

DANIEL FRANCIS RIBEIRO

**OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E DE DEGRADAÇÃO DE
MICOTOXINAS EM HÍBRIDOS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R484o
2016
Ribeiro, Daniel Francis, 1987-
Ozônio como agente fungicida e de degradação de
micotoxinas em híbridos de milho / Daniel Francis Ribeiro. –
Viçosa, MG, 2016.
xi, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Milho - Efeito do ozônio. 3. Milho -
Fisiologia pós-colheita. 4. Milho - Qualidade. 5. Fungos.
6. Fungicida. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Engenharia Agrícola. Programa de Pós-graduação em
Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.15

DANIEL FRANCIS RIBEIRO

**OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E DE DEGRADAÇÃO DE
MICOTOXINAS EM HÍBRIDOS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 08 de abril de 2016

Fernanda Fernandes Heleno

Paulo Roberto Cecon

Marco Aurélio Guerra Pimentel
(Coorientador)

Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)

DEDICO

**A Deus e aos meus queridos pais,
José Geraldo e Mônica, meus exemplos de vida.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder saúde, disposição e permitir crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) e a Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Dra. Lêda Rita D'Antonino Faroni pela orientação, confiança, conhecimentos transmitidos e oportunidades concedidas desde a graduação.

Ao coorientador Dr. Marco Aurélio Guerra Pimentel por acreditar em meu potencial, pela oportunidade, pela valiosa ajuda, pelos conhecimentos transmitidos e, especialmente, pela convivência.

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo Dr. Luciano Cota e Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz que muito contribuíram nos ensinamentos sobre *Fusarium verticillioides* e micotoxinas.

Aos meus amigos do laboratório da Embrapa Milho e Sorgo: Ana Cecília, Sílvia, Júnia, Dayane, Aline, Juliane, Randel, Rafaela, Elaine, Fred, Fabrício, que me ajudaram na condução dos experimentos e sugestão de ideias.

Aos funcionários da Embrapa Milho e Sorgo: Osni (técnico do laboratório de patologia de sementes), Rafael (técnico do laboratório de segurança alimentar), Clovis (técnico do laboratório de fitopatologia), Carlinhos (técnico do laboratório de composição centesimal), Fabiane (gestora de laboratórios) e Osana que foram essenciais na condução dos experimentos. Agradeço também pela amizade e convívio.

À Patrícia pela paciência e incentivo. Seu suporte foi fundamental para a execução deste trabalho.

À Handina, pela amizade e companhia durante as disciplinas. Você foi um exemplo de coragem e superação.

Aos amigos: Raquel, Juliane e Zenil. Isso só foi possível por causa de vocês. Vocês foram mais que amigos, foram irmãos. Muito obrigado pela companhia.

Aos amigos e colegas de departamento: Lauana, Lucas, Fernanda, Luís, Cissa,

Paulo, Eridiane, Marcus Vinícius, Jaqueline e Amanda.

Aos funcionários do Setor de Armazenamento do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV pelo apoio, incentivo e disponibilidade em ajudar: Moisés, José Geraldo, Édson e José Eustáquio.

Aos grandes amigos Vinicius, Chinelo e Filipe pelo apoio, incentivo, amizade e parceria ao longo dos últimos anos de convivência.

A todos que de modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

Daniel Francis Ribeiro, filho de José Geraldo Ribeiro e Mônica Cristina de Souza Ribeiro, nasceu em 14 de julho de 1987, no município de Timóteo, Minas Gerais.

Em agosto de 2009 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa e graduou-se Engenheiro Agrônomo em março de 2014.

Em março de 2014 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, na Área de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Professora Lêda Rita D'Antonino Faroni, submetendo-se à defesa de dissertação em abril de 2016.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cultura do milho	3
2.2. Fungos em grãos de milho.....	4
2.2.1. <i>Aspergillus</i> spp.....	4
2.2.2. <i>Penicillium</i> spp.....	6
2.2.3. <i>Fusarium</i> spp.	8
2.3. Ozônio	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Características agronômicas dos híbridos de milho	13
3.2. Obtenção e quantificação do gás ozônio	13
3.3. Determinação da concentração e tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de milho.....	15
3.4. Processo de ozonização	16
3.5. Avaliação do efeito fungicida do gás ozônio em grãos de milho	16
3.6. Avaliação da capacidade detoxificante do gás ozônio sobre fumonisinas em grãos de milho	17
3.7. Avaliação físico-química dos grãos de milho ozonizados ou não.....	18
3.7.1. Teor de água.....	18
3.7.2. Proteínas.....	18
3.7.3. Lipídios	19
3.7.4. Cinzas.....	20
3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Caracterização inicial dos híbridos de milho	21
4.2. Tempo de saturação e concentração residual de ozônio nos híbridos de milho.....	22

4.3. Efeito fungicida do gás ozônio em híbridos de milho	24
4.4. Efeito detoxificante do gás ozônio em híbridos de milho	32
4.5. Efeito do ozônio na qualidade dos grãos.....	34
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	38

RESUMO

RIBEIRO, Daniel Francis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2016. **Ozônio como agente fungicida e de degradação de micotoxinas em híbridos de milho.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientador: Marco Aurélio Guerra Pimentel.

