agente de profilaxia para inibir o crescimento fúngico e sua eficiência deve ser ainda maior se o ambiente de estocagem dos grãos tiver um bom controle de temperatura e umidade.

Paralelo a este estudo foi estudada a viabilidade dos grãos de soja e feijão, destinados ao plantio, quando submetidos aos tratamentos com o AITC, os verificando se o composto apesar de natural, não seria tóxico para a semente, evitando que a mesma não germinasse. Diversos testes de germinação foram realizados e irão compor o artigo final do presente trabalho.

Para estudos futuros sugere-se um aumento na escalabilidade do projeto, aplicando o estudo em silos de escala piloto, onde qualquer ambiente e umidade poderá ser simulado, incluindo sistemas de exaustão, assim como no campo. Futuramente também é completamente válida a busca por formas de incorporar o AITC em produtos de forma comerciável, onde qualquer produtor possa comprar e aplicar na fumigação de seus grãos, de forma segura e controlada, sem a necessidade de estar em contato com o produto de forma concentrada.

REFERÊNCIAS

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre os limites máximos tolerados (LMT) para alimentos em micotoxinas em alimentos – Resolução N°7, de 18 de fevereiro de 2011.

Astorteca A, Vaamonde G, Dalcero A, Ramos AJ, Marín S. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus favus* from corn. International Journal of Food Microbiology. 2012; 156: 60-67.

Azaiez I, Meca G, Manyes L, Luciano FB, Fernández-Frazón M. Study of the chemical reduction of the fumonisins toxicity using allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in model solution and in food oriducts. Toxicon. 2013; 63: 137-146

Azevedo RL, Ribeiro GT, Azevedo CLL. Feijão Guandu: uma planta multiuso. Revista da Fapese. 2007; 3(2): 81-86.

Bellaver C, Júnior PNS. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. EMBRAPA. 2015.

CONAB. Análise mensal da produção de feijão. 2018; 1-6.

Costa AKF. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). Revista de Ciências Agrômicas. 2009; 40 (3): 455-460.

Cunha DS, Viana JS, Silva WM, Silva JM. Soja para o consumo humano: breve abordagem. Agrarian Academy. 2015; 2(3): 101-113.

Fonseca H. Efeitos e sintomas da aflatoxina em animais e no homem. ESALQ USP. 2010.

Hontanaya C et al. Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. *Food Control*. 2015; 47: 154-160.

IBGE. Levantamento sistemático de produção agrícola. 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.htm>>. Acesso em 15 de maio de 2018.

Luciano FB, Meca G, Manyes L, Mañes, J. A chemical approach for the reduction of beauvericin in a solution model and in food systems. *Food and Chemical Toxicology*. 2014; 64: 270-274.

Magalhães ALR, Zorzi K, Queiroz AC, Mello R, Detnabb E, Pereira JC. Resíduo proveniente do beneficiamento do feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) em rações para vacas em lactação: consumo, digestibilidade, produção e composição do leite e eficiência de alimentação. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2008; 37(3): 529-537.

Manyes L, Ruiz MJ, Luciano FB, Meca G. Bioaccessibility and bioavailability of fumonisin B2 and its reaction products with isothiocyanates through a simulated gastrointestinal digestion system. *Food Control*. 2014; 37: 326-335.

Meca G, Luciano FB, Zhou T, Tsao R, Mañes J. Chemical reduction of the mycotoxin beauvericin using allyl isothiocyanate. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 1755-1762.

Oliveira MA, Lorini I, Mallmann C.A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. *Brazilian Journal of food technology*. 2010: 87-91.

Quiles JM et al. Influence of the antimicrobial compound allyl isothiocyanate against the *Aspergillus parasiticus* growth and its aflatoxins production in pizza crust. Food and Chemical Toxicology. 2015; 83: 222-228.

Silva ML, Sugayama R, Range LE, Ribeiro RC. Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas. 2015.

Tureck C, Correa VGG, Peralta RM, EA Koehnlein. Estimativa do consumo de vitaminas e minerais antioxidantes da dieta brasileira. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria. 2013; 33(3): 30-38.