

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS FRANCISCO BELTRÃO  
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS  
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

JANICE RUSCHEL

**COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE  
*Aspergillus* spp. MICOTOXIGÊNICO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

FRANCISCO BELTRÃO

2017

JANICE RUSCHEL

**COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE  
*Aspergillus* spp. MICOTOXIGÊNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso da Graduação, apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra Machado Lunkes

FRANCISCO BELTRÃO

2017

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

### **COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE *Aspergillus* spp. Micotoxigênico**

Por

**Janice Ruschel**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

#### **BANCA AVALIADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Naimara Vieira do Prado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

---

Prof. Dr. Hernan Vielmo  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Hiromi Hashimoto  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR  
(Orientadora)

---

Prof. MSc. João Francisco Marchi  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR  
(Coordenador do curso)

Francisco Beltrão, junho 2017

## AGRADECIMENTOS

À Deus,

À minha família, pais e irmãos pelo incentivo e apoio, em especial meu esposo Daniel.

Agradecer a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto e co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Machado Lunkes pela paciência, dedicação, incentivo, ensinamentos e apoio durante todo o período de trabalho.

Agradeço os meus colegas de laboratório Amanda, Bianca, Felipe, Rafael e Thainá pela amizade, ajuda e incentivo nos momentos difíceis.

Aos técnicos laboratoristas Camila, João, Magali, Poliane, Ronaldo, Sinara, e Sintia pelo auxílio nas análises e pela disposição em ajudar.

Às minhas amigas Aline Wassen Zanotto, Bruna Regina Pereira da Rocha, Naara Aparecida Almeida e Vivian pela amizade e por todos os momentos felizes, companheirismo e amizade.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade, e apoio Financeiro.

À todos os colegas do Curso de Tecnologia em Alimentos e professores que de uma ou outra forma colaboraram para minha formação.

*“Uma vez que aceitamos nossos limites, vamos além deles”.*

*- Albert Einstein*

## RESUMO

RUSCHEL, Janice. **Combinações de ácidos orgânicos no controle de *Aspergillus spp.* micotoxigênico.** 2017. f.67. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

Os consumidores estão cada vez mais exigentes com a qualidade e a sanidade dos alimentos. A presença de micotoxinas na dieta é um grande risco a saúde humana e animal. Os bolores micotoxigênicos das espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus* são responsáveis respectivamente pela produção de aflatoxina e ocratoxina, durante o armazenamento de grãos e cereais. Medidas para reduzir ou impedir a produção dessas toxinas se fazem necessárias, devido a toxicidade e a resistência a tratamentos físicos e químicos. A eliminação do bolor ou o impedimento do seu desenvolvimento destacam-se entre as medidas preventivas para evitar a contaminação por estas micotoxinas. O objetivo do trabalho foi avaliar combinações de ácidos orgânicos contra *A. flavus* e *A. ochraceus* quanto à atividade antifúngica e também o efeito destes para o controle da produção de aflatoxina por *A. flavus*. Através de análises *in vitro* determinou-se a Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos ácidos propiônico, acético e láctico contra as cepas *A. flavus* NRRL 3251 e *A. ochraceus* A152. A partir da CIM foram delineados os testes para avaliar as combinações dos ácidos orgânicos contra *A. flavus*. A melhor combinação foi testada e aplicada em ração peletizada para controle de *A. flavus* toxigênico. A CIM do ácido propiônico de 0,2 % e ácido acético de 0,5% foram os ácidos orgânicos com maior atividade contra *A. flavus* e *A. ochraceus*. Nas combinações contra *A. flavus* a CIM de 0,025 + 0,25 % (ácido propiônico e acético) foi a de maior eficiência demonstrando a importância do sinergismo e a possibilidade de aplicar doses menores dos ácidos. Não foi possível avaliar o efeito dos ácidos orgânicos na produção de aflatoxina pela cepa NRRL 3251, embora esta seja toxigênica, a mesma não expressou a produção da toxina ao longo do experimento, provavelmente devido a problemas de armazenamento da cultura fúngica. Não foi possível avaliar o efeito dos ácidos combinados em ração peletizada artificialmente contaminada com *A. flavus* em virtude da baixa atividade de água da ração (~Aa 0,6) a qual representou a principal barreira para o crescimento fúngico, devendo ser realizados mais estudos e aplicado em alimentos em condições de armazenamento na qual o efeito possa ser observado. Os ácidos orgânicos apresentam atividade inibitória contra *Aspergillus spp.* e através deste trabalho foi possível observar que a combinação de dois ácidos permite a redução da dose aplicada. No entanto, ao transpor as análises *in vitro* para experimento aplicado é recomendado o estudo dos fatores intrínsecos e extrínsecos em que este experimento seja conduzido, afim de se ter condições de avaliar os melhores tratamentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Micotoxinas. Atividade antifúngica. *Aspergillus spp.*  
Ácidos orgânicos.

## ABSTRACT

RUSCHEL, Janice. **Combinations of organic acids to control *Aspergillus* spp. mycotoxigenic**. 2017. f.67. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Federal Technological University of Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

Consumers are more aware of the importance of consuming healthy and quality food products. The presence of mycotoxins in the diet is a major risk to human and animal health and cause severe economic losses. The mycotoxigenic molds of the genus *Aspergillus* are responsible for the production of aflatoxin and ochratoxin during storage of grains and cereals. There are toxins resistant to physical and chemical treatments and thus, measures to reduce or prevent the product of these toxins are necessary. The elimination of mold or the impediment of its development are preventive measures to avoid the contamination by these mycotoxins. The objective of this work was to evaluate the combinations of organic acids against *A. flavus* and *A. ochraceus* regarding the antifungal activity and the effect of these for the control of aflatoxin production by *A. flavus*. The Inhibitory Minimal Concentration (MIC) of propionic, acetic and lactic acids was determined through in vitro analyzes against *A. flavus* NRRL 3251 and *A. ochraceus* A152 strains. From the CIM, the tests were designed to evaluate the combinations of organic acids against *A. flavus*. The best combination was tested and applied in pelleted ration to control toxigenic *A. flavus*. The MIC of propionic acid of 0.2% and acetic acid of 0.5% were the organic acids with the highest activity against *A. flavus* and *A. ochraceus*. In the combinations against *A. flavus* the MIC of  $0.025 \pm 0.25$  % (propionic and acetic acid) was the most efficient demonstrating the importance of synergism and the possibility of applying lower doses of the acids. It was not possible to evaluate the effect of organic acids on the production of aflatoxin by strain NRRL 3251, although this one is toxigenic, it did not express the production of the toxin throughout the experiment, probably due to storage problems of the fungal culture. It was not possible to evaluate the effect of the combined acids on artificially pelleted ration contaminated with *A. flavus* due to the low feed water activity ( $\sim A_w 0,6$ ), which represented the main barrier to fungal growth, and further studies And applied to food under storage conditions in which the effect can be observed. Organic acids have inhibitory activity against *Aspergillus* spp. And through this work it was possible to observe that the combination of two acids allows the reduction of the applied dose. However, when transposing the in vitro analysis for the experiments, it is recommended to study the intrinsic and extrinsic factors in which this experiment is conducted, in order to be able to evaluate the best treatments.

**KEYWORDS:** Mycotoxins. Antifungal activity. *Aspergillus* spp. Organic acids.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	15
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1 FUNGOS EM ALIMENTOS .....	16
3.1.1 <i>Aspergillus flavus</i> .....	16
3.1.2 <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	18
3.2 MICOTOXINAS .....	19
3.2.1 Aflatoxina .....	21
3.2.2 Ocratoxina .....	23
3.3 CONTROLE DE <i>Aspergillus</i> sp. e MICOTOXINAS .....	25
3.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	27
3.4.1 Ácido acético .....	28
3.4.2 Ácido lático .....	29
3.4.3 Ácido propiônico .....	29
3.5 RAÇÃO PELETIZADA .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 CEPAS PADRÕES .....	32
4.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	32
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS CONTRA <i>Aspergillus flavus</i> 3251 E <i>Aspergillus ochraceus</i> A 152 .....	33
4.4. AVALIAÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA INIBIÇÃO DE <i>Aspergillus flavus</i> .....	34
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COMBINADOS NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Aspergillus flavus</i> E NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINA .....	35
4.5.1 Acidez total titulável .....	36
4.5.2 Extração de aflatoxina e Cromatografia de Camada Delgada (CCD) .....	36
4.6 DETERMINAÇÃO DO pH .....	38
4.7 APLICAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM RAÇÃO BOVINA PELETIZADA COM MELAÇO EXTERNO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA COM <i>Aspergillus flavus</i> .....	38
4.7.1 Análise de bolores e leveduras .....	41
4.7.2 Determinação de umidade .....	41
4.7.3 Determinação da atividade de água (Aa) .....	42
4.7.4 Monitoramento da temperatura e umidade relativa .....	42
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
5.1 CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS CONTRA <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251 e <i>Aspergillus ochraceus</i> A 152. ....	43
5.2 COMBINAÇÕES DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS CONTRA <i>A. flavus</i> E DETERMINAÇÃO DA CIM. ....	46
5.2.1 Análise de pH das combinações .....	47

5.3 EFEITO DAS COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA INIBIÇÃO DE <i>A. flavus</i> E NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINA.....	50
5.4 APLICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COMBINADOS EM RAÇÃO BOVINA PELETIZADA COM MELAÇO EXTERNO ARTIFICIALMENTE.....	52
5.4.1. Caracterização físico-química ração bovina peletizada com melaço externo contaminada artificialmente.....	53
5.4.2 Controle de umidade relativa e temperatura de armazenamento da ração peletizada tratadas com ácidos orgânicos e contaminada artificialmente. ....	55
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química das Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	22
Figura 2- Estrutura química da ocratoxina A .....	24
Figura 3 - Tacho de camisa dupla .....	39
Figura 4- Aplicação dos tratamentos á ração com melaço.....	40

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Comportamento dos ácidos em relação aos pHs. ....	45
Gráfico 2- níveis de pH de acordo com a concentração de ácido lático x ácido acético.....	48
Gráfico 3- Níveis de pH de acordo com a concentração de ácido acético x ácido propiônico.....	49
Gráfico 4- Níveis de pH de acordo com a concentração de ácido lático x ácido propiônico.....	49
Gráfico 5- Controle de temperatura Umidade relativa de incubação das amostras de ração .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações das análises dos ácidos orgânicos.....	33
Tabela 2- Combinações dos ácidos orgânicos.....	34
Tabela 3 - Combinações de ácido acético e ácido propiônico contra produção de micotoxinas. ....	35
Tabela 4–Tratamentos utilizados na ração bovina peletizada com melação externo.	39
Tabela 5- Concentração inibitória mínima e valores de pH dos ácidos orgânicos para inibição de <i>A. flavus</i> e <i>A. ochraceus</i> .....	43
Tabela 6- Concentração inibitória mínima e pH das combinações dos ácidos orgânicos para controle de <i>Aspergillus flavus</i> . ....	46
Tabela 7 - Efeito das combinações de ácidos orgânicos na inibição de <i>A. flavus</i> e na produção de aflatoxina B <sub>1</sub> . ....	50
Tabela 8 - Controle de bolores e leveduras em ração bovina peletizada com melação externo adicionado de ácidos orgânicos. ....	52
Tabela 9- Determinação de pH, Aa e umidade dos tratamentos utilizados na ração bovina peletizada com melação externo .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

A segurança do alimento é uma das temáticas mais relevantes da atualidade, o consumidor está cada vez mais exigente em relação à sanidade dos alimentos, nessas circunstâncias há uma crescente preocupação com a presença de micotoxinas na dieta humana (MARROQUIN-CARDONA, 2014).

Os bolores filamentosos produtores de micotoxinas colocam em risco a saúde humana e animal, podem ser encontrados comumente no solo, ar e principalmente em alimentos, matérias-primas e pré-processados. Os fungos filamentosos estão presentes em todas as regiões do mundo pela sua capacidade de crescer em diversos substratos e em diferentes condições de umidade, temperatura e pH. (RODRÍGUEZ et al., 2015; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

De forma genérica os fungos são classificados como fungos de campo e de armazenamento. O gênero *Aspergillus* compreende o grupo de bolores de armazenamento responsáveis pela deterioração e pela produção de micotoxinas, com destaque para: a aflatoxina produzida pelo *A. flavus* e a ocratoxina por *A. ochraceus*. Estas substâncias tóxicas podem ser cumulativas na cadeia alimentar, provocam riscos à saúde, dependendo da dose ingerida e da exposição podem levar à morte (DIDWANIA; JOSHI, 2013).

As micotoxinas são termorresistentes e difícil de serem eliminadas em condições de processamento de alimentos. O risco de contaminação por micotoxinas pode ser amenizado se houver um controle do fungo e das condições favoráveis para a sua produção. As medidas preventivas no campo, geralmente são realizadas com aplicação de fungicidas químicos, sendo estes tóxicos a saúde humana. Assim, é de suma importância a inovação e a melhoria de tecnologias de prevenção (MEDEIROS, 2012).

Medidas práticas que podem auxiliar na prevenção da contaminação por bolores micotoxigênicos são cuidados no controle da temperatura, umidade relativa e a atmosfera em que o alimento está inserido. Porém muitos bolores conseguem se desenvolver em temperaturas e faixas de atividade de água diferentes de suas condições ótimas, o que dificulta realizar esses controles (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010).

A utilização de ácidos orgânicos no controle de bolores micotoxigênicos é uma das alternativas relatadas para a inibição de seu crescimento. Estes ácidos conseguem de uma forma não dissociada penetrar nas células e se dissociar no interior destas e alterar a faixa de pH no citoplasma promovendo a morte e a inibição celular (GRIGOLETTI, 2007).

A combinação de dois ácidos orgânicos pode reduzir a dose necessária para sua ação, comparado à aplicação de cada ácido isoladamente. Existem até o momento poucas pesquisas relacionadas ao uso da combinação de ácidos orgânicos como antifúngicos, e por serem encontrados naturalmente em alguns alimentos estes ácidos são considerados seguros. No entanto, a determinação das concentrações inibitórias mínimas se faz necessário, para o uso adequado destes ácidos e suas combinações.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação dos ácidos orgânicos e suas combinações (ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico) no controle de *Aspergillus* spp. micotoxigênicos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos ácidos orgânicos (ácido láctico, propiônico e acético) contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus ochraceus*.
- Determinar as concentrações inibitórias mínimas de combinações de ácidos orgânicos (ácido láctico, propiônico e acético) contra o crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina.
- Aplicar e avaliar o efeito da combinação mais promissora de ácidos orgânicos (ácido láctico, propiônico e acético) em ração peletizada artificialmente contaminada com *A. flavus*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FUNGOS EM ALIMENTOS

Os fungos são micro-organismos eucariontes, heterótrofos, unicelulares leveduriformes ou multicelulares que correspondem aos fungos filamentosos, que se reproduzem por meio de esporos e se dispersam no ar. Os fungos filamentosos conhecidos como bolores são aveludados, cotonosos, com diferentes tipos de pigmentação (PELCZAR et al,1997; TRABULSI, 2008).