O milho é um dos cereais mais vulneráveis ao ataque de fungos, principalmente por espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, além da contaminação por metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos (micotoxinas), sendo alguns desses compostos carcinogênicos a humanos e animais. Uma estratégia potencial para o controle de fungos e detoxificação de grãos nas unidades armazenadoras consiste no uso do ozônio. Características como alta reatividade, penetrabilidade e decomposição espontânea em um produto não tóxico (O_2) fazem do ozônio um desinfetante viável para garantir a segurança microbiológica dos produtos alimentícios. O gás age diretamente na superfície dos microrganismos e destrói sua parede celular. Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência do gás ozônio na desinfecção de grãos de milho contaminados com fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* spp. e na degradação das fumonisinas B_1 e B_2 , além do efeito do processo nas características físico-químicas dos grãos. Foram utilizados grãos de milho dos híbridos 30F53H e AS1581 PRO, com teor de água de 12,8 e 13,5% em base úmida (b.u.), respectivamente, contaminados naturalmente com *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* spp. Os grãos foram acondicionados em câmara de PVC (32 x 20 cm) composta por três compartimentos, cada um com capacidade para 800 g de grãos, e com conexões para injeção e exaustão do gás. A concentração utilizada de ozônio aplicada foi de 13,5 mg L^{-1} com fluxo de 1,0 $L\ min^{-1}$, em cinco períodos de exposição (12, 24, 36, 48 e 60 h). No controle, os grãos de milho foram submetidos ao tratamento com ar atmosférico, nas mesmas condições que o tratamento com ozônio. O índice de ocorrência de fungos foi avaliado pelo método de papel de filtro (“blotter test”). Para avaliar a capacidade detoxificante do gás ozônio, quantificou-se o teor de fumonisinas B_1 e B_2 nas amostras de grãos de milho, submetidas ou não ao processo de ozonização. A avaliação físico-química dos grãos foi realizada antes e depois de cada tratamento. Foram analisados os teores de água, lipídios, proteínas e cinzas. Para o híbrido 30F53H, o tempo de saturação calculado foi 41,74 min e a concentração residual do gás

ozônio 8,72 mg L⁻¹. Dos resultados obtidos conclui-se que para o tempo de exposição de 60 h, os índices de ocorrência de *A. flavus*, *Penicillium* spp. e *F. verticillioides* para o híbrido AS1581 PRO reduziram o equivalente a 93,8; 99,7 e 99,3%, em relação ao controle. Para o híbrido 30F53H, os índices de ocorrência dos fungos *A. flavus*, *Penicillium* spp. e *F. verticillioides* apresentaram redução superior a 96% no tempo de exposição de 60 h. A concentração de 13,5 mg L⁻¹ e 24 h de exposição ao ozônio reduziu o teor de fumonisinas B₁ e B₂ em 78,8 e 86,98%, respectivamente, para o híbrido 30F53H e para o híbrido AS1581 PRO a redução foi de 88,5% no teor de fumonisina B₁ e mais de 82% o teor de fumonisina B₂. O teor de água, proteínas, lipídios e cinzas não foram alterados pela exposição dos híbridos ao gás ozônio na concentração de 13,5 mg L⁻¹, exceto para o híbrido AS1581 PRO nos tempos de exposição ao ozônio superiores a 48 h. O ozônio reduziu o teor de água dos grãos de milho do híbrido AS1581 PRO nos tempos de 48 e 60 h. Já para o híbrido 30F53H não foi observada diferença significativa nos teores de água, lipídios, proteína e cinzas entre o controle e o tratamento com ozônio. Portanto, nas condições adotadas, os resultados indicam que o ozônio se mostrou eficiente fungicida e detoxificante de grãos de milho sem alterar a qualidade físico-química dos mesmos.

ABSTRACT

RIBEIRO, Daniel Francis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2016.
Ozone as a fungicidal agent and degradation of mycotoxins in corn hybrids. Adviser:
Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-adviser: Marco Aurélio Guerra Pimentel.

Maize is one of the most vulnerable to fungal attack cereal, mostly species of *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* besides the contamination by toxic secondary metabolites produced by fungi (mycotoxins), some of these compounds are carcinogenic to humans and animals. The ozone is a strategy for controlling fungi and detoxification of grain in warehousing units. Features such as high reactivity, penetrability and spontaneous decomposition in a non-toxic product (O_2) became ozone a viable disinfectant to ensure the microbiological safety of food products. The gas acts directly on the surface of microorganisms and destroys their cell wall. The objective of this study was to evaluate the ozone gas efficiency in the disinfection of corn kernels contaminated with *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* and *Penicillium* spp. and the degradation of fumonisins B_1 and B_2 , and the effect of the process on the physicochemical characteristics of the grains. Hybrids maize 30F53H and AS1581 PRO were utilized in the experiment, with 12.8 and 13.5% moisture content on a wet basis, respectively, naturally contaminated with *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* and *Penicillium* spp. The grains were packed in PVC chamber (32 x 20 cm) consisting of three compartments, each with a capacity of 800 g, with connections for gas injection and exhaust. The applied ozone concentration used was 13.5 mg L^{-1} with a flow of 1.0 L min^{-1} for five exposure times (12, 24, 36, 48 and 60 h). In control, maize grains were subjected to treatment with atmospheric air, the same conditions as treatment with ozone. The rate of occurrence of fungi was evaluated by blotter test. The fumonisin B_1 and B_2 content in samples of maize, whether or not subject to the ozonation process, was quantified to evaluate detoxication capacity of ozone gas. The physicochemical evaluation of grains was performed before and after each treatment. Water, lipids, proteins and ash levels were evaluated. For the hybrid 30F53H the calculated saturation time was 41.74 min and residual ozone gas concentration of 8.72 mg L^{-1} . From the results obtained it was concluded that for the 60 h exposure time, the occurrence rates of *A. flavus*, *Penicillium* spp. and *F. verticillioides* for hybrid AS1581 PRO reduced

equivalent to 93.8, 99.7 and 99.3%, compared to the control. For hybrid 30F53H, the occurrence rates of fungi *A. flavus*, *Penicillium* spp. and *F. verticillioides* experiencing decreases greater than 96% in 60 h exposure time. The concentration of 13.5 mg L⁻¹ and 24 h exposure to ozone reduced 78.8 e 86.98% fumonisin B₁ and B₂ content for the hybrid 30F53H. The reduction of fumonisin B₁ and B₂ content in the hybrid AS1581 PRO was 88.5% and more than 82%, respectively. Ozone reduced the water content of corn kernels hybrid AS1581 PRO in times 48 and 60 h. As for the hybrid 30F53H was no significant difference in water content, lipid, protein and ash between the control and treatment with ozone. Therefore, the adopted conditions, the results indicate that ozone was efficient fungicide and detoxication corn grain without changing the physical-chemical quality.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo, atingindo valores superiores a 1 bilhão de toneladas de grãos na safra 2014/2015 (USDA, 2016). Segundo dados divulgados pela CONAB (2016), neste mesmo período a produção brasileira de milho foi de aproximadamente 84,7 milhões de toneladas de grãos.

Apesar do milho ser um dos principais produtos da agricultura nacional, ainda são registradas grandes perdas durante o cultivo e armazenamento dos grãos (EMBRAPA, 2012). Estima-se que na cadeia produtiva dos grãos seja perdida 30% da produção (FAO, 2016). Para que seja possível minimizar essas perdas, faz-se necessário a adoção de práticas culturais, tais como a utilização de cultivares resistentes às variadas situações climáticas e solos, uso de híbridos resistentes ao ataque de pragas e fungos micotoxigênicos, além do aprimoramento do processo de colheita e das condições de armazenamento dos grãos (EMBRAPA, 2006; FAO, 2011).

A precariedade das estruturas e a falta de cuidados no armazenamento podem potencializar os riscos de perdas por ataque de roedores, fungos e insetos, além da contaminação por micotoxinas, reduzindo a quantidade e a qualidade do milho armazenado (LAZZARI, 1997; SANTOS, 2008). Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, sendo alguns desses compostos carcinogênicos a humanos e animais (HUSSEIN & BRASEL, 2001, CALDAS et al., 2002). O milho é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas, uma vez que o amido é o principal componente do grão. Os fungos sintetizam enzimas hidrolíticas que favorecem o crescimento em amido e em outras matérias-primas ricas em carboidratos (BANKOLE & ADEBANJO, 2003). No milho, as micotoxinas de maior ocorrência são produzidas principalmente por espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (COVARELLI et al., 2011).

A contaminação por fungos micotoxigênicos pode ocorrer em grãos de milho aparentemente sadios e é dependente de uma série de fatores, como teor de água, temperatura, presença de oxigênio, características genéticas, lesões provocadas nos grãos por insetos, dano mecânico/térmico, quantidade de inóculo fúngico, interação entre as linhagens fúngicas, época de colheita e sistemas de secagem e armazenagem (PICOT et al., 2010).

Existem diferentes métodos físicos, químicos e biológicos para tratamento de grãos contaminados por micotoxinas (LINO et al., 2004; CARÃO et al., 2014). O grau de descontaminação depende do método usado e da toxicidade que subsiste na amostra tratada (SORIANO & DRAGACCI, 2004). Porém, de acordo com a European Mycotoxin Awareness Network – EMAN, o processo ideal de descontaminação deve ser de fácil operação, econômico, não gerar compostos que apresentem toxicidade, mantendo inalteradas as propriedades nutricionais e a palatabilidade dos grãos e dos seus derivados (EMAN, 2000).

Considerando o elevado custo e a dificuldade para a detoxificação de alimentos contaminados por micotoxinas e a ausência de fungicidas registrados pelo MAPA para o tratamento pós-colheita de grãos de milho (BRASIL, 2016), Lanza et al. (2014) ressaltou a necessidade de implementação de medidas com propósito de prevenir e/ou reduzir a formação de grãos ardidos e fumonisinas em grãos de milho.

Neste contexto, uma estratégia eficiente que vem sendo sugerida é o uso do gás ozônio (O₃). O ozônio é um gás resultante do rearranjo de átomos de oxigênio e pode ser gerado por descargas elétricas ou pela incidência de radiação eletromagnética de alta energia (luz ultravioleta) no ar (KHADRE et al., 2001). É uma molécula instável que decai rapidamente a oxigênio biatômico, liberando um átomo de oxigênio altamente reativo. Por essa característica, esse gás possui o segundo maior potencial de oxidação dentre os elementos químicos, sendo superado apenas pelo Flúor (F₂) (HILL & RICE, 1982).