Alguns fungos são desejáveis com aplicações em diversas áreas, no entanto outros podem afetar os alimentos por serem deteriorantes ou produtores de micotoxinas. O seu desenvolvimento é dependente de condições ambientais favoráveis e do tipo de substrato, podendo ser divididos em fungos de campo (que se desenvolvem ainda no campo) e fungo de armazenamento (que se desenvolvem no período de armazenamento), esse último geralmente está presente em matérias primas e em produtos pré-processados (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010; COSTA, 2014).

Em alimentos a presença de bolores produtores de micotoxinas podem causar grandes impactos na economia e na saúde pública pela sua toxicidade. Para as indústrias ofertarem um alimento seguro é necessário o controle dos fungos ainda no campo (matérias-primas), na sua etapa de crescimento, onde são produzidos os metabólitos secundários e ocorre a esporulação. Apesar de vários produtos processados e industrializados sofrerem tratamento térmico capazes de eliminar os esporos fúngicos, as toxinas são muito resistentes, por isso há necessidade de se controlar o bolor em sua fase de adaptação (SOBCZAK ET AL., 2015).

##### 3.1.1 *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus flavus* é um fungo saprófita que pode ser encontrado em diversas regiões no mundo, entretanto possui dois fatores extrínsecos cruciais para o

seu desenvolvimento: a temperatura e umidade. A temperatura ótima para o desenvolvimento do gênero é de 35 a 38 °C e atividade de água (Aa) de no mínimo de 0,78 a 0,80. Este bolor é mais comumente encontrado em armazenamento de grãos e rações. Nesses substratos encontram condições propícias para seu desenvolvimento, mas como é um micro-organismo xerofílico (desenvolve-se em ambientes secos) consegue sobreviver também em situações extremas pela produção do esclerócio que lhe confere alta resistência a secas e escassez de nutrientes (CASTRO, 2011; BORDINI et al., 2013; PITT, 1975 TRAVAGALIA, 2011).

Além de ser responsável pela deterioração das culturas armazenadas, *A. flavus* possui a capacidade de produzir aflatoxina, considerada uma das substâncias com maior poder carcinogênico encontrado em alimentos. Dependendo do grau de exposição às aflatoxinas produzidas por *A. flavus* podem trazer graves danos à saúde humana e animal (PELUQUE, 2014; MAZIERO; BERSOT, 2010).

O gênero *Aspergillus* sp. geralmente é detectado em culturas agrícolas como amendoim, milho, algodão, nozes, amêndoas, especiarias entre outros, podendo estar presente antes e depois da colheita (AMAIKE; KELLER, 2011).

Ao pesquisar espécies de fungos em ração e forragem para cabras leiteiras Silva et al. (2015) conseguiram identificar *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* spp., todos fungos produtores de micotoxinas. O resultado encontrado se deve em função de milho pré-contaminado utilizado como matéria-prima na fabricação de ração e forragem. A contaminação por *Aspergillus* sp. demonstra o risco de contaminação em produtos lácteos, uma vez que a aflatoxina B<sub>1</sub> pode ser biotransformada e transferida para o leite na forma de aflatoxina M<sub>1</sub>.

Realizando um estudo de detecção molecular de fungos com potencial toxigênico, Oliveira et al. (2015) identificaram a presença de *Aspergillus* sp. em 27 das 50 amostras de amendoim coletadas em um comércio varejista de Maringá/PR, essa proporção de contaminação fúngica (>50 %) se tornam preocupantes, considerando a possibilidade de serem toxigênicos.

Em virtude da ampla incidência no período de armazenamento e ali encontrar as condições ideais de crescimento e de produção de aflatoxina, o *A. flavus* como já mencionado representa uma ameaça principalmente em culturas agrícolas que posteriormente são utilizadas na indústria de alimentos, o que torna imprescindível seu estudo. Porém, além de *A. flavus* pode haver a presença da espécie *A. ochraceus*

que além de deteriorante, é responsável pela produção de ocratoxina (raramente aflatoxina) (JAY, 2005).

### 3.1.2 *Aspergillus ochraceus*

O *Aspergillus ochraceus* é característico de regiões mais quentes, pode se desenvolver em temperaturas de 8 a 37 °C, sua temperatura ótima de crescimento está entre 24 a 31 °C e em pH 3,0 a 10,0 (PITT; HOCKING, 1997).

Esta espécie é normalmente encontrada em alimentos mais secos, tais como: soja, amendoim, pimenta, feijão seco, grão de bico, nozes, castanha de caju, sementes de gergelim, pistaches, frutos secos. Além de alimentos armazenados especialmente os cereais como arroz, cevada, milho, trigo, farelo e também alguns produtos em que são a matéria-prima (PITT, HOCKING, 1997). Além dos alimentos já citados Amézqueta et al. (2012) citam a uva como substrato para o crescimento fúngico principalmente na fase madura da fruta, onde *A. ochraceus* encontra condições ideais de se desenvolver, principalmente pela alta taxa de açúcar.

Rezende et al. (2013) analisaram 30 amostras de grãos de café verde e a espécie de maior número encontrada foi a de *A. ochraceus* (36,20%), destes 89,55 % eram produtores de ocratoxina A o que prejudica a saúde, além disso, a presença de fungos afeta a qualidade sensorial da bebida.

A presença da espécie em sementes pode causar danos e diminuir o desenvolvimento (germinação) conforme Rocha et al. (2014) que testaram a qualidade fisiológica das sementes de soja naturalmente contaminadas com *A. ochraceus*. Dependendo do nível de contaminação fúngica, o *A. ochraceus* pode causar danos aos tecidos e também impedir a germinação.

Além de causar danos às sementes e ser responsável pela deterioração de uma gama grande de alimentos o *A. ochraceus* como já citado é produtor de ocratoxinas, que são micotoxinas que como a aflatoxina são prejudiciais à saúde e merecem atenção.

### 3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidas em sua maioria pelos fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* spp. Por apresentarem baixa massa molecular e estrutura química estável, estas toxinas são de difícil eliminação pelos organismos vivos. Além disso, são moléculas termorresistentes (suportam até 270 °C). Sendo assim, o controle das mesmas se faz necessário em todas as etapas de processamento de alimentos, desde o início, na seleção da matéria-prima, em função dos danos que podem causar a saúde animal e humana (LÁZZARI, 1993; PEREIRA; SANTOS, 2011).

Existem diversos tipos de micotoxinas, uma mesma espécie de bolor pode produzir múltiplas substâncias tóxicas, existem aproximadamente 350 fungos micotoxigênicos já identificados e mais de 300 substâncias catalogadas como micotoxinas. Os grupos de maior destaque em estudos são os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*, que são produtores de: aflatoxina e ocratoxina; ocratoxina; tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e micotoxinas emergentes (fusaproliferina, monoliformina, beauvericina e anniatinas); alcaloides; alteneune, alternariol, éter metil alternariol, altertonina e ácido tenuazónico respectivamente (MARIN et al, 2013; PEREIRA; SANTOS, 2011).

A diversidade das micotoxinas depende de seus fungos produtores que se desenvolvem em diversos substratos. Várias espécies podem se desenvolver em um mesmo substrato. O seu desenvolvimento é relativo da espécie, da cepa e de fatores como tempo e temperatura. Nos alimentos em geral a maioria dos bolores encontram as melhores condições para o seu desenvolvimento e para a produção de toxinas (CRUS; MANSILLA; TADEO, 2010; PEREIRA; SANTOS, 2011; SANTANA, 2012).

A classificação de micotoxinas podem ocorrer de várias formas, pois possuem estruturas químicas muito distintas umas das outras. A classificação pode ser a partir de dados clínicos como: hepatotoxinas, neurotoxinas, nefrotoxinas e imunotoxinas de acordo com os órgãos que afetam. Mas também podem ser classificadas de acordo com as estruturas químicas, biossíntese de origem, pelas doenças que causam entre outras (ZAIN, 2011).

A presença de micotoxinas em alimentos coloca em risco a saúde dos animais e humanos através da ingestão ou exposição, dependendo da dosagem e do tempo

expostos as toxinas podem causar graves problemas como doenças hepáticas, gastrointestinais, carcinogênicas e teratogênicas e em alguns casos podem ser letais. Os maiores problemas enfrentados são que essas doenças podem se desenvolver ao longo de dias ou de anos em função do poder acumulativo. Muitas vezes não é possível identificar a presença da toxina pela sua baixa concentração, os sintomas das micotoxicoses (doenças causadas por micotoxinas) se assemelham com outras doenças e a falta de conhecimento nesta área faz com que passem despercebidas (MARIN et al, 2013; SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011; SANTANA, 2012).

Os cereais são os alimentos mais suscetíveis à contaminação por micotoxinas. Segundo Pinotti et al (2016) a contaminação por micotoxinas pode ser responsável por perdas econômicas no setor agrícola além de abalar a saúde pública. Um dos cereais de maior ocorrência de micotoxinas é o milho, a análise de 270 amostras de milho de silos bags na Argentina revelou a presença de fumonisinas em 100 % e aflatoxina em 40 % do total das amostras. A incidência de micotoxinas em grãos reforça a urgência em se implantar um controle de qualidade com maior rigor no campo e durante o armazenamento (CASTELLARI et al., 2015).

Um estudo sobre micotoxinas mais encontradas em alimentos revelou que ocratoxina, aflatoxina, fumonisina, desoxinivalenol e zearalenona são as de maior incidência. Sendo os alimentos mais suscetíveis os cereais, leguminosas, oleaginosas, frutas secas e café, além de todos os produtos industrializados onde estes alimentos são os principais ingredientes ou a matéria-prima (PRADO, 2014).

O processamento dos alimentos não garante que os produtos não estejam contaminados por micotoxinas. A análise de 125 amostras de chocolate comercializados no Brasil revelou que 98 % das amostras estavam contaminadas com ocratoxina A e 80 % das amostras estavam contaminadas com aflatoxina, essas micotoxinas estão presentes em chocolate devido a presença de cacau contaminado que é a base da fabricação do chocolate (COPETTI et al., 2012).

Londoño et al. (2013) relatam a contaminação por micotoxinas em derivados lácteos ao avaliarem 30 amostras de leite em pó provenientes do Brasil e da Argentina detectaram aflatoxina ( $M_1$ ) em todas as amostras, os resultados encontrados demonstram o quanto a incidência de micotoxinas é alta e o quanto o estudo das mesmas é imprescindível em alimentos.

É possível constatar que a diversidade de fungos e a capacidade de produzirem diferentes tipos de micotoxinas que são moléculas estáveis,

termorresistentes e prejudiciais aos organismos, faz com que haja uma preocupação em se controlar estes bolores e impedir as condições da produção das micotoxinas, principalmente as mais tóxicas: as ocratoxinas e as aflatoxinas sendo as últimas de maior perigo entre ambas.

### 3.2.1 Aflatoxina

As aflatoxinas (AFs) são compostos tóxicos produzidos por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* que são encontrados comumente na natureza, também podem ser produzidas pelas espécies *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceus*, estas de menor incidência. Normalmente são encontrados em alimentos e rações a base de grãos e cereais (JAY, 2005).

As aflatoxinas compreendem cerca de 20 substâncias tóxicas, entre as mais comuns em alimentos e as de maior periculosidade estão as AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, denominadas assim pela sua fluorescência, quando submetidas a luz ultravioleta cor azul (blue) para B e cor verde (green) para o G, sendo a mais tóxica a AFB<sub>1</sub> (FORSYTHE, 2002; DRUMOND, 2012).

Estruturalmente as AFs possuem uma cumarina ligada ao furano e a lactona, o Grupo B possuem anel ciclopentona, conforme está representado na Figura 1. Essas toxinas são furocumarinas de capacidade tóxica, podem ser mutagênicas, cancerígenas, teratogênicas, imunossupressoras ou podem ainda ser acumulativas, o que difere é a dose e o tempo de exposição. As AFs são muito resistentes a altas e baixas temperaturas, geralmente são encontradas em alimentos desenvolvidos com elevada taxa de umidade como: cereais, oleaginosas, especiarias entre outros (ARAÚJO, 2012; MATHUR et al., 2015).

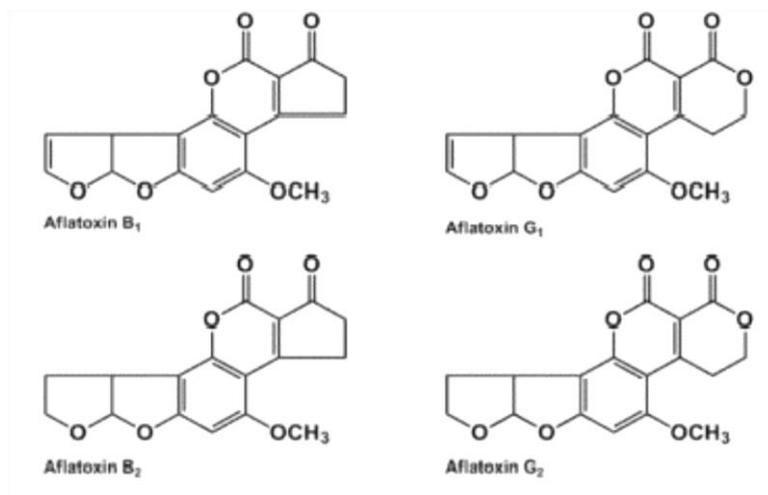


Figura 1- Estrutura química das Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

Fonte: (FORSYTHE, 2002).

A contaminação por aflatoxinas em alimentos e rações pode desencadear vários danos à saúde animal e humana provocando doenças pela ingestão ou exposição de toxinas. Essas doenças são chamadas de aflatoxicoses que podem ser agudas ou crônicas, quando o indivíduo apresenta aflatoxicose aguda essa pode levar à morte, quando os sintomas são mais subclínicos ela é caracterizada como crônica (ZAIN, 2011).

A saúde humana pode ser afetada pela exposição de alimentos pré-contaminados, Blankson e Mill-Robertson (2016) relatam que de 35 amostras analisadas a base de cereais destinadas à alimentação de lactantes e crianças em Acra (Gana), 71 % das amostras estavam contaminadas com AFB<sub>1</sub>. Lai et al. (2015) realizaram um estudo com 370 amostras de arroz em 6 estados da China, obtiveram como resultado a presença de 63,5 % de aflatoxina e 4,9 % de ocratoxina do total das amostras. Massod et al (2015) avaliando 307 amostras de frutos secos e de nozes do Paquistão, confirmaram que em 132 amostras houve ocorrência de AFLA, entre elas a AFLA B<sub>1</sub> a de maior toxicidade, o que confirma que os alimentos são os maiores veículos de contaminação.

A dieta muitas vezes pré-contaminada por AFs põem em risco a saúde animal, estudos realizados por Motta et al. (2015) com dietas destinadas a vacas lactantes em fazendas de São Paulo, demonstraram a presença de AFLA B<sub>1</sub> em 31,44 % do total de 288 amostras de dieta, o que além de prejudicar o animal também faz com que o leite posteriormente comercializado seja contaminado. Em um estudo realizado na

China Li et al. (2017) avaliaram 231 amostras de leite (139 amostras leite UHT e 38 amostras de leite pasteurizado) entre 2014 e 2015 revelou que em 88,6 % (2014) e 59,6 % (2015) das amostras de leite UHT e em 47,4 % das amostras de leite pasteurizado estavam contaminadas com AFM<sub>1</sub> (metabólito da aflatoxina B<sub>1</sub>). A AFB<sub>1</sub> quando ingerida pelas vacas leiteiras passa por um processo de hidrólise que é eliminado no leite como M<sub>1</sub>, é uma substância termoestável podendo suportar até 250 °C e é possível de ser carcinogênica, o que é um alerta para um maior controle da AFs em alimentos (PITT, HOCKING, 1997); LI et al., 2017; SCAGLIONI et al., 2014).