O gás ozônio tem sido considerado como um dos mais potentes sanitizantes conhecidos, por apresentar largo espectro antimicrobiano e ser eficiente no controle de fungos, bactérias e protozoários (KHADRE et al., 2001; AKBAS & OZDEMIR, 2006; WU et al., 2006). Dentre as espécies já estudadas e que apresentaram sensibilidade ao ozônio, destacam-se as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157 e *Listeria monocytogenes* (SHEELAMARY & MUTHUKUMAR, 2011; ALWI & ALI, 2014); os fungos *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *Penicillium brevicompactum*, *Stachybotris chartarium*, *Trichoderma viride*, *Ulocladium* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum magna* (HUDSON & SHARMA, 2009; BARBONI et al., 2010; MYLONA et al., 2014); e os protozoários *Acanthamoeba* sp., *Encephalitozoon intestinalis*, *Giardia*

lambia e *Giardia muris* (GRAY, 2014). Além do seu efeito sobre os microrganismos patogênicos, estudos mostraram que este gás pode ser utilizado, eficazmente sem danificar a capacidade de germinação dos grãos (WU et al., 2006; SAVI et al., 2016). O ozônio também é útil na detoxificação e eliminação de micotoxinas em grãos de amendoim, milho, trigo e ração para aves (ALENCAR et al., 2011; MYLONA et al., 2014; SAVI et al., 2016; TORLAK et al., 2016).

A eficácia do ozônio é dependente de fatores como o tempo de exposição, a temperatura, o pH do meio e da composição química do alimento (PRIYANKA et al., 2014). O processo de ozonização pode ser realizado via seca (fumigação) ou via úmida (ozônio dissolvido em água). No processo de fumigação com o gás, a umidade relativa do ar é outro fator que afeta a eficácia do ozônio. A eficácia aumenta com a umidade relativa do ar (O'DONNELL et al., 2012).

Considerando que o processo de ozonização não pode ser generalizado, sendo necessárias pesquisas em função da finalidade do processo e do tipo de alimento, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficiência do gás ozônio na desinfecção de grãos de milho naturalmente contaminados com fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* spp. e na degradação das fumonisinas B₁ e B₂, além do efeito do processo nas características físico-químicas dos grãos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do milho

O milho é uma espécie monocotiledônea pertencente à família Poaceae, originária da América, provavelmente da região do México (MATSUOKA et al., 2002). Os maiores produtores são Estados Unidos, China e Brasil, os quais contribuem com cerca de 70% da produção mundial.

O grão de milho é constituído por 65% de carboidratos, 15% de água, 9% de proteínas, 4% de lipídios, 1% de minerais. A elevada concentração de carboidratos confere ao milho alto valor energético (1660 kJ em 100 g). Os lipídios são encontrados em todo o grão e são representados na forma de glicerídeos (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Os minerais fósforo e enxofre ocorrem em quantidades significativas no milho, enquanto outros minerais importantes como cloro, cálcio, sódio, iodo, ferro, zinco, manganês, cobre,

selênio, cromo, cobalto e cádmio estão presentes em menores quantidades (PAES, 2006).

A importância econômica desta *commodity* se caracteriza por seu uso diversificado, que compreende o emprego direto na alimentação humana e animal e na forma processada nas indústrias alimentícias e de alta tecnologia. Como alimento, o milho destina-se ao consumo tanto no estado leitoso (milho verde) como na forma de subprodutos do milho seco (farinhas, fubá, quirera, farelo, óleos, xaropes, amido e rações). Outras formas de uso se caracterizam pela extração de compostos empregados na fabricação de cervejas (maltose), papéis (amidos industriais) e tecidos (dextrinas); no beneficiamento de minérios (dextrinas) e fundição de peças metálicas (pré-gelatinizados); e como matéria-prima para a produção de etanol (DUARTE et al., 2011).

A utilização do milho em grão como alimentação animal representa a maior porcentagem do consumo deste cereal, cerca de 70% no mundo e 82% no Brasil. Embora seja versátil o seu uso, a produção deste cereal tem acompanhado o crescimento da produção de suínos e aves no Brasil e no mundo (EMBRAPA, 2006).

2.2. Fungos em grãos de milho

2.2.1. *Aspergillus* spp.

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez pelo micologista Pietro Antoni Micheli em 1729 (SAMSON, 1994). A nomenclatura do gênero foi baseada na semelhança estrutural do fungo com o aspersório, um objeto utilizado para aspergir água benta (BENNETT, 2010). Em sua estrutura morfológica básica, o gênero *Aspergillus* apresenta uma cabeça conidial composta por uma vesícula inchada com uma ou duas camadas de células especializadas que sustentam os esporos assexuados (conídios), chamados de fiálides (Figura 1). Quando uma segunda camada de células especializadas (métulas) está presente entre a vesícula e as fiálides, a cabeça conidial é referida como bisseriado. A cabeça de conídios é sustentada por uma longa estipe e pela parte basal, chamada "célula pé". O conidióforo é a estrutura formada pela célula pé, estipe, vesícula, métulas e fiálides, responsável por sustentar os conídios.