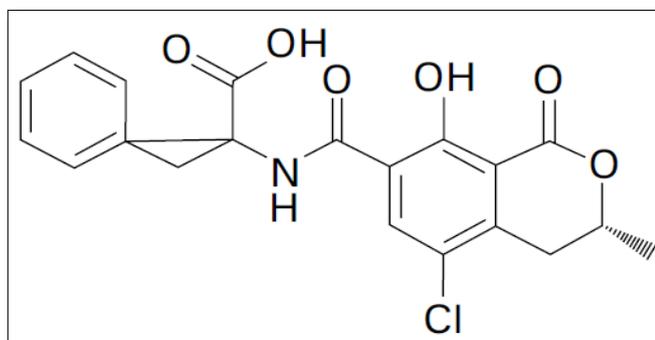
A Resolução nº7 de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011) estabelece o limite máximo de aflatoxinas que podem estar presentes nos alimentos no Brasil, de acordo com os critérios do Codex Alimentarius é estabelecido para cereais e produtos derivados de 5 µg/ kg e para milho é 20 µg/ kg. O controle dessa toxina tende a ser maior em países desenvolvidos do que os produtores de comoditis em países subdesenvolvidos, de acordo com a RDC 165 de 26 de fevereiro de 2010 na União Europeia os teores totais de aflatoxina em cereais são de 4,0 µg/ kg e em milho e subprodutos de 10 µg/ kg (UNIÃO EUROPEIA, 2010; SAKATA; SABBAG; MAIA, 2011).

Diante da preocupação dos países e dos dados expostos é possível compreender o quanto a AF oferece perigo aos animais e humanos e a dificuldade de sua eliminação e o quanto é preciso ainda ser feito para se ter um controle da mesma. Esse fato também ocorre com a ocratoxina que também rege entre as mais tóxicas das micotoxinas produzida por *A. ochraceus*.

### 3.2.2 Ocratoxina

As ocratoxinas são produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* spp., que podem ser classificadas por A, B e C, entretanto, a de maior toxicidade é a ocratoxina A (OTA). Esta toxina possui estrutura de beta-fenilalanina em que ocorre ligação amida com desidroisocumarina, conforme disposto na Figura 2. Ela tem poder acumulativo no organismo humano podendo desencadear problemas de saúde principalmente nos rins que são os principais órgãos afetados. A presença de ocratoxina no sangue de pessoas saudáveis é a prova da grande exposição a essa

toxina por meio da ingestão de alimentos sendo encontradas em cereais, café, uvas, cacau e especiarias (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008; RUSSO et al., 2016).



**Figura 2- Estrutura química da ocratoxina A**  
**Fonte: FREIRE et al., 2007.**

A absorção da toxina é muito rápida em função da elevada capacidade de se ligar às proteínas plasmáticas principalmente a albumina, porém sua eliminação do organismo é mais lenta. Ela é eliminada pelo sistema renal, onde pode ser reabsorvida pelos tecidos, tendo um poder acumulativo elevado (OLIVEIRA et al., 2015).

A ocratoxina pode afetar a saúde animal podendo ser encontrada nos músculos de aves, suínos, e bovinos; em vacas dependendo da dose ingerida pode diminuir o seu desempenho e reduzir a produção de leite (DUARTE, 2010; KOSZEGI, 2016). Estudos de Krüger et al. (2015) demonstram a presença de ocratoxina no soro sanguíneo de suínos destinados ao abate, das 87 amostras de dois frigoríficos da região serrana do estado do Rio de Janeiro analisadas foi encontrado OTA em 4,59 % das amostras. A presença de OTA em animais pode ser explicada através da qualidade dos cereais destinados à sua dieta, muitas vezes a qualidade inferior compromete toda a cadeia do alimento.

Cerais e seus subprodutos são suscetíveis à contaminação fúngica e propícios a contaminação por micotoxinas, no caso da OTA, ela permanece constante mesmo no processamento, em função da capacidade termoestável, o que pode comprometer os derivados de origem animal destinados à alimentação humana (DUARTE et al., 2012). Sarigiannis et al. (2014) analisaram 60 amostras de vinhos oriundos do mercado varejista de diversas regiões da Grécia e encontraram OTA em

52 amostras, o vinho passa por diversos processos tecnológicos, porém isso não é suficiente para eliminar a ocratoxina.

A presença da toxina em alimentos processados afeta diretamente a economia, dificulta a comercialização de produtos principalmente para exportação e sobretudo, põe em risco a saúde humana (DUARTE, 2010; KOSZEGI, 2016). Em função disso, vários países começaram a se preocupar em garantir a qualidade de seus produtos, no Brasil a Resolução nº7 de 18 de fevereiro de 2011, estipula de acordo com anexo III os Limites Máximos Tolerados (LMT) para ocratoxina, que entrou em vigor em 1º de janeiro de 2014, onde é estabelecido para cereais e produtos derivados ter no máximo de 20 µg/kg de ocratoxina A (BRASIL, 2011).

A ocratoxina é um grande risco principalmente pelo seu poder acumulativo nos organismos vivos e por sua preferência de desenvolvimento em cereais. A estipulação de valores de LMT é uma das formas encontradas de se ter um controle da contaminação de ocratoxina, porém existem outras formas de se amenizar e controlar a produção de micotoxinas e principalmente a inibição de *Aspergillus* sp.

### 3.3 CONTROLE DE *Aspergillus* sp. E MICOTOXINAS

Na tentativa de amenizar a presença de *Aspergillus* sp. e conseqüentemente a produção de toxinas, é realizado o controle a partir do gerenciamento do meio em que o alimento está inserido. Um método comumente utilizado é o das Barreiras de Leistner, que mantem as condições de qualidade inicial do alimento, onde é realizado o controle dos principais fatores influentes do meio, que correspondem: a temperatura, a quantidade de oxigênio, pH e atividade de água (FRANCO, LANGRAF, 2001; TROMBETE; FRAGA, SALDANHA, 2013). Já na tentativa de eliminar o bolor presente nos produtos agrícolas (ainda no campo) são utilizadas medidas como: boas práticas agrícolas (para amenizar a alta contagem); o uso de grãos geneticamente modificados (menos suscetíveis a bolores) e o uso de conservantes ou antifúngicos (CARDOSO FILHO; CALDAS; MURATORI, 2015; VITORINO, 2011).

O maior impasse enfrentado é que as micotoxinas podem estar presentes nos alimentos mesmo que os fungos tenham sido eliminados durante o processamento. Esse fato é devido sua capacidade termorresistente e por serem compostos de alta

estabilidade, o que dificulta a diminuição da concentração ou a tentativa de eliminar essas toxinas. E por esse motivo, são imprescindíveis medidas preventivas no controle de toda a cadeia que o alimento percorre até a mesa do consumidor, no intuito de eliminar o fungo antes da produção da micotoxina (BRIDEN, 2011; FRANCO; LANGRAF, 2001).

No alimento previamente contaminado por bolores é necessário o controle das condições e parâmetros que propiciam a produção das toxinas, que são diferentes das condições necessárias para o desenvolvimento fúngico. Entre os parâmetros se destacam: a temperatura que para a aflatoxina e ocratoxina é de 27 e 28 °C e a atividade de água que é de Aa 0,71 a 0,94 e Aa 0,85 a 0,95 respectivamente (JAY, 2005; MAGAN; OLSEN, 2004; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Quando o controle de bolores é falho, a presença de toxina no alimento é quase que uma consequência. Entretanto, é possível realizar a descontaminação através de métodos físicos como a moagem dos grãos e a exposição à radiação, métodos biológicos que é a aplicação de cepas de leveduras que através dos produtos da fermentação conseguem minimizar as micotoxinas e o método químico que se refere a extração das micotoxinas através de solventes ou a utilização de conservantes. A utilização de qualquer método depende do tipo de alimento, e se é possível aplica-lo sem interferir em sua qualidade (CARDOSO FILHO; CALDAS; MURATORI, 2015).

O uso de conservantes e agentes fúngicos por se tratar de alimentos é o mais utilizado, e devem seguir alguns critérios para serem usados: avaliação dos níveis tóxicos, qual a reatividade química, não devem alterar a identidade do alimento, a disponibilidade da tecnologia e principalmente deve garantir a inocuidade do alimento a fim de atender as exigências do consumidor.

Para o controle de *Aspergillus* sp e suas micotoxinas que são difíceis de eliminar, se faz necessário o uso de procedimentos ou substâncias que não afetam a qualidade do alimento garantindo assim um alimento seguro. Os ácidos orgânicos são exemplos de substâncias normalmente utilizadas em produtos alimentícios como conservantes com a vantagem de serem eficientes antifúngicos e bem aceitos pelos consumidores (FORSYTHE, 2002; VITORINO, 2011).

### 3.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são comumente encontrados na natureza por fazerem parte do metabolismo animal e vegetal, podem ser formados a partir da fermentação microbiana do intestino animal. Alguns são antimicrobianos e são utilizados normalmente na nutrição animal de suínos e aves a fim de controlar a microbiota intestinal (FRANCO, 2009; SAUSEN, 2015).

Estes ácidos carboxílicos possuem em sua estrutura o grupo carboxila (COOH), um átomo de carbono ligado ao oxigênio através de uma dupla ligação e um grupo hidroxila. São ácidos de ponto de ebulição elevado e considerados ácidos fracos pelo fato de não se dissociarem totalmente em meio aquoso (ZANELATO, 2009).

Os ácidos orgânicos apesar de fracos conseguem penetrar na membrana citoplasmática dos fungos quando estão em pH baixo e perto do pKa, desse modo, conseguem entrar na membrana fúngica de uma forma não dissociada e ao adentrar na célula começam a se dissociar (liberação de prótons) desestabilizando a membrana através do estresse ou rompendo-a. Os conservantes podem ser mais eficazes na ação antimicrobiana se combinados, assim cada um atua num mecanismo de ação diferente o uso de ácido láctico e ácido acético combinado pode ser uma alternativa já que normalmente são utilizados na indústria alimentícia (BELTRANE, 2009; FORSYTHE, 2002; PELÁEZ et al, 2012).

A utilização desses ácidos em alimentos em sua grande maioria não tem limitação de uso, muitos estão presentes em alimentos fermentados como ácido acético e láctico. As concentrações utilizadas não devem interferir nos aspectos sensoriais, o uso de ácidos orgânicos como conservantes está relacionado com a eficiência, rapidez e a simplicidade no modo de conservação (IN HASSAM; EL-GADI; SAND, 2015).

### 3.4.1 Ácido acético

O ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ) tem sabor azedo, é incolor e tem cheiro penetrante, confere sabor azedo ao vinagre e o valor de seu pka é de 4,75. É produzido através da oxidação de etanol por bactérias acéticas do gênero *Acetobacter*, Gram-negativas, aeróbicas. Essas bactérias produzem altas concentrações de ácido acético que é utilizado na indústria de alimentos para a fabricação de vinagre usado na produção de marinados, peixes, ketchup, maionese e picles. Sua aplicação tem como principal função dar o sabor e evitar o crescimento de micro-organismos patogênicos. (FELTRE, 2005; SENGUN; KARABIYIKLI, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Existe uma variedade de estudos mostrando que o ácido acético pode ser uma alternativa como antibacteriano, mas como antifúngico é bem menos citado. Estudos realizados por González et al (2016) testaram a sensibilidade do *Aspergillus* spp. ao ácido acético, ácido cítrico e ácido ascórbico, sendo que o ácido acético foi testado em diferentes valores de pH (4,5, 5,0, 5,5 e 6,0) e em diferentes concentrações (0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 mM) obtiveram resultados satisfatórios em pHs mais baixos e em concentrações de 8 e 22 mM para a inibição de *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. parasiticus*, e de 36 a 44 mM para *A. luchuensis*, *A. niger* e *A. tubingensis*. Sendo que para cada 0,5 de aumento de pH a concentração de ácido acético teve que ser dobrada, mostrando que o valor de pH interfere na ação antifúngica dos ácidos.

Estudos realizados por Camili e colaboradores (2010) evidenciaram que o ácido acético é muito eficiente, usado na inibição de outros bolores utilizaram o ácido nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 ou 2,0 mL 100 L<sup>-1</sup> vol. de câmara para o controle pós-colheita de *Botrytis cinerea* em uvas onde as concentrações de melhor resultado foram as maiores de 0,5 .100L<sup>-1</sup> vol. de câmara, o que demonstra que o ácido pode trazer resultados positivos em relação a inibição de fungos.

Assim como o ácido acético é utilizado na indústria alimentícia e empregado em muitos alimentos como antibacteriano e antifúngico (raramente usado) e ser bastante eficiente, o ácido láctico também vem já há anos sendo empregado em alimentos e pode ser usado do mesmo modo.

### 3.4.2 Ácido láctico

O ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ) tem pka de 3,88, líquido de sabor suave, sem odor, é normalmente utilizado para melhorar o sabor de bebidas e vegetais em conservas, usado em produtos cárneos e em forma de lactato de cálcio é usado como aditivo em alimentos. (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009; BALTES, 2007).

Pode estar presente naturalmente em vários alimentos pela origem microbiana através do processo de fermentação principalmente por Lactobacilos, ou por síntese química pela hidrólise de lactonitrila (CARVALHO et al., 2005).

O ácido pode ser usado como antibacteriano e é mais eficiente trabalhando em sinergia com outros ácidos, Peláez et al. (2012) determinaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos ácidos láctico e acético contra diferentes cepas de *Aspergillus flavus*, para o ácido láctico as CIM foram diferentes para todas as cepas e para ácido acético foi o mesmo valor, através desses valores foram realizadas as combinações de ambos os ácidos, assim obtendo um maior efeito em menores concentrações sendo que a concentração de maior inibição foi ácido láctico 78mM e ácido acético a 31,2 mM em pH de 3,4.

O sinergismo entre os ácidos orgânicos pode ser algo promissor, além do ácido láctico e acético que já são normalmente utilizados em alimentos outro ácido bastante utilizado na conservação de alimentos é o ácido propiônico principalmente como conservante em panificados.

### 3.4.3 Ácido propiônico

Tem como fórmula molecular  $C_3H_6O_2$ , sua utilização é geralmente em conservação de pão, produtos de panificação em geral e fabricação de queijos. Pode ser usado como conservante combinado com ácido sórbico. Seu pka é de 4,88 e quando submetido a pH 4,0 88 % do composto não está dissociado já com o aumento do pH para 6,0 apenas 6,7 % continua de forma não dissociada, sua melhor ativação como conservante é em alimentos com baixa acidez (ARAÚJO, 2008; BALTES, 2007).

Suhr e Nielsen (2004) testaram o éster propionato de etila derivado do ácido propiônico em concentrações de 0 %, 0,0003 %, 0,03 % e 0,3 % (m/v) contra micro-organismos deteriorantes de produtos de padaria principalmente bolores e obtiveram como resultado a concentração de maior eficiência 0,3 % e em pH 4,8 no tempo de 2 semanas.

Monila e Giannuzzi (2002) avaliaram o efeito do ácido propiônico na produção de aflatoxina por *A. parasiticus* e obtiveram como resultado a inibição da produção em concentrações de 60ppm (60mg/L) o que demonstra sua eficiência como antifúngico.

Assim como o ácido propiônico pode ser usado em diversas concentrações como conservante em alimentos, os ácidos orgânicos em geral são bons antifúngicos e podem ser utilizados em diversos alimentos da dieta humana, já na dieta animal principalmente em grãos e cereais que são utilizados da produção de ração.

### 3.5 RAÇÃO PELETIZADA

A ração normalmente é desenvolvida a partir da mistura de grãos e cereais que naturalmente podem estar contaminados por bolores deteriorantes ou micotoxigênicos que acabam implicando na qualidade da ração e principalmente na saúde animal, pois nem mesmo todos os processos de industrialização da matéria-prima conseguem eliminar as micotoxinas presentes, inclusive o processamento da ração que passa pela peletização (processo térmico, de pressão e vapor onde a ração farelada é transformada em pellets) (PINOTTI et al, 2016).

A peletização é realizada na ração para aumentar a digestibilidade, aumentar o *shelf life* e reduzir a carga de micro-organismos, mas posteriormente a esse processo se houver ausência de cuidado na conservação dessa ração, há um risco muito grande de recontaminação (KLEIN, 2009).

A suscetibilidade da ração aos fungos é algo preocupante, principalmente pela possível produção de micotoxinas, que além de causar transtornos para o organismo animal grande parte dela, fica alojada nos tecidos e no caso dos bovinos, consegue refletir na produção de leite, o que resulta na contaminação dos humanos indiretamente pela ingestão de carne, leite e derivados (MAGAN, OLSE, 2001).

Considerando que as micotoxinas (aflatoxina e ocratoxina) são um problema de saúde pública e que constantemente o ser humano e os animais estão expostos a contaminação, seja diretamente ou indiretamente, é imprescindível que seja realizado um maior controle do agente causador que são os fungos (*A. flavus* e *A. ochraceus*). Com esse intuito, a aplicação de ácidos orgânicos (ácido láctico, acético e propiônico) vem a calhar nessa problemática, e como são aplicados na indústria de alimentos, seria conveniente que os mesmos possam vir a ser utilizados como antifúngicos e como inibidores da produção de micotoxinas, dando resultados não só de maneira isolada, mas principalmente em sinergia, a fim de reduzir a concentrações aplicadas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CEPAS PADRÕES

As cepas utilizadas nas análises foram *Aspergillus flavus* NRRL 3251 adquirida junto à “Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello” – Campinas, São Paulo, e o *Aspergillus ochraceus* A 152. As cepas foram reativadas em placas de Petri contendo meio BDA (ágar dextrose batata) e realizada a técnica de estria por esgotamento, as placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias em estufa BOD. Após o período de incubação foram realizadas suspensões de esporos em Tween 80 (0,1%) e efetuada a contagem na câmara de Neubauer, até a obtenção da padronização do inóculo de  $10^4$  e  $10^5$  esporos.ml<sup>-1</sup>.

### 4.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Para a seleção dos agentes antimicrobianos foram avaliados: Ácido Acético (Cinética) (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, MM: 60,05 g/mol, Princípio Ativo: 97,70%, pKa: 4,75), Ácido Lático (Dinâmica) (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, MM: 90,08 g/mol, Princípio Ativo: 71,35%, pKa: 3,88) e Ácido Propiônico (Reatec) (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, MM: 74,08 g/mol, Princípio Ativo: 97,12%, pKa: 4,88).

Os ácidos orgânicos foram padronizados através da titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M até ocorrer o ponto de viragem cor (rósea). O indicador utilizado foi à fenolftaleína alcoólica a 1 % (SKOOG, 2006). As soluções de ácidos orgânicos foram preparadas nas concentrações, conforme disposto na Tabela 1. As concentrações testadas foram determinadas a partir de testes prévios e também de acordo com a literatura para uso em alimentos.

Tabela 1- Concentrações das análises dos ácidos orgânicos.

ÁCIDOS ORGÂNICOS	CONCENTRAÇÃO (m/v)	CONCENTRAÇÃO (mM)
Ácido acético	0,05 %	8,32
	0,1 %	16,55
	0,2 %	33,30
	0,5 %	83,26
	0,8 %	133,22
Ácido propiônico	0,05 %	6,74
	0,1 %	13,49
	0,2 %	26,99
	0,5 %	67,49
	0,8 %	107,99
Ácido láctico	0,05 %	5,55
	0,1 %	11,01
	0,2 %	22,20
	0,5 %	55,50
	0,8 %	88,80
	1,2 %	133,80
	1,5 %	166,51
	1,8 %	199,82
2,0 %	222,02	

Fonte: Autora

Cada ácido orgânico foi padronizado através da titulação de uma solução estoque e a partir dessa foram preparadas as outras concentrações, sendo para ácido acético: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 0,8 % (m/v), ácido láctico: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,2; 1,5; 1,8 e 2,0 % (m/v); e para ácido propiônico: 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 0,8 % (m/v). Todas as concentrações foram diluídas em água destilada estéril previamente neutralizada para pH 7,0.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS CONTRA *Aspergillus flavus* 3251 E *Aspergillus ochraceus* A 152.

Um volume de 1 mL *A. flavus* ou *A. ochraceus* previamente padronizados ( $10^4$  e  $10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>) foram inoculados em placa de Petri. Em seguida foi adicionado o

ágar BDA previamente acidificado com uma alíquota de 1 mL de cada solução de ácido orgânico em 19 mL de BDA liquefeito à 45 °C. Realizando-se assim a semeadura por profundidade (*Pour plate*). Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas em estufa BOD a 25 °C por 7 dias. Após esse período foi realizada a leitura e observado o crescimento dos fungos através da contagem das colônias, verificando se houve ou não inibição.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DAS COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA INIBIÇÃO DE *Aspergillus flavus*

Após a realização da determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de cada ácido isolado, foram realizadas as combinações dos ácidos através do delineamento composto central (DCC) com 3 repetições no ponto central, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Combinações dos ácidos orgânicos

Níveis Codificados		Concentração (%)					
		1		2		3	
		AA	AP	AA	AL	AL	AP
-1	-1	0,025	0,025	0,025	0,4	0,4	0,025
1	-1	0,25	0,0,25	0,25	0,4	1	0,025
-1	1	0,025	0,1	0,025	1	0,4	0,1
1	1	0,25	0,1	0,25	1	1	0,1
0	0	0,138	0,063	0,138	0,70	0,70	0,063
0	0	0,138	0,063	0,138	0,70	0,70	0,063
0	0	0,138	0,063	0,138	0,70	0,70	0,063

**AA:** ácido acético; **AP:** ácido propiônico, **AL:** ácido láctico.

Fonte: Autora.

Para realização do teste de inibição, procedeu-se conforme o item 4.3, após o preparo da combinação. As soluções ácidas foram previamente misturadas e uma

alíquota de 1 mL da mistura foi adicionada ao BDA, sendo este adicionado através do inóculo *Pour plate*  $10^4$  esporos/mL de *A. flavus* e analisados após 7 dias de incubação a 25 °C.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COMBINADOS NO DESENVOLVIMENTO DE *Aspergillus flavus* E NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINA.

Para o teste do efeito das combinações dos ácidos orgânicos na produção de aflatoxina, foram testadas as concentrações das combinações apresentadas na tabela 3, combinando-se ácido propiônico com ácido acético ou ácido láctico.

Tabela 3 - Combinações de ácido acético e ácido propiônico contra produção de micotoxinas.

Concentrações (%)			Concentrações (mM)		
<b>AC</b>	<b>+</b>	<b>AP</b>	<b>AC</b>	<b>+</b>	<b>AP</b>
0,05	+	0,05%	8,32	+	6,74
0,5%	+	0,05%	83,26	+	6,74
0,25%	+	0,025%	41,63	+	3,37
<b>AL</b>	<b>+</b>	<b>AP</b>	<b>AL</b>	<b>+</b>	<b>AP</b>
0,8%	+	0,05%	88,80	+	6,74
0,8 %	+	0,2%	88,80	+	26,99
0,4%	+	0,1%	44,40	+	13,46

AC: ácido acético; AP: ácido propiônico, AL: ácido láctico.

Fonte: Autora

O ágar BDA liquefeito (19mL) foi acidificado com 1 mL de cada mistura de ácidos em placa de Petri. Após a solidificação do ágar, foi realizado o inóculo em superfície (*Spread Plate*) de 20  $\mu$ L do inóculo de  $10^4$  esporos/mL de *A. flavus*. As placas foram incubadas 25 °C. Após 7 dias de incubação, foi analisado o crescimento dos fungos através da contagem das colônias, verificando se houve ou não inibição. No 15º dia foi realizado a extração de aflatoxina (apenas nas placas com crescimento de bolores característicos de *A. flavus*).

#### 4.5.1 Acidez total titulável

A acidez total titulável foi realizada nas amostras dos ácidos orgânicos combinados no desenvolvimento de *Aspergillus flavus* e na produção de aflatoxina conforme item 4.5. Para tanto, foi seguido à metodologia de acidez do Instituto Adolfo Lutz (1985). Foi pesado 4 g de cada amostra e transferido para um Erlenmeyer de 250 mL acrescido de 50 mL de água destilada (padronizada: pH 7), foi deixado agitar por 30 minutos em um homogeneizador a 150 rpm. Para realizar a titulação foi utilizado o indicador fenolftaleína alcoólica a 1 %, colocado 3 gotas e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até ocorrer a viragem da cor (rósea). Sendo a acidez calculada pela equação (1):

$$\frac{v \times f \times 100}{P \times c} = \text{acidez em solução molar por cento v/m}$$

(1)

Onde:

v= número de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 M gasto na titulação

f= fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01M

P=número de g da amostra usado na titulação

c= correção para a solução de NaOH 1M, 10 para solução NaOH 0,1 M e 100 para solução NaOH 0,01M

#### 4.5.2 Extração de aflatoxina e Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A extração e a determinação de aflatoxina realizada pelo método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD, conforme Soares e Rodrigues-Amaya (1989). Foram realizadas com algumas adaptações devido a quantidade de amostra,

Rodrigues Amaya (1989) preconiza a análise com 50 g de amostra, neste experimento a massa e o volume foram ajustados.

Para a extração 20 g da amostra foi adicionado 108 mL de metanol e 12 mL de cloreto de potássio (KCl) 4% (m/v) e agitado em shaker a 180 rpm por 5 minutos. Após foi realizada a filtração do extrato em papel filtro e a transferência de 60 mL do filtrado para um béquer de 500 mL. Ao filtrado adicionou-se 60 mL de solução clarificante de sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 30% (m/v) e 8 g de terra diatomácea. A mistura foi agitada com bastão de vidro. Em seguida realizou-se a filtração novamente em papel filtro e a transferiu-se 60 mL do filtrado para um funil de separação. Realizou-se a partição, acrescentado 60 mL de água destilada e 4 mL de clorofórmio. O funil de separação foi agitado cuidadosamente no tempo de 3 minutos para ocorrer a extração da toxina em repouso, após a separação das fases, houve a coleta de 2 mL da fase clorofórmica no inferior do funil para um frasco separado. A partição foi repetida com a adição de 4 mL de clorofórmio no funil de separação homogeneizado e aguardado para a formação de fase, em seguida recolhido 2 mL da fase inferior no mesmo frasco, obtendo o volume total de 4 mL do extrato. Em seguida foi realizado a evaporação do tubo sendo colocado em banho-maria a 50°C, com fluxo de nitrogênio gasoso.

Após o processo de extração foi efetuada a análise das toxinas pelo método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A placa cromatográfica de sílica gel foi reativada por 30 minutos em estufa a 100 °C. As amostras foram ressuspendidas em 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e homogeneizadas por 30 segundos em agitador de tubo (vortex). Foi aplicado a 1 cm da base: 1 ponto de cada amostra (30  $\mu\text{L}$ ); 1 ponto de aflatoxina B<sub>1</sub> padrão (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e em 1 ponto de cada amostra foram aplicadas sobreposta a estas 5  $\mu\text{L}$  de aflatoxina padrão. A corrida cromatográfica foi realizada em cuba cromatográfica sendo que a fase móvel foi composta por: tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico na proporção de 70: 50: 50: 20 (v/v). A corrida cromatográfica foi de 10 cm e após secagem foi realizada a leitura sob Luz UV a 366 nm. A leitura se deu pela comparação da intensidade da luz fluorescência do padrão com as amostras.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH foi aplicada nas análises realizadas dos itens: 4.3; 4.4; 4.5 e 4.7. Foram pesados 10 g de cada amostra e diluído em 100 mL de água destilada, foi agitado até que as partículas se tornar uniformes, após, foi realizado a leitura de pH com o auxílio de um pHmetro previamente calibrado de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

#### 4.7 APLICAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM RAÇÃO BOVINA PELETIZADA COM MELAÇO EXTERNO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA COM *Aspergillus flavus*.

A fim de avaliar o efeito dos ácidos orgânicos combinados em ração peletizada foram obtidas amostras na indústria de uma cooperativa do centro sul do estado do Paraná. O teste foi realizado o mais aproximado possível com o que ocorre na indústria.

Os tratamentos aplicados estão apresentados na tabela 4. A combinação testada foi de ácido propiônico 0,025 % + ácido acético 0,25 % (tratamento 0) aplicando-se o inóculo de  $10^3$  esporos/g de *A. flavus* na ração. Realizou-se ainda o controle sem *A. flavus* (tratamento 2). Para avaliar o efeito de cada concentração dos ácidos isolados, testou-se ainda ácido acético 0,25 % e propiônico a 0,025 % com e sem inóculo de *A. flavus* (tratamentos 3-4 e 5 -6, respectivamente). E ainda testou-se a concentração de 0,5 % de ácido propiônico, conservante comumente aplicado em rações bovinas (tratamento 7 e 8). E ainda realizou-se o controle da ração sem adição de ácidos orgânicos (9 e 10).

Tabela 4—Tratamentos utilizados na ração bovina peletizada com melaço externo

Tratamentos	<i>A. flavus</i> (esporos/g)	ácido propiônico (%)	ácido acético (%)
1	10 <sup>3</sup>	0,025	0,25
2	-	0,025	0,25
3	10 <sup>3</sup>	0	0,25
4	-	0	0,25
5	10 <sup>3</sup>	0,025	0
6	-	0,025	0
7	10 <sup>3</sup>	0,5	0
8	-	0,5	0
9	10 <sup>3</sup>	0	0
10	-	0	0

Fonte: autora

O preparo das amostras de ração foi realizado em tacho de camisa de aquecimento dupla de aço inox, com capacidade de 50 L, com pás giratórias para a homogeneização das amostras, conforme apresentado na Figura 3.



Figura 3 - Tacho de camisa dupla

Fonte: Autora

Cada amostra consistiu de 1466 g de ração peletizada, 125g de aveia laminada, 8 g de óleo degomado, 100g de melaço (aquecido a 50 °C em banho-maria). Os ácidos orgânicos 0,8g (isolado ou combinado) foram previamente misturados com o melaço e com o óleo degomado. A ração foi misturada com a aveia por 20 segundos,

em seguida adicionou-se a mistura de ácido, melação e óleo degomado e homogeneizou-se por 180 segundos como demonstra a Figura 4. Logo após, foram separadas 90g de cada tratamento em três repetições em placas de Petri.