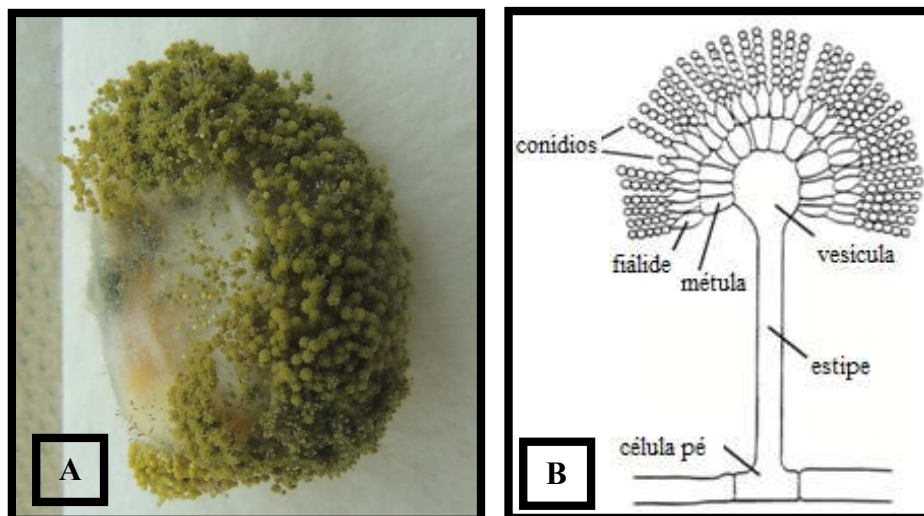


Figura 1 – *Aspergillus flavus* em grão de milho (A) e estrutura morfológica básica do *Aspergillus* (B). Fonte: Arquivo pessoal do autor (A); Batt e Tortorello, 2014 (B).

O gênero *Aspergillus* apresenta ampla importância econômica, visto que muitas de suas espécies são patógenos de plantas e animais. O fungo *Aspergillus flavus* é uma espécie saprófita que ocorre no solo e provoca doenças em diversas culturas agrícolas importantes, tais como milho (podridão orelha), amendoim (molde amarelo) e semente de algodão, antes e após a colheita (YU et al., 2005; KLICH, 2007; MICHAILIDES & THOMIDIS, 2007). Como patógenos humanos, a espécie *A. flavus* atinge pessoas imunossuprimidas causando aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergiloma, aspergilose pulmonar invasiva (KLICH, 2007; LATGÉ & STEINBACH, 2009).

O *A. flavus* é capaz de produzir um grande número de metabólitos secundários, incluindo aflatoxinas, ácido ciclopiazônico, aflatrem, aflavinin, ácido kójico, ácido aspergílico, ácido β -nitropropiónico e paspalinina (LESLIE & LOGRIECO, 2014). As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). A aflatoxina B₁ é a mais tóxica e, em casos mais graves, pode induzir a formação de tumores no fígado, rim, pulmão e cólon de humanos e animais, a longo prazo (AMAIKE & KELLER, 2011). A incidência de *A. flavus* no campo, não reduz necessariamente a produção, mas provoca perdas econômicas por meio da contaminação de sementes com aflatoxina.

Os Limites Máximos Tolerados (LMT) para a presença de aflatoxinas em alimentos comercializados no Brasil são estabelecidos pela Resolução RDC 07 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Segundo esta resolução, os LMT de aflatoxinas em milho em espiga, milho em grão (inteiro, partido, amassado ou moído), farinhas ou sêmolos de milho são de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do produto (ANVISA, 2011).

2.2.2. *Penicillium* spp.

O gênero *Penicillium* tem cerca de 200 espécies reconhecidas, das quais 50 ou mais são de ocorrência comum. Quase todas as espécies crescem bem em uma gama de meios de cultura, produzindo colônias pequenas, circulares, baixas e, geralmente, com esporulação abundante nas cores azul verde ou cinza (Figura 2). Conseqüentemente, a maioria das espécies *Penicillium* podem ser prontamente reconhecidas. Admite-se que cerca de 70 a 80% das estirpes são identificáveis morfologicamente com confiança. Os esporos assexuais produzidos possuem uma estrutura típica do gênero, designada de penicillus, que em latim significa pincel (KLICH & PITT, 1988).



Figura 2 – *Penicillium* spp. em grão de milho. Fonte: Arquivo pessoal do autor.

O gênero *Penicillium* abrange espécies que são indispensáveis à indústria alimentícia na manufatura de queijos tipo “blue cheese”, como o gorgonzola e o roquefort, e tipo “pasta mole”, como o camembert e o brie, além dos famosos salames fermentados. Outras aplicações biotecnológicas incluem corantes, compostos aromáticos voláteis, ácidos orgânicos e vitaminas. As espécies de *Penicillium* também são conhecidas por sua

produção de metabólitos secundários bioativos utilizados como fármacos, tais como penicilina, griseofulvina, compactina, fumagillin, fumitremorgina C e ácido micofenólico (BATT & TORTORELLO, 2014)

Apesar dos diversos usos na indústria de alimentos, algumas espécies do gênero *Penicillium* são responsáveis pela deterioração de alimentos e produção de micotoxinas como patulina, ocratoxina A, citrinina, ácido penicílico, ácido ciclopiazônico, citreovirdina, penitrem A, PR-toxina, além de outros metabólitos secundários que podem suscitar efeitos tóxicos nos pulmões, cérebro, fígado e rins de animais e câncer em humanos (LAWLEY et al., 2012; BATT & TORTORELLO, 2014; FLETCHER & BLANEY, 2016).