**Figura 4- Aplicação dos tratamentos á ração com melação**

**Fonte: REBONATTO, 2017.**

As placas contendo as rações com os tratamentos (Tabela 4) foram encaminhadas ao laboratório de Microbiologia (UTFPR- Câmpus Francisco Beltrão) onde os 90 g de cada tratamento foram transferidos para duas placas de Petri contendo 45 g cada. Essa divisão das amostras foi realizada para a aplicação dos tratamentos com e sem inoculo (controles) conforme tabela 4.

Para realizar os tratamentos (1, 3, 5, 7, 9) com *A. flavus*, foi preparado 400g de ração com ausência de melação e ácido e inoculado 700 $\mu$ L de 10<sup>4</sup> esporos/mL, posteriormente foi acrescentado 5g dessa ração a cada um dos tratamentos, resultando na concentração final na ração de 10<sup>3</sup> esporos/g. Já para os controles (2, 4, 6, 8,10) foram adicionadas de 5 g de ração com ausência de melação, ácido e sem inóculo. Todos os tratamentos foram incubados a 25 °C em estufa do tipo BOD. Foi realizada a leitura de temperatura e umidade relativa no período de 30 dias; análise microbiológica (bolores e leveduras) no 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia; e também no 30<sup>o</sup> dia foi realizada análise de umidade e atividade de água (Aa).

#### 4.7.1 Análise de bolores e leveduras

Para a análise microbiológica foram pesados 10 g da amostra que foi diluída em 90 mL de peptona 0,1% (Himedia ®) a partir dessa dissolução (diluição 10<sup>1</sup>) foram realizadas diluições seriadas (1:10) até 10<sup>-6</sup>. Após foi realizada semeadura por *spread plate* em placas de Petri contendo BDA, em duplicatas e incubadas a 25°C por 7 dias. A leitura foi realizada pela contagem de colônias expressas em UFC/g (SILVA, 2007).

#### 4.7.2 Determinação de umidade

Para a umidade foram pesadas cerca de 2 g da amostra triturada e colocado em cadinhos previamente tarados, higienizados e secos em estufa de 105 °C por um período de 1 hora, resfriados e pesados. A amostra foi colocada nos cadinhos e secas na estufa a 105 °C (pré-aquecida) no período de 5 horas ou até atingir o peso constante. As amostras resfriadas em dessecador e pesadas em balança analítica. A pesagem foi realizada até obter o peso constante. A metodologia usada foi de acordo com os métodos preconizados pelo Manual do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Para calcular o teor de umidade aplicou-se a seguinte equação:

$$\text{Umidade \%} = \frac{A-B}{C} \times 100$$

(2)

Onde:

A = Peso do recipiente mais amostra

B = Peso do recipiente + amostra após secagem

C = Peso da amostra

#### 4.7.3 Determinação da atividade de água (Aa)

A determinação da atividade de água foi realizada através do equipamento AQUALAB (Decagon devices, WP4C). Com o aparelho calibrado, foi colocada uma alíquota de 2 g de cada amostra nas cápsulas do medidor de atividade de água que foram colocadas no medidor. Após o fechamento da tampa foi realizada a leitura.

#### 4.7.4 Monitoramento da temperatura e umidade relativa

As leituras de temperatura e umidade relativa foram realizadas usando o aparelho termohigrômetro (Incoterm, modelo 7663.02.0.00). O aparelho foi colocado na BOD e após 15 a 20 minutos de estabilização foi realizada a leitura.

### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na observação dos dados foi empregado para a determinação do CIM isolado e a determinação da análise dos combinados o software STATISTIC StatSoft, e através deste, foram realizados os cálculos de média e desvio padrão. E para a análise de pH das combinações dos ácidos orgânicos contra *A. flavus* na determinação da CIM foi realizado o ajuste de modelo e construção da superfície de resposta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS CONTRA *Aspergillus flavus* NRRL 3251 e *Aspergillus ochraceus* A 152.

Os ácidos orgânicos (acético, propiônico e láctico) foram testados contra *A. flavus* NRRL 3251 e *A.ochraceus* A 152 em concentrações de 0,05 à 2,0%. Os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e o respectivo pH estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5- Concentração inibitória mínima e valores de pH dos ácidos orgânicos para inibição de *A. flavus* e *A. ochraceus*

Ácido	<i>A. flavus</i> (UFC .mL <sup>-1</sup> )		<i>A. ochraceus</i> (UFC .mL <sup>-1</sup> )	
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
	CIM % (PH)			
Propiônico (pka =4,88)	0,2 (4,59 ± 0,02)	0,2 (4,59 ± 0,02)	0,2 (4,59 ± 0,02)	0,2 (4,59 ± 0,02)
Acético (pka = 4,75)	0,5 (4,14 ± 0,03)	0,5 (4,14 ± 0,03)	0,5 (4,14 ± 0,03)	0,5 (4,14 ± 0,03)
Lático (pka = 3,88)	i.n.d.	i.n.d.	0,5 (3,71 ± 0,01)	0,8 (3,44 ± 0,01)

i.n.d.: inibição não detectada

Fonte: Autora

O ácido propiônico foi o mais eficiente dos três ácidos testados, ambos os fungos foram sensíveis na CIM de 0,2% (26,99 mM). A CIM apresentou pH 4,59, sendo esse valor inferior ao seu pka de 4,88 (Tabela 5). Os ácidos fracos têm melhor atuação como antimicrobianos na forma não dissociada, o que facilita a entrada na célula e a dissociação no citoplasma causando o desequilíbrio da célula dos micro-organismos (WEISS, LOEFFLER, TERJUNG, 2015).

Ao aplicar o ácido acético contra *A. flavus* e *A. ochraceus* é possível (Tabela 5) verificar que ambas as cepas foram inibidas na concentração de 0,5% (83,26 mM) nas duas concentrações do inóculo (10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> UFC .mL<sup>-1</sup>). Nesta concentração o valor do pH 4,14 foi menor que o pka do ácido (4,75).

Valores de pH de ácido acético entre 4,5 e 5 foram a inibição de *A. carbonarius*, *A. flavus* e *A. parasiticus*, *A. luchuensis*, *A. niger* e *A. tubingensis* o que demonstra a suscetibilidade do gênero *Aspergillus* spp. ao ácido acético e a variação de pH para a inibição (ALCANO et al., 2016).

A capacidade antifúngica do ácido acético também foi descrita por Hassan, El-Kadi e Sand (2015) que testaram o efeito de 8 ácidos orgânicos (ácidos propiônico, acético, fórmico, láctico, tartárico, cítrico, oxálico e málico) contra *Aspergillus flavus*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus nigricans* e *Fusarium oxysporum* sendo que o ácido acético foi eficiente na concentração de 10 %, que é um valor alto quando comparado com a CIM de 0,5 % encontrada no presente estudo. A semelhança nos resultados do ácido propiônico CIM 0,2 % em pH de 4,59 (pKa 4,88) e ácido acético 0,5 % em pH 4,14 (pKa 4,75) se deve em função dos ácidos orgânicos mais lipofílicos terem maior capacidade de atravessar a camada lipídica da célula por isso seu poder antimicrobiano também é maior, os dois ácidos possuem estruturas semelhantes, porém o propiônico possui a cadeia de carbonos maior, o que facilita a entrada do ácido propiônico na membrana celular explicando a sua maior eficiência em relação ao ácido acético (STRATFORD et al., 2009).

O ácido láctico foi o menos eficiente, pois em relação ao *A. flavus* não teve inibição, foram testadas concentrações de 0,05 % até 2,0 % e nenhuma teve efeito contra o fungo, mesmo em valores de pH inferior ao seu pKa (3,88). Já o *A. ochraceus* foi muito mais sensível sendo inibido em 0,5 % (pH 3,44; 55,50 mM) para o inóculo  $10^4$  UFC. mL<sup>-1</sup> e 0,8 % (pH 3,44; 88,80 mM) para  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

O estresse da célula pelo acúmulo de prótons de ácidos e a tentativa da célula de retomar o equilíbrio, faz ser o maior poder tóxico contra os micro-organismos dos ácidos orgânicos, porém existem organismos que podem tolerar um certo declínio de pH na célula sem haver grandes alterações no interior da célula. Esse fato pode ter acontecido com o *A. flavus* em relação ao ácido láctico explicando sua resistência (RICKE, 2003).

Peláez et al (2012) conseguiram determinar a CIM para o ácido láctico contra *A. flavus* não toxigênico em pH de 2,74. Porém para se obter esse valor de pH é necessária uma quantidade maior de ácido láctico. Com o objetivo de diminuir a concentração do ácido a CIM foi testada em combinações principalmente para aumentar a eficiência em concentrações menores dos ácidos.

O comportamento dos ácidos (acético, propiônico e láctico) em relação ao pH está representado no gráfico 1. Quanto maior as concentrações dos ácidos menor é o valor de pH. A aplicação de diferentes concentrações de ácidos resulta no abaixamento do pH, esse processo pode implicar na dissociação dos ácidos, que influencia na inibição dos fungos. Além disso, a grande maioria dos ácidos que são utilizados como conservantes conseguem inibir o fungo em pH menor que o pKa, nessas condições conseguem penetrar na membrana das células de forma não dissociada e quando chegam no interior da membrana celular se dissociam rompendo-a ou estabilizando-a (BELTRAME, 2009; FORSYTHE, 2002; LIND; JONSSON; SCHNÜRER, 2005).

Em relação ao princípio de inibição da maioria dos ácidos ser abaixo do pKa, o ácido acético em pH de 4,43 na concentração de 0,2 % para ambas as cepas não foi eficiente, mesmo estando num valor abaixo de seu pKa (4,75). Assim como o ácido láctico pKa 3,88, não apresentou atividade contra *A. flavus* na maior concentração testada 2% (pH 3,35).

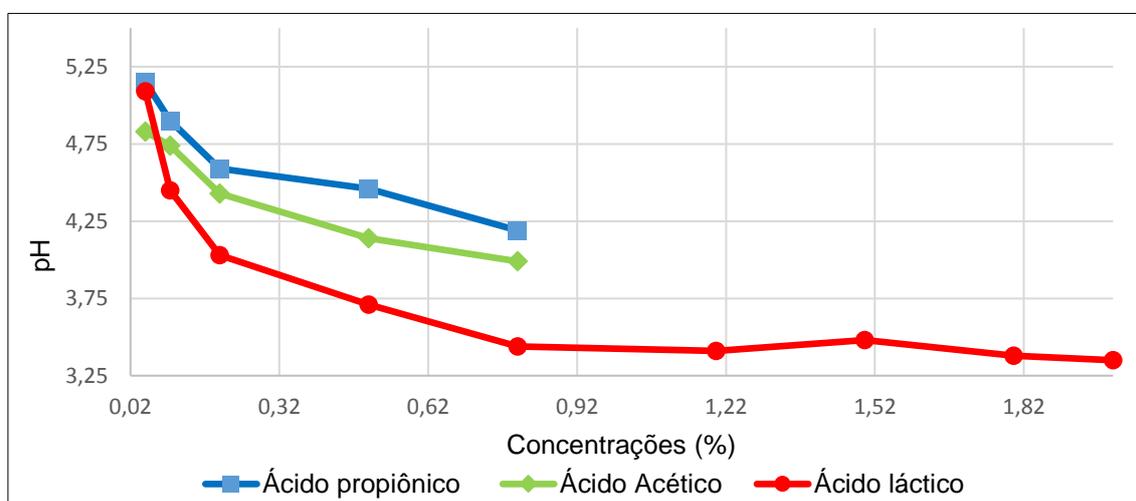


Gráfico 1- Comportamento dos ácidos em relação aos pHs.

Fonte: Autora

## 5.2 COMBINAÇÕES DOS ÁCIDO ORGÂNICOS CONTRA *A. flavus* E DETERMINAÇÃO DA CIM.

Na tabela 6 estão dispostos os resultados da CIM dos ácidos combinados, demonstrando que os ácidos combinados podem ser mais eficientes em sinergia e que juntos, além de inibir o *A. flavus* NRRL 3251, apresentam atividade antifúngica mesmo em concentrações menores que quando aplicados isoladamente.

Tabela 6- Concentração inibitória mínima e pH das combinações dos ácidos orgânicos para controle de *Aspergillus flavus*.

Combinação	CIM %	pH
Propiônico + Acético	0,025 + 0,25	4,29
Propiônico + Lático	0,1 + 0,4	3,81
Acético + Lático	0,25 + 0,4	3,81

Valores de pKa: Ácido Propiônico (4,88); acético (4,75); lático (3,88)

Fonte: Autora

A CIM para a combinação do ácido propiônico + ácido acético foi na concentração de 0,025 % + 0,25 % respectivamente em pH 4,29. Já para a combinação de ácido propiônico + ácido lático foi a concentração de 0,1 % + 0,4 % em pH 3,81. Para as combinações de ácido acético + ácido lático a CIM foi de 0,25 % + 0,4 % respectivamente em pH 3,81. Comparando-se estas concentrações com a CIM dos ácidos isolados (Tabela 5) é possível notar o quanto é possível diminuir as concentrações dos ácidos quando os mesmos estão combinados.

Na Tabela 5, a CIM dos ácidos isolados para acético foi de 0,5 % (83,26 mM) contra *A. flavus* NRRL 3251, enquanto que, nem na maior concentração de 2,0 % (222,02 mM) o ácido lático foi capaz de inibi-lo, já na combinação ácido acético + ácido lático a CIM foi 0,25 % (4,16mM) + 0,4 % (44,40mM), esses resultados demonstram que a diminuição das concentrações dos ácidos nas combinações deve ser considerada. Peláez (2012) e colaboradores avaliaram o sinergismo entre ácido acético e ácido lático contra *Aspergillus flavus*, onde a CIM da combinação foi de 31,2 mM + 78,0 mM

(acético+lático) em pH 3,8, sendo a CIM nas concentrações individuais de 41,6 mM (pH 4,62) para ácido acético e 393,4 mM (pH 2,59) para o ácido lático, demonstrando assim, que concentrações menores combinadas podem ser mais eficientes que os ácidos utilizados isoladamente, um ácido influencia o outro para atingir sua forma não dissociada que é o princípio antifúngico dos ácidos orgânicos.

### 5.2.1 Análise de pH das combinações

A inibição do desenvolvimento fúngico por ácidos orgânicos depende muito do pH. Os ácidos orgânicos que são lipofílicos conseguem diminuir o pH de dentro da célula fazendo com que a mesma perca uma carga de energia em busca da homeostase, o que resulta em um crescimento mais lento ou na total inibição dos fungos (HASSAN, EL- KADI, SAND, 2015).

Para avaliar os efeitos dos ácidos nos valores de pH, foi elaborado um gráfico de superfície de resposta. Entre as combinações de ácido acético e ácido lático, observa-se que o ácido lático foi o que teve maior influência na variação do pH, conforme disposto no Gráfico 2. É possível observar que o ácido acético independente de qualquer concentração não afeta o pH da combinação. Enquanto o ácido lático nas concentrações maiores diminui o pH das combinações.

Sabendo que o pka é o pH onde ocorre um equilíbrio dos prótons dissociados e não-dissociados na proporção de 1:1 e que quanto menor for o pKa de um ácido maior é a sua força de ionização (FELTRE, 2005). O ácido lático que tem um pka de 3,88 é mais forte que o ácido acético (pka 4,75). Assim, nas combinações o ácido lático influencia mais, pois é um ácido mais forte que o ácido acético e começa a doar seus prótons antes.

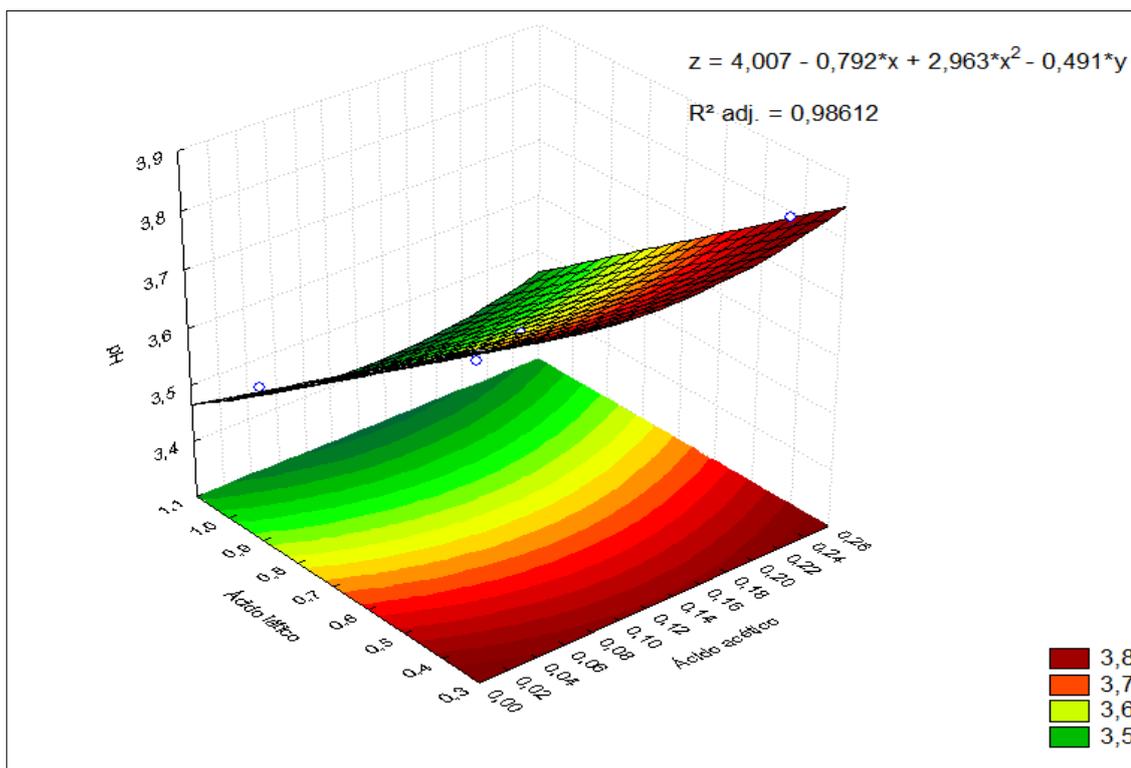


Gráfico 2- níveis de pH de acordo com a concentração de ácido láctico x ácido acético.

Fonte: Autora

Entre os níveis de pH das combinações do ácido propiônico x acético conforme o gráfico 3, a variação maior de pH foi obtido a partir do aumento da concentração de ácido acético. Os níveis baixos das concentrações de ácido propiônico com os níveis altos do ácido acético fizeram com que o pH das combinações diminuísse, já os níveis baixos do ácido propiônico com as concentrações intermediárias do ácido acético aumentaram o pH das concentrações. Considerando o valor de pka dos dois ácidos é possível verificar que o ácido acético de pka 4,75 colabora mais com a variação de pH por ser um ácido mais forte que o ácido propiônico com pka de 4,88.

Nas combinações de ácido propiônico + láctico o que mais influenciou nos valores de pH foi o ácido láctico conforme ilustrado no gráfico 4. O ácido láctico apresenta variação para qualquer concentração do ácido propiônico. Esse fato também ocorreu nas combinações do ácido láctico com o acético conforme Gráfico 2. Onde o ácido láctico (pka 3,88) começa sua liberação de próton antes que o ácido propiônico (pka 4,88) e é considerado um ácido mais forte.

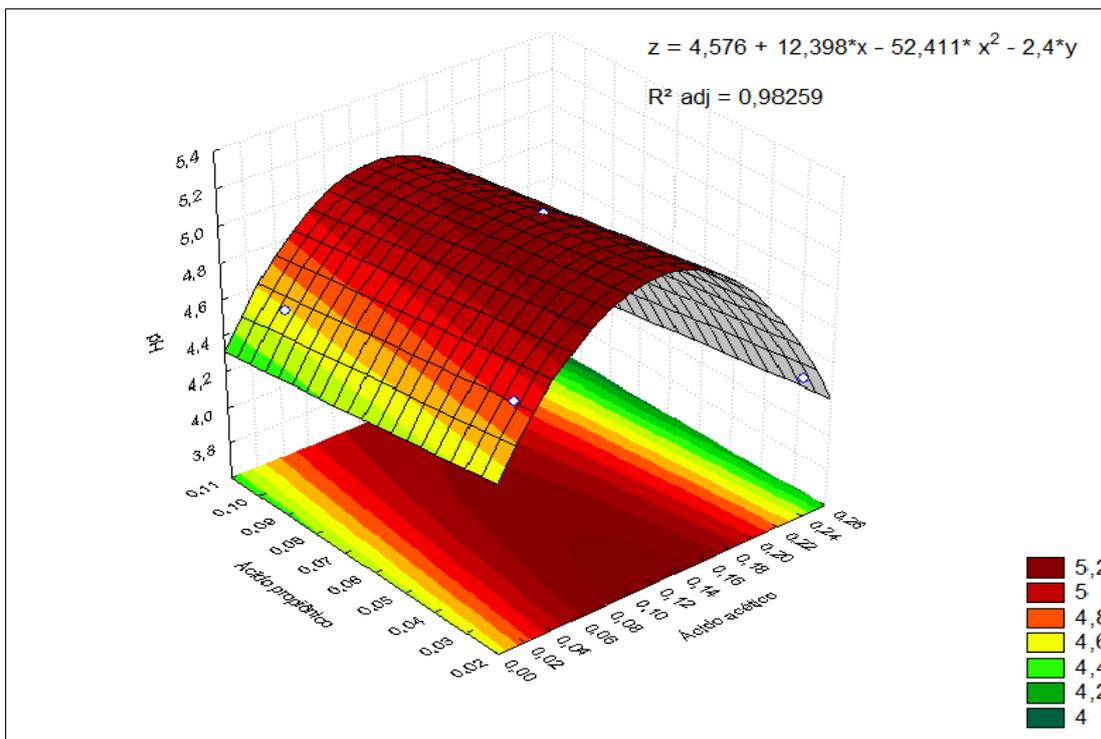


Gráfico 3- Níveis de pH de acordo com a concentração de ácido acético x ácido propiônico.

Fonte: Autora

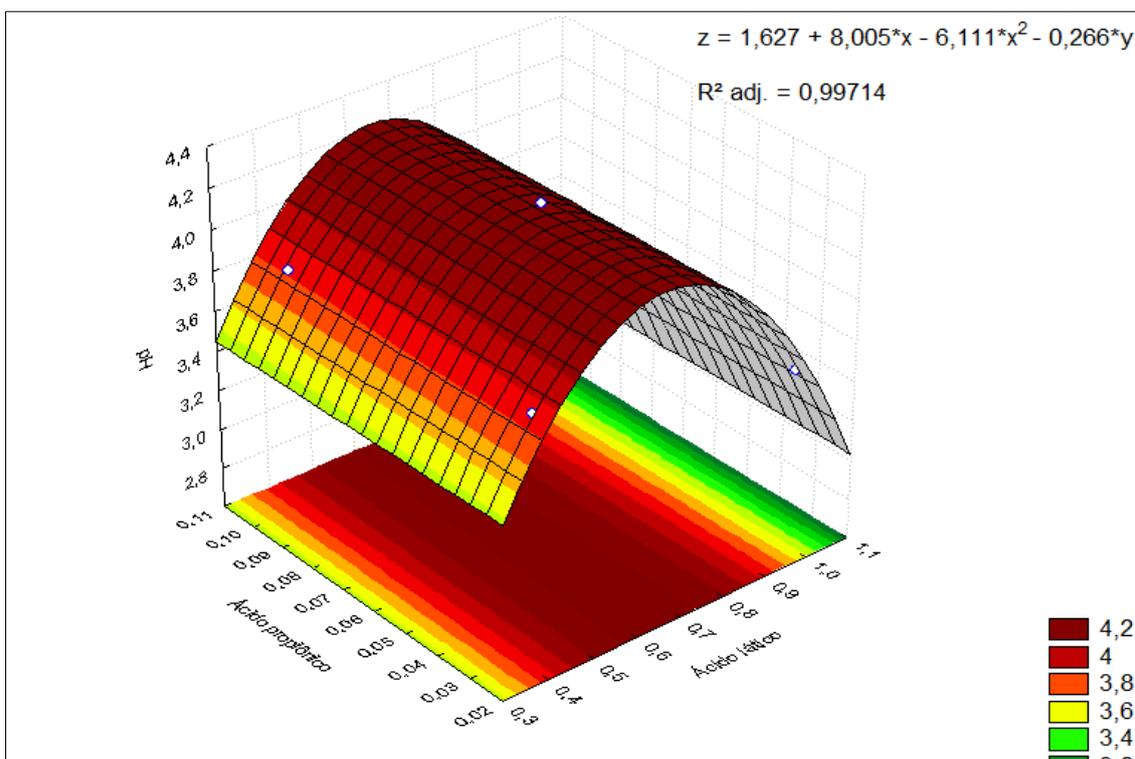


Gráfico 4- Níveis de pH de acordo com a concentração de ácido láctico x ácido propiônico.

Fonte: Autora

### 5.3 EFEITO DAS COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA INIBIÇÃO DE *A. flavus* E NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINA.

As combinações dos ácidos foram aplicadas contra *A. flavus* NRRL 3251 que é produtor de aflatoxina B<sub>1</sub> (CVETNIĆ e PEPELJNJAK, 2007). A Tabela 7 mostra que houve inibição total do desenvolvimento fúngico na maioria das combinações testadas. As combinações de 0,05 % + 0,05 (ácido acético + propiônico); 0,8 + 0,05 % (ácido láctico + propiônico) apresentaram contagem de bolores de  $6,85 \times 10^2$  e  $1,27 \times 10^2$  UFC/mL, respectivamente. Comparando com o controle que apresentou  $2,67 \times 10^2$  UFC/mL, ácido acético + propiônico (0,05 + 0,05 %), apresentou contagem fúngica superior a este, indicando menor atividade antifúngica desta combinação. No entanto, deve-se ressaltar que foi aplicada um inóculo  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> neste experimento, indicando que após o período de incubação houve um menor desenvolvimento dos esporos para formação das colônias de *A. flavus*, inclusive no controle, sem aplicação de ácidos.

Tabela 7 - Efeito das combinações de ácidos orgânicos na inibição de *A. flavus* e na produção de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Combinações	Concentração %	<i>A. flavus</i> (UFC/mL)	pH	Acidez % (v/m)	Aflatoxina B <sub>1</sub>
Controle	0	$2,67 \times 10^2$	$6,37 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	n.d.
Ácido acético	0,05 + 0,05	$6,85 \times 10^2$	$4,41 \pm 0,01$	$1,18 \pm 0,02$	n.d.
+	0,5+0,05	i.n.d.	$3,83 \pm 0,00$	$1,27 \pm 0,02$	N.D.
Ácido propiônico	0,25 +0,025	i.n.d.	$4,13 \pm 0,00$	$0,84 \pm 0,02$	N.D.
Ácido láctico	0,8 + 0,05	$1,27 \times 10^2$	$3,17 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,02$	n.d.
+	0,8 + 0,2	i.n.d.	$3,15 \pm 0,01$	$1,29 \pm 0,03$	N.D.
Ácido propiônico	0,4 +0,1	i.n.d.	$3,33 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,00$	N.D.

i.n.d: inibição não detectada; n.d: não detectado; N.D.: Não Determinado ; Valores de pKa: Ácido Propiônico (4,88), acético (4,75), láctico (3,88).

Fonte: Autora

Os valores de acidez e o pH das combinações dos ácidos orgânicos estão apresentados na Tabela 7. Todas as combinações apresentaram diferenças em relação aos valores de pH e de acidez titulável quando comparados cada dupla de

ácidos combinados e o controle. As combinações de ácido propiônico + acético foram eficientes abaixo de pH 4,13. Nas combinações de ácido propiônico + ácido láctico houve inibição abaixo de pH de 3,33. Conforme esperado, o teor de acidez das combinações foi proporcional à concentração dos ácidos, quanto maior a concentração maior a acidez, indicando pouca interferência no meio nos valores de acidez.

A extração de aflatoxina foi realizada após 15 dias de incubação das placas com inóculo de *A. flavus* NRRL3251 e as combinações de ácidos, e apenas nas placas em que houve crescimento fúngico que correspondem a combinação de 0,05% x 0,05% (acético x propiônico), 0,8 % e 0,05 % (láctico x propiônico) e o controle de *A. flavus*. A cromatografia em camada delgada (CCD) revelou que em nenhuma amostra foi detectada a aflatoxina B<sub>1</sub>, inclusive o controle *A. flavus* sem a adição de ácidos. A menor concentração do padrão foi de 2,5 µg/kg. A análise prévia desta cepa mostrou que a mesma expressou a produção de aflatoxina (HASHIMOTO, et al. 2015). No entanto, sabe-se que algumas cepas toxigênicas podem deixar de expressar os genes responsáveis pela codificação das enzimas produtoras de micotoxinas *in vitro*. Os fatores responsáveis são a forma de manutenção do micro-organismo que é realizado através de repicagens sucessivas que podem mudar o micro-organismos morfológicamente e fisiologicamente em meio Agar Batata Dextrose (BDA) e o longo período de armazenamento (BERND et al., 2011).

Neste trabalho, em meio BDA não foi detectado a produção de aflatoxina, existem vários substratos que induzem o *A. flavus* a produzir aflatoxina um dos meios de cultura bastante utilizado é o meio Ágar Coco que tem como principal ingrediente leite de coco, rico em ácidos graxos, sendo realizado para fornecer melhores condições para a produção de aflatoxina e favorecer a detecção de fluorescência. (BIZZETTO; HOMECHIN; DESTRO, 1997).

#### 5.4 APLICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS COMBINADOS EM RAÇÃO BOVINA PELETIZADA COM MELAÇO EXTERNO ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA.

Para a análise dos ácidos orgânicos combinados em ração bovina peletizada foram realizadas as análises microbiológicas nos períodos de 7, 15 e 30 dias, os resultados estão apresentados na Tabela 8. Esse controle do crescimento microbiológico foi realizado para demonstrar a eficiência dos ácidos orgânicos na aplicação em alimentos.