Ocratoxina A é considerada a toxina mais importante, uma vez que é considerada nefrotóxica, imunotóxica, mutagênica, carcinogênica tipo 2 e pode ser encontrada em cereais (BAYMAN & BAKER, 2006). Apesar de apresentar ação prejudicial à saúde humana e animal em geral, os suínos e as aves são as espécies mais afetadas (MAGNOLI et al., 2007). Esta micotoxina é produzida por espécies como *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ocraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius* (DUARTE et al., 2010; AFSAH-HEJRI et al., 2012). A biossíntese da ocratoxina A pode ser influenciada por fatores intrínsecos, tais como pH, umidade e composição do substrato, bem como fatores extrínsecos, como temperatura (KHALESI & KHATIB, 2011). A ANVISA determinou em 2011 o LMT de ocorrência da ocratoxina A através da Resolução da Diretoria Colegiada nº7. Nesta resolução ficou definido que o LMT de ocorrência de ocratoxina A em cereais e produtos de cereais, alimentos a base de cereais para a alimentação infantil e cereais para posterior processamento é de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (ANVISA, 2011).

Fungos do gênero *Penicillium* são muito resistentes a condições de baixo teor de água e são mais comumente encontrados como contaminantes de produtos durante os processos de secagem e armazenamento, sendo denominados de fungos de pós-colheita ou de armazenamento (SWEENEY & DOBSON, 1998; CORCUERA et al., 2011). Portanto, o monitoramento da presença de propágulos de *Penicillium* spp. no armazenamento e até mesmo no processamento de produtos agrícolas é necessária.

2.2.3. *Fusarium* spp.

As espécies de *Fusarium* estão entre os patógenos mais comumente associados à cultura do milho em todo o mundo, causando doenças em sementes, morte de plântulas, podridão de colmo, podridão de raiz, além de perdas pós-colheita (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; RIBEIRO et al., 2005; NERBASS et al., 2008; LANZA et al., 2014). As espécies do gênero *Fusarium* são capazes de sobreviver por longos períodos no solo através de estruturas de resistência, os clamidósporos. A facilidade em que seus conídios são disseminados pelo ar ou pela água, permite a colonização dos vários órgãos das plantas hospedeiras (BURGESS et al., 1997; DAVIS et al., 2006).

Algumas espécies de *Fusarium* são capazes de produzir diversos tipos de micotoxinas, tais como tricotecenos (desoxinivalenol e nivalenol), fumonisinas, zearalenona, moniliformina e o ácido fusárico fusaproliferina e a beauvericina (CAST, 2003). As fumonisinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por *Fusarium verticillioides* (Figura 3A) e *F. proliferatum*, e são comumente encontradas em produtos como milho, soja, trigo, ervilha, arroz, cana-de-açúcar, banana, algodão e aspargo (SAMSON et al., 2004; IVIC et al., 2009; GRENIER et al., 2012). Sua estrutura química básica contém uma cadeia hidrocarbônica longa composta por grupos metil, acetil e amino (GUTLEB et al., 2002; MATTSSON, 2007; BINDER, 2007).

Atualmente, existem 53 fumonisinas identificadas, sendo FB₁ e FB₂ (Figura 3B) as de maior relevância. A fumonisina B₁ é a mais estudada, porém a fumonisina B₂ é mais citotóxica que a B₁ (FRISVAD et al., 2007). Estas duas toxinas constituem 70% das fumonisinas encontradas em alimentos naturalmente contaminados (NIDERKORN et al., 2009).