Tabela 8 - Controle de bolores e leveduras em ração bovina peletizada com melaço externo adicionado de ácidos orgânicos.

T	Af* (esp.g <sup>-1</sup> )	AP (%)	AC (%)	Contagem (UFC.g <sup>-1</sup> )					
				7 dias		15 dias		30 dias	
				A.flavus	Total**	A.flavus	Total**	A.flavus	Total**
1	10 <sup>3</sup>	0,025	0,25	1,67 x 10 <sup>2</sup>	1,67 x 10 <sup>2</sup>	1,67 x 10 <sup>1</sup>	5,00 x 10 <sup>1</sup>	2,50 x 10 <sup>1</sup>	6,80 x 10 <sup>1</sup>
2	-	0,025	0,25	n.d.	5,00 x 10 <sup>1</sup>	n.d.	4,67 x 10 <sup>1</sup>	n.d.	3,16 x 10 <sup>1</sup>
3	10 <sup>3</sup>	0	0,25	3,33 x 10 <sup>2</sup>	4,33 x 10 <sup>2</sup>	1,56 x 10 <sup>2</sup>	1,56 x 10 <sup>2</sup>	n.d.	1,80 x 10 <sup>1</sup>
4	-	0	0,25	n.d.	2,17 x 10 <sup>2</sup>	n.d.	1,66 x 10 <sup>1</sup>	n.d.	5,00 x 10 <sup>0</sup>
5	10 <sup>3</sup>	0,025	0	n.d.	3,00 x 10 <sup>2</sup>	n.d.	9,33 x 10 <sup>1</sup>	n.d.	3,16 x 10 <sup>1</sup>
6	-	0,025	0	n.d.	2,17 x 10 <sup>2</sup>	n.d.	5,33 x 10 <sup>1</sup>	n.d.	1,17 x 10 <sup>1</sup>
7	10 <sup>3</sup>	0,5	0	n.d.	2,30 x 10 <sup>2</sup>	n.d.	5,67 x 10 <sup>1</sup>	2,00 x 10 <sup>1</sup>	2,30 x 10 <sup>1</sup>
8	-	0,5	0	n.d.	1,00 x 10 <sup>2</sup>	n.d.	1,67 x 10 <sup>1</sup>	n.d.	5,00 x 10 <sup>0</sup>
9	10 <sup>3</sup>	0	0	1,50 x 10 <sup>2</sup>	1,83 x 10 <sup>2</sup>	n.d.	6,50 x 10 <sup>1</sup>	1,00 x 10 <sup>0</sup>	2,66 x 10 <sup>1</sup>
10	-	0	0	n.d.	1,78 x 10 <sup>3</sup>	n.d.	1,83 x 10 <sup>1</sup>	n.d.	1,00 x 10 <sup>0</sup>

\* *A. flavus* inoculado; \*\* Contagem total de bolores e leveduras; n.d: não detectado (crescimento fúngico).

Tratamentos: 1 e 2: Combinação A. propiônico + A. acético; 3 e 4: Controle de A. acético; 5 e 6: Controle A. propiônico; 7 e 8: Controle A. propiônico comercial; 9 e 10 Controle sem ácido; - : sem inóculo.

Fonte: Autora

Ao observar os resultados das análises microbiológicas no período de 7 dias nos tratamentos que foram contaminados artificialmente com *A. flavus* (1, 3, 9) houve o crescimento fúngico de até 10<sup>2</sup> UFC/g mesmo no controle, com exceção do tratamento 5 e 7 onde não se observou crescimento da cepa. O fato se deve ao método de inóculo, no qual alguns peletes foram inoculados e misturados ao restante da ração, assim na amostragem inicial, a falta de homogeneização da amostra (que não foi triturada para análise) possivelmente não foram selecionados peletes contaminados na amostragem da análise microbiológica, além disso, os esporos adicionados não foram capazes de contaminar o restante da amostra de ração. Já a

presença de outros micro-organismos na ração é devido a análise ter sido realizada sem esterilizar a ração.

No período de 15 dias em todos os tratamentos foi observado que houve um decréscimo na população fúngica em relação ao período 7 dias. Todas as amostras foram reduzidas de  $10^2$  UFC/g para  $10^1$  UFC/g com exceção do tratamento 3 que continuou com  $10^2$  UFC/g, mas que apesar de permanecer na mesma escala logarítmica teve redução do seu crescimento de  $4,33 \times 10^2$  UFC/g (contagem total) e de  $3,33 \times 10^2$  (*A. flavus*) para  $1,56 \times 10^2$  UFC/g em ambas as contagens.

No período de 30 dias na maioria dos tratamentos não houve crescimento de *A. flavus* apenas no tratamento 1 com  $2,50 \times 10^1$  UFC/g, tratamento 7 com  $2 \times 10^1$  UFC/g e tratamento 9 com  $1 \times 10^0$ . Comparando os resultados ao período do dia 15 é possível observar que para a contagem total e a contagem de *A. flavus* o crescimento ficou entre  $10^1$  e  $10^2$  UFC/g já no período 30, entre  $10^1$  e  $10^0$  UFC/g, o que demonstra que os micro-organismos principalmente o *A. flavus* não encontraram na ração um ambiente ideal para se desenvolver, a ausência de crescimento nesse caso, não pode ser associada a aplicação dos ácidos existem inúmeros interferentes que podem, ter inibido o crescimento, como pH, atividade de água (Aa), umidade, temperatura, umidade relativa entre outros (FRANCO, LANGRAF, 2001; PITT; HOCKING, 1997).

#### 5.4.1. Caracterização físico-química ração bovina peletizada com melaço externo contaminada artificialmente.

Além da contagem de bolores e leveduras foram analisados o pH, atividade de água e umidade das amostras de ração peletizada adicionadas de ácidos orgânicos e artificialmente contaminadas com *A. flavus*, conforme apresenta a tabela 9. As análises foram realizadas no tempo zero (amostras 2, 6, 8 e 10) e no período de 30 dias (amostras 1-10) a fim de avaliar a influência destes parâmetros ao longo do período de armazenamento.

O pH no tempo zero variou de 6,24 a 6,37, enquanto que após 30 dias as amostras apresentaram pH variando de 6,35 a 6,42. Os constituintes da ração interferiram diretamente nos valores de pH, sendo que em nenhum tratamento foi

possível atingir valores de pH inferiores ao pKa dos ácidos aplicados. No entanto, vale ressaltar que os ácidos foram aplicados no melaço externo ao pelete o que pode conferir uma barreira ao desenvolvimento fúngico. O pH do melaço utilizado na análise foi de 5,58, ele também tem a capacidade de baixar o pH, porém não foi o suficiente para atingir o pH da CIM e nem o pka dos ácidos.

Tabela 9- Determinação de pH, Aa e umidade dos tratamentos utilizados na ração bovina peletizada com melaço externo

T	pH		Umidade (%)		Aa	
	0 dias	30 dias	0 dias	30 dias	0 dias	30 dias *
1	N.D.	6,42 ± 0,07	N.D.	10,96 ± 0,24	N.D.	0,52 ± 0,24
2	6,26 ± 0,03	6,37 ± 0,01	11,14±0,38	11,06±0,43	0,60 ±0,01	0,51 ± 0,13
3	N.D.	6,35 ± 0,01	N.D.	11,23 ±0,40	N.D.	0,52 ± 0,12
4	N.D.	6,35 ± 0,01	N.D.	10,72 ±0,16	N.D.	0,53 ±0,37
5	N.D.	6,41 ± 0,01	N.D.	10,37± 0,18	N.D.	0,50 ±0,30
6	6,37 ± 0,04	6,41 ± 0,03	11,26±0,30	10,99± 0,21	0,61±0,01	0,53 ± 0,33
7	N.D.	6,35± 0,02	N.D.	10,74± 0,47	N.D.	0,54±0,33
8	6,24 ± 0,02	6,42 ± 0,04	11,17±0,12	10,66±0,21	0,60±0,01	0,54 ±0,53
9	N.D.	6,41 ± 0,08	N.D.	10,91 ± 0,27	N.D.	0,54 ±0,32
10	6,36 ± 0,05	6,37 ± 0,05	11,48±0,38	11,20 ± 0,26	0,59 ±0,01	0,56 ±0,46

T: tratamento; N.D.: não determinado;

\* dias; 1 e 2: Combinação A. propiônico + A. acético; 3 e 4: Controle de A. acético; 5 e 6: Controle A. propiônico; 7 e 8: Controle A. propiônico comercial; 9 e 10 Controle sem ácido.

Fonte: autora

Em relação a umidade é possível verificar que ao longo de 30 dias não houve muita variação. O único tratamento que mostrou mudança foi o 6 (Controle A. propiônico 0,025 %, sem inóculo), o mínimo encontrado entre as amostras foi de 10,72 % (Tratamento 4) e o máximo de 11,48 % (tratamento 10) essa faixa de umidade é muito baixa para o crescimento fúngico. A umidade é importante para a estabilidade do alimento quanto menor for a umidade em um alimento menor a deterioração, diminui a suscetibilidade aos micro-organismos inclusive o fungo.

Na determinação na atividade de água (Aa) houve variação significativa das amostras do tempo zero comparado ao tempo 30 dias. Durante esse período houve uma redução nos valores de Aa, o valor máximo encontrado foi de Aa= 0,61 (T6 no

tempo zero), e o valor mínimo encontrado foi de  $Aa = 0,51$  (T2, 30 dias). Ainda vale ressaltar que estes valores são considerados muito baixos para o crescimento fúngico.

A  $Aa$  é a água disponível para reações e crescimento de microrganismos, ou seja, corresponde a água livre em que os micro-organismos se desenvolvem. No caso dos fungos deteriorantes a  $Aa$  mínima para o seu desenvolvimento é de 0,80  $Aa$  e fungos xerofílicos,  $Aa > 0,65$ . Especificamente para *A. flavus* é relatado na literatura uma  $Aa > 0,78$ , neste sentido os valores de  $Aa$  de 0,51 a 0,61 encontrados no período na análise do presente estudo, foram inferiores às condições mínimas para o desenvolvimento fúngico (FRANCO, LANGRAF, 2001; PITT, 1975).

#### 5.4.2 Controle de umidade relativa e temperatura de armazenamento da ração peletizada tratadas com ácidos orgânicos e contaminada artificialmente.

Ao longo do experimento da ração peletizada tratadas com ácidos orgânicos e contaminada artificialmente foi realizado o acompanhamento da temperatura e da umidade relativa da estufa na qual as amostras foram armazenadas. No gráfico 5 estão dispostos os dados da temperatura e da umidade relativa (% UR).

Os fatores temperatura e UR influenciam um ao outro e são essências para o crescimento fúngico. Embora a estufa BOD tenha sido regulada para a temperatura de 25°C, observa-se que ao longo dos 30 dias houve uma variação de 24,9 e 27,7 °C. Esta faixa de temperatura é ideal para o desenvolvimento de *Aspergillus*.

A umidade relativa interfere diretamente na atividade de água (perda ou ganho de água) quando um alimento estiver em ambiente com a UR superior a atividade de água a tendência do mesmo é absorver a umidade do ambiente até entrar em equilíbrio, já quando a UR for inferior a tendência é o alimento perder água para a umidade do ambiente. (FRANCO, LANGRAF, 2001). A UR variou de 58 a 72 % ao longo do período, indicando que as condições da estufa BOD não foram devidamente estabilizadas, sendo que essa variação se deu devido às alterações climáticas do período de experimento, em dias de chuva observou-se um aumento da UR. Ainda assim, esta variação na UR relativa pouco influenciou na atividade de água das amostras. Para fornecer condições de  $Aa$  para o desenvolvimento do *A. flavus* seria recomendado a estabilização da estufa próximo a 80 % de UR, considerando que a

Aa poderia se estabilizar próximo a Aa 0,8, nestas condições. E assim poderia ser observado o efeito dos ácidos orgânicos e suas combinações na ração armazenada. Neste caso, a baixa Aa e UR representaram a principal barreira para o desenvolvimento fúngico.

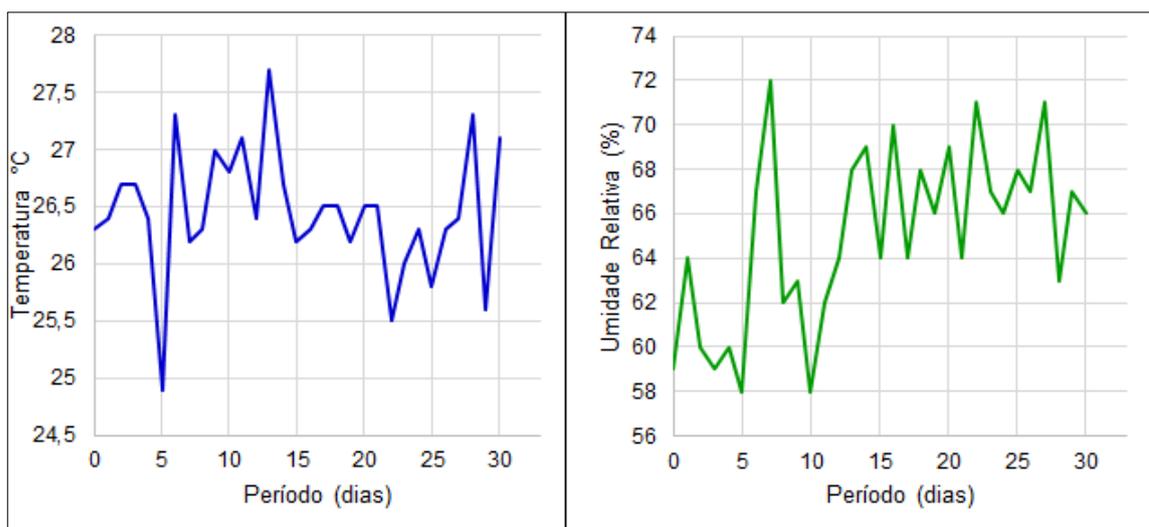


Gráfico 5- Controle de temperatura Umidade relativa de incubação das amostras de ração

Fonte: Autora

## 6. CONCLUSÃO

No estudo *in vitro*, com os ácidos orgânicos isolados (lático, acético e propiônico) contra *A. flavus* NRRL 3251 e *A. ochraceus* A 152 a melhor atividade foi de 0,2% para o ácido propiônico e 0,5 % para o ácido acético para ambas as cepas. Entre as combinações dos ácidos orgânicos contra *A. flavus* a melhor mistura foi 0,025 + 0,25 % de ácido propiônico + acético. A combinação demonstrou que em sinergismo as concentrações dos ácidos podem ser reduzidas. Neste experimento não foi possível verificar o efeito dos ácidos na produção de aflatoxina pela cepa *A. flavus* NRRL 3251, devido à falta de expressão gênica, possivelmente devido a problemas na manutenção por repicagens repetidas utilizadas na conservação da cepa ao longo do tempo. Na aplicação da combinação do ácido acético e propiônico em ração peletizada artificialmente contaminada com *A. flavus* não foi possível avaliar a ação dos ácidos por não ter ocorrido o desenvolvimento do fungo em razão da baixa atividade de água encontrada na ração. Os dados encontrados mostram que a aplicação de ácidos orgânicos combinados pode ser uma alternativa eficiente de inibir a ação de *Aspergillus* spp. Embora os estudos *in vitro* forneçam importantes informações sobre as concentrações para controle de fungos os estudos aplicados em alimentos requerem adaptações para comprovar os efeitos observados *in vitro*. Os estudos aplicados devem considerar os fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento a que se destina o uso dos conservantes, a fim de garantir a qualidade e segurança do alimento ao longo da sua vida de prateleira.