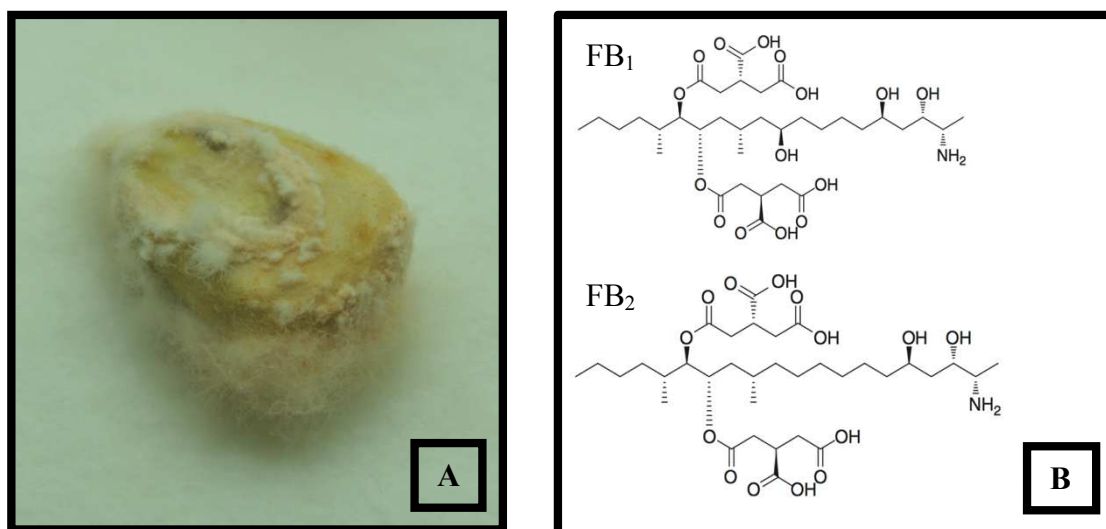


Figura 3 – *Fusarium verticillioides* em grão de milho (A). Estrutura das fumonisinas B₁ e B₂ (B). Fonte: Arquivo pessoal do autor (A); Motarjemi et al., 2014 (B).

A incidência de micotoxinas em grãos de milho é elevada e o consumo de produtos contaminados representa um sério risco para a saúde (CHULZE, 2010; DALL'ASTA et al., 2010; DALL'ASTA et al., 2012). As fumonisinas são carcinogênicas e estão relacionadas a danos no tubo neural de humanos, edema pulmonar em suínos (MOTARJEMI et al., 2014), encefalomalácia em equídeos (DEL FAVA et al., 2010) e toxicoses em animais domesticados (MORGAVI & RILEY, 2007; GAZZOTTI et al., 2015).

A ANVISA, por meio da Resolução RDC 07 de fevereiro de 2011, determina os limites máximos tolerados para a presença de fumonisinas nos alimentos comercializados no Brasil (Tabela 1).

Tabela 1 - Limites máximos tolerados para presença de fumonisinas em alimentos comercializados no Brasil.

Produto	Limite Máximo Tolerado ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Milho de pipoca	2000
Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000
Milho em grão para posterior processamento	5000
Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000

Fonte: ANVISA, 2011.

2.3. Ozônio

O ozônio (O_3) foi descoberto em 1785, ano em que Van Marum observou sua formação através de uma descarga elétrica em oxigênio (O_2) (CHIATTONE et al., 2008). A palavra vem do grego “ozein” que quer dizer mau cheiro. O significado do nome reflete uma de suas principais características, ou seja, o forte odor que exala quando presente em alta concentração (LAPOLLI et al., 2003). Em temperaturas ambiente e refrigerada, pode ser detectado pelo olfato humano em concentrações que variam entre 0,02 e 0,04 ppm (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001).

Durante a geração do ozônio, moléculas de O_2 são dissociadas, produzindo radicais livres altamente reativos que interagem com outras moléculas de oxigênio, formando o O_3 . O gás ozônio pode ser produzido naturalmente na estratosfera por processo fotoquímico e em laboratório por diversos métodos, entretanto o mais utilizado é o método de descarga elétrica (processo corona) devido a maior quantidade de ozônio gerado com menor custo (ALMEIDA et al., 2004). O método corona é baseado na produção de O_3 a partir da passagem de O_2 gasoso entre dois eletrodos submetidos elevada descarga elétrica capaz de dissociar a molécula de oxigênio e promover a formação do ozônio em consequência da

recombinação de radicais livres de oxigênio, com moléculas de oxigênio presentes no sistema (KHADRE et al., 2001).

Os métodos disponíveis para quantificação de ozônio gasoso e dissolvido em água baseiam-se nas suas propriedades físicas ou na sua considerável reatividade química. Dentre eles, os mais utilizados são os métodos por radiação ultravioleta, iodométrico e colorimétrico com reagente índigo.

Na fase gasosa ou aquosa o ozônio retarda o crescimento de bactérias, bolores, leveduras, parasitas e vírus em pequenas concentrações e curto tempo de contato (KECHINSKI, 2012). O ozônio não apresenta especificidade a um grupo de microrganismos, podendo ser utilizado para o controle de diversos microrganismos em uma única aplicação (KHADRE et al., 2001; ALENCAR, 2012). Características como alta reatividade, penetrabilidade e decomposição espontânea em um produto não tóxico (O_2) fazem do ozônio um desinfetante viável para garantir a segurança microbiológica dos produtos alimentícios (KHADRE et al., 2001). O gás age diretamente na superfície dos microrganismos e destrói sua parede celular (STUCKI et al., 2005).

Os usos do ozônio na indústria de alimentos são principalmente relacionados com o tratamento de água residuária e descontaminação da superfície dos alimentos, auxiliando na sua preservação durante o armazenamento e na remoção de resíduos de agrotóxicos (KIM et al., 1999; VON GUNTEN, 2003; CHELME-AYALA et al., 2010; QIANG et al., 2010; MOTARJEMI et al., 2014; HELENO et al., 2015; ISIKBER & ATHANASSIOU, 2015). Com o objetivo de conservar os alimentos, o ozônio pode ser utilizado na forma gasosa em câmaras frigoríficas, silos e depósitos de alimentos, protegendo e conservando cereais, frutas, hortaliças, carnes e laticínios. No setor de armazenamento de grãos, a utilização deste gás vem sendo apontada com uma estratégia potencial para o controle de insetos-praga (KELLS et al., 2001; PEREIRA et al., 2007; McDONOUGH et al., 2011; HANSEN et al., 2013; SOUSA et al., 2016), desinfecção fúngica e detoxificação de micotoxinas (ALENCAR et al., 2012; ISIKBER & ATHANASSIOU, 2015; WANG et al., 2016). A este respeito foi constatado que o ozônio além de ser eficaz no controle das pragas não modifica a qualidade dos grãos tratados e seus subprodutos (PEREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2016).

Como a maioria das perdas pós-colheita de alimentos ocorrem por ação de bactérias, fungos e infestações por insetos, a injeção direta de gás ozônio em depósitos mantém o ambiente limpo e esterilizado, mesmo em condições de calor e umidade elevados, o que assegura maior tempo de armazenamento e vida útil dos alimentos. O ozônio pode também ser utilizado dissolvido em água na lavagem ou enxágue sanitário de alimentos, equipamentos e acessórios (CHIATTONE et al., 2008).

O grau de inativação dos microrganismos pelo ozônio pode variar de acordo com as características fisiológicas da cultura e fatores ambientais como pH do meio, temperatura, umidade, concentração residual, quantidade de matéria orgânica em torno das células e presença de aditivos como ácidos, agentes tensoativos e açúcares (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001; PASCUAL et al., 2007; ALENCAR, 2012; KECHINSKI, 2012).

A alta toxicidade do ozônio ao ser humano torna extremamente perigosa sua aspiração direta. Entretanto, a ingestão indireta, através de água ozonizada, não representa perigo ao ser humano, pois a meia-vida do ozônio dissolvido na água é relativamente curta. O ser humano, quando exposto durante cerca de 2 h ao gás ozônio a 2 ppm, sente secura na boca e garganta, dores no peito, perda de habilidade mental, dificuldade de coordenação e articulação, tosse e perda de 13% da capacidade vital (DI BERNARDO & DANTAS, 2005). A prevenção da intoxicação profissional pode ser obtida pela adoção de sistemas de detecção e destruição do ozônio residual no ar ambiente e de dispositivos de ventilação (CHERNICHARO et al., 2001; KHADRE et al., 2001), garantindo-se assim, a segura aplicação do ozônio na indústria de alimentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Vegetais do Departamento de Engenharia Agrícola – DEA, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG; e nos Laboratórios de Fitopatologia e Laboratório de Composição Centesimal da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

Foram utilizadas duas cultivares de milho híbrido, AS1581 PRO e 30F53H, provenientes da área experimental de produção da Embrapa Milho e Sorgo, com teor de água de 13,5% e 12,8% em base úmida (b.u.), respectivamente.

3.1. Características agronômicas dos híbridos de milho

Para a o experimento foram utilizadas duas cultivares de milho híbrido: 30F53H e AS1581 PRO. Os dois híbridos apresentam textura semiduro e coloração alaranjada.

A cultivar de milho 30F53H é um híbrido simples, medianamente resistente a fusariose e a doenças do colmo causadas pelos gêneros *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Fusarium*. Foi desenvolvido pela Pioneer nos Estados Unidos em conjunto com a Dow AgroSciences e tem a tecnologia do gene Herculex[®]I, também pode ser classificado como milho Bt, uma vez que a proteína Cry1F, que é derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis*. A proteína Cry1F age sobre a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), além de apresentar ótimo controle da broca-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) e supressão da lagarta-das-espigas (*Helicoverpa zea*), também possuem ação de controle sobre algumas pragas iniciais como a lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) e lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*). O milho com tecnologia Herculex[®]I possui tolerância à aplicação de herbicidas formulados com Glufosinato de Amônio, hoje registrados no Brasil com a marca Liberty[®], que podem ser utilizados como alternativa no controle de plantas daninhas. Além disso, este híbrido é medianamente resistente a fusariose e resistente a doenças do colmo causadas pelos gêneros *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Fusarium*.

A cultivar AS1581 PRO é um híbrido simples modificado desenvolvido pela Agroeste e tem a tecnologia YieldGard[®] VT PRO. Essa tecnologia tem inserido em seu código genético dois genes do *Bacillus thuringiensis* (Bt) que codificam duas proteínas de ação inseticida, permitindo assim a proteção da cultura do milho dos danos causados pela lagarta-do-cartucho, broca-do-colmo e lagarta-da-espiga. Além disso, é tolerante a doenças do colmo causadas pelos gêneros *Colletotrichum*, *Diplodia* e *Fusarium*.

3.2. Obtenção e quantificação do gás ozônio

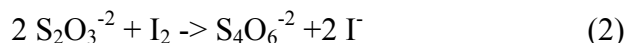
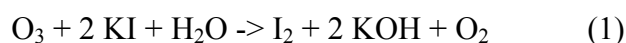
O gás ozônio (O₃) foi obtido por meio de um gerador (Figura 4 A) desenvolvido pela empresa Ozone & Life (São José dos Campos, SP). Na geração do ozônio, o gás oxigênio passa por um reator refrigerado, onde existe uma descarga por barreira dielétrica. Esse tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta voltagem entre dois eletrodos

paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o oxigênio