## REFERÊNCIAS

- ALCANO, María de J et al. Susceptibility of *Aspergillus* spp. to acetic and sorbic acids based on pH and effect of sub-inhibitory doses of sorbic acid on ochratoxin A production **Food Research International**. Santa Maria, RS, [s.l.], v.81, 25 -30, 2016
- AMAIKE, Saori; KELLER, Nancy P. *Aspergillus flavus*. **Annual News of Phytopathology**. Madison, v.49, p. 107-133, 2011.
- AMÈSQUETA, Samez et al. OTA-producing fungi in foodstuffs: a review. **Food Control**. [s.l.], v.26, n.2, p. 259 – 268, 2012.
- ARAÚJO, Júlio. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5 ed. Viçosa: UFV, 2012.
- BALTES, Werner. **Química de los alimentos**. 5 ed. Zaragoza: ACRIBIA S. A., 2007.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4 ed. Berlim: Springer, 2009.
- BELTRAME, CEZAR A. **Avaliação da eficiência de sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação de Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2009.
- BERND, Luciana p; et al. Manutenção laboratorial na produção de fumonisina por *Fusarium verticillioides* isolado de intoxicação animal. **Biosaúde**, Londrina, v. 13, n. 12, 201.
- BIZZETO, Adilson; HOMECHIN, Martin; DESTRO, Deonísio. Comparação de substratos utilizados para detecção de toxinas produzidas por *Aspergillus flavus* em soja. **Revista UNIMAR**. Maringá, v. 19, n. 4, p.709 -719, 1997.
- BLANKSON, G. K.; MILL-ROBERTSON, F. C. Aflatoxin contamination and exposure in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in greater Accra, Ghana. **Food Control**. Gana, v.64, n.1, p.212 -217, 2016.

BORDONI, Jaqueline G. et al. Impacto das fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxina na avicultura. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**. Londrina, v. 2, n. 1, p. 68 -88, 2013.

BRASIL, Decreto nº7, de 18 de fevereiro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 fev.2011. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10269e8043ec6fc2af60ef6b7f09096frdc0007\\_18\\_02\\_2011.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10269e8043ec6fc2af60ef6b7f09096frdc0007_18_02_2011.pdf?MOD=AJPERES)> Acesso em: 15 de maio de 2016.

BRIDEN, Wyine L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**. Queensland, v. 173, p. 134 -158, abr., 2012.

CALDAS, Eloisa D.; SILVA, Saulo C.; OLIVEIRA, João. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319 -323, 2002.

CAMILI, Elisangela C. et al. Vaporização de ácido acético para o controle pós-colheita de *Botrytis cinerea* em uva 'Itália' **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 436 -443, Junho, 2010.

CARDOZO FILHO, Francisco das C.; CALDAS, Mikaela L. de; MURATORI, Maria C. S. Fungos e aflatoxina em cereais: Uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**. v. 2, n. 2, p.122-130, 2015.

CARVALHO, Walter et al., Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. **Revista Analytica**. São Paulo, n. 18, p. 70 -76, ago. set., 2005.

CASTRO, Fabiane L. F. **Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostra de grãos de milho**. 2011. 43f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CASTELLARI, Claudia C. et al. Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. **Revista Argentina de microbiologia**. Argentina, v.47, n.4, p. 350-359, 2015.

COPETTI, Mariana V. et al. Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. **Food Control**. Santa Maria RS, v.26 n.1, p. 36 -41, 2012.

COSTA, Herika R. de S. **Riscos associado ao consumo de micotoxinas**. 2014. 37f. Monografia (Curso de Farmácia) - Centro Universitário Luterano de Palmas. Palmas, 2014.

CRUS, MARIA L. F.; MANSILLA, MARCIA L.; TADEO, JOSÉ L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**. Egito, v.1, n.2, p. 113 -122, abr., 2010.

CVETNIĆ, Zdenka; PEPELJNJAK, Stjepan. Interaction between certain Moulds and Aflatoxin B<sub>1</sub> Producer *Aspergillus flavus* NRRL 3251, **Archives of industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 58, n. 4, p. 429- 434, 2007).

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DIDWANIA, Nidhi; JOSHI, Manisha. Mycotoxins: a critical review on occurrence and significance. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. [s.l.], v. 5, n. 3, p.1014 -1019, 2013.

DUARTE, Thamara De L. **Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica**. 2010. 41f. Monografia (Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

DUARTE, Sofia C, et al. Determinants of ochratoxin A exposure—A one year follow-up study of urine levels. **Internacional Journal of Hygiene and Environmental Health**. Portugal, v.215, n.3, p.360-367, 2012.

DRUMOND, Vera L.M. M. **Presença de aflatoxinas em arroz e cereais Importados na União Europeia - Revisão bibliográfica e análise de dados RASFF**. 2012. 132f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2012.

ESPOSITO, Elisa; AZEVEDO, João L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias Do Sul – RS: Educs, 2010.

FELTRE, Ricardo. **Química**. 6 ed. São Paulo: Moderna, 2004.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 6 ed. Porto alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, Bernadete D.G. de M.; LANGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

FRANCO, Luciana G. **Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador de desempenho em frangos de corte**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

FREESE, E. et al. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v.241, p.321-325, 1973.

FREIRE, Francisco das C. O. et al. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Documentos 110**. 2007. 48f. Embrapa agroindústria tropical, Fortaleza, 2007.

GRIGOLETTI, Celso. **Associação de ácidos orgânicos no controle de fungos em grãos de milho armazenados**. 2007. 63f. Tese (Doutorado em ciências Agrárias) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GONZALEZ, Maria de J. A. **Suscetibilidade de *Aspergillus spp* aos ácidos orgânicos conforme pH e a influência destes sobre a produção de ocratoxina A**. 2004. 74f. Dissertação (Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

HASSAM, Ramadan; EL-GADI, Sherif; SAND, Mostafa. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. **International Journal of Advances in Biology**. Índia, v.2, n.1, 2015

HASHIMOTO, Elisabete H. et al. Manutenção e reativação de linhagens de Microrganismos padrões IN: Workshop de Ciência, Tecnologia e Inovação.3. 2015. Francisco Beltrão: **Anais: AMSOP** – Associação dos municípios do sudoeste do Paraná, 2015.

IAMANAKA, Beatriz T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, Marta H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p.138 -161, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 25-26.

\_\_\_\_\_. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27.

KLEIN, A. Peletização de Rações Aspectos Técnicos Custo e Benefício e Inovações Tecnológicas. Conferência: FACTA de Ciência e Tecnologia Avícola 21º. **Anais: Congresso Brasileiro de Avicultura**, 2009.

KRÜGER, Cesar Daniel et al. Níveis séricos de ocratoxina A lesões em suínos no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, v.37, n.3, p.198 -202, 2015.

KÓSZEGI, Tamás; POÓR, Miklós. Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. **MDPI**. Hungria, abr. 2016. Toxins. p.111.

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LAI, Xianwen et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. **Food Control**. China, v.50, p. 401-404, 2015.

LÁZZARI, Flávio A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: Editora Paloti, 1993.

LI, Songli et al. Occurrence of Aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milks in China in 2014 -2015. **Food Control**. China, v. 78, p. 94 -98, 2017.

LONDOÑO, Victor A. G. et el. Aflatoxin M1 survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. **Food Control**. Argentina, v.34, n.2, p.752 - 755, 2013.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Micotoxins in food: detection and control**. Cambridge: CRC Press, 2004.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**. v. 60, n.1, p.218 -237, 2013.

MARROQUIN-CARDONA, A. et al. Mycotoxins in a changing global environment – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 69, n., p. 220 – 230, 2014.

MASOOD, Muhammad et al. Natural occurrence of aflatoxins in dry fruits and edible nuts. **Food Control**. Paquistão, v. 55, p. 62 -65, 2015.

MATHUR, Pooja B. et al. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. **Plant Science**, Telangana, p.119 -132, fev., 2015.

MAZIERO, Maike T.; BERSOT, Luciano dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n. 1, p. 89 -99, 2010.

MEDEIROS, Henrique V. de et al. Biological control of mycotoxin-producing molds. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, v. 36, n. 5, p. 483 -497, set.out., 2012.

MOTTA, Thiago P. et al. Estudo sobre a ocorrência de fungos e Aflatoxina B<sub>1</sub> na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. São Paulo, v. 34, n.1, p. 23 -28, 2015.

OGA, Seizi; CAMARGO, Márcia M. de A.; BATISTUZZO, José A. de O. **Fundamentos de toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, et al. Principais micotoxinas que afetam a produção de alimento. **RAMVI**, Getúlio Vargas, v. 02, n. 03, Jan. Jul., 2015.

OLIVEIRA, Alessandra V. de; et al. Maringá. **Revista Biotemas**, v. 28, n.1, p.13-19, mar., 2015.

PAYNE, J.; RATTINK, W.; WINOWISKI. **A guide for production staff in the compound feed industry**. Pelleting handbook. Nova york, 2001.

PELÁEZ, León A.M. et al. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. **Food Control**. [s.l.], v. 24, n. 1-2, p. 177 -183, março, 2012,

PELCZAR, Michael et al. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PELUQUE, Erika. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais comercializados no Brasil**. 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2014.

PEREIRA, Kelly C.; SANTOS, Carlos F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico **Ensaio e Ciência**. Campo Grande, v. 15, n. 4, p.147 -165, 2011.

PINOTTI, Luciano et al. Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal by products. **Toxins**. Suíça, v.8, n.2, p. 45. 2016.

PITT, John L., **Water relations of foods**.7 ed. Nova Iorque: Academic Press, 1975.

\_\_\_\_\_; HOCKING, Ailsa. D. **Fungi and food spoilage**. 3 ed. London: Blackie Academic, 1997.

PRADO, Guilherme. Contaminação de alimentos por micotoxinas no Brasil e no mundo. **Revista de Saúde Pública do SUS**. Minas Gerais, v.2, n.2, p.13 -26, 2014.

REBONATO, Bianca. **Ácidos orgânicos visando melhoria do shelf life de rações peletizadas com melaço externo**. 2017. 65f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos- Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal Paraná, Londrina, 2017.

REZENDE, Elisângela de F. et al. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.44, n.2, p.377 -384, 2013.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**. Oxford, v.82, n.4, p. 632–639, 2003.

RITTER, Carolina; HOELTZ, Michele; NOLL, Isa B. Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. **Ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, v. 31, n. 3, p. 623 -628, jul. set., 2011.

ROCHA, Fernando da S. et al. Danos causados por diferentes potenciais de inóculo de *Aspergillus ochraceus* no vigor de sementes de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 2895, nov.dez., 2014.

RODRÍGUEZ, A. et al. Detection of filamentous fungi in foods. **Science Direct**. Cáceres, v.5, n. 10003, p. 36 -42, 2015.

RUSSO, Pasquale et al. Metabolites of Microbial Origin with an Impact on Health: Ochratoxin A and Biogenic Amines. **Frontiers in Microbiology**. Foggia, v.7, n.482, abr., 2016.

SAKATA, Renata A. P.; SABBAG, Sandra P.; MAIA, Tatiane L. S. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.7, n.13, p. 1478, nov., 2011.

SÁNCHEZ, Gomes A. Tecnología de osbstáculos como método de inibición del crecimiento de mohos em alimentos. **Temas Selectos De Ingenieria de Alimentos**. Puebla, v.2 n.2, p.52-68, 2008.

SANTANA, Márcia C. A. Principais tipos de micotoxinas encontradas nos alimentos de animais domésticos. **REDVET - Revista electrónica de Veterinária**. Espanha, v.13, n.7, 2012. Disponível em< file:C:\Users\ClienteDesktopcontrole%20de%20micotoxinas071212.pdf> Acessado em 27 de janeiro de 2017.

SAUSEN, Lourenço. **Uso de blend de ácidos orgânicos no controle da disseminação de *Salmonella Heidelberg* em frangos de corte**. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2015.

SARIGIANNIS, Yiannis et al. Concentrações de ocratoxina A nos vinhos gregos de venda a retalho. **Food Control**. Grécia, v. 42, p.139 -143, 2014.

SCAGLIONI, Priscila T. Aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in milk. **Analytica Chimica Acta**. Paraná, v. 829, p.68 -74, 2014.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8 ed. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SENGUN, Ilkin Y., KARABIYIKLI Seniz. Importance of acetic acid bacteria in food industry. **Food Control**. [s.l.], v. 22, p. 647 -656, 2011.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL - SINDIRAÇÕES. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. 3.ed. São Paulo: Sindirações, 2013.

SILVA, Janaina L. da. et al. Identification of toxigenic *Aspergillus* species from diet dairy goat using a polyphasic approach. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.45, n.8, p.1466 -1471, 2015.

SILVA, Neusely da S. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVEIRA, Mirim F. A. **Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**.2005. 64f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) -Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ- AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-64 layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**. [s.l], v. 72, n. 1, p. 22 -26, 1989.

SOBCZAK, Wioleta Z. et al. Health risks associated with exposure to fungi. **Science Direct**, Poland, v. 7, p. 313 -317, dez., 2015.

STRATFORD, M.et al. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Jornal Internacional de Microbiologia de Alimentos**, v. 16, p.164-171. 2013.

SUHR, Karin I; NIELSEN, Per V. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. **International Journal of Food Microbiology**. [s l.], v. 95, p. 67 -78, set., 2004.

TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAVAGLIA, Diana P. **Crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes temperaturas**. 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de pós-graduação de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

TROMBETE, Felipe M.; FRAGA, Marcelo E.; SALDANHA, Tatiana. Contaminação de queijos por aflatoxina M1: uma abordagem sobre a ocorrência e prevenção. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 392, p. 40-48, 2013.

UNIÃO EUROPEIA, decreto nº165 de 26 de fevereiro de 2010. Aprova o Regulamento que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas. Jornal Oficial da União Europeia, Bruxelas, 26 fev. 2010. Disponível em: < [http://www.esac.pt/noronhalegislalimentarregulamento\\_165\\_2010\\_aflotoxinas.pdf](http://www.esac.pt/noronhalegislalimentarregulamento_165_2010_aflotoxinas.pdf) > Acesso em: 15 de maio de 2016.

URBANO, Gisele R. **Ocorrência e desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* em café e a influência da torração e do preparo da infusão nos níveis de ocratoxina A**. 2002. 86f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

VITORINO, Orlanda C. L. **Micotoxinas na alimentação e na saúde animal e humana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

WEISS, Jochen; LOEFFLER, Myriam; TERJUNG, Nino. The antimicrobial paradox: why preservatives lose activity in foods. **Current Opinion in Food Science**, Alemanha, v. 4, p. 69-75, 2015.

ZAIN, Mohamed E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, Arabia Saudita, 30 de jun. 2011. p.129 -144.

ZANELATO, Ewerton A. **Utilização de ácidos orgânicos como substitutos a antibióticos promotores de crescimento para frangos de corte**. 2009. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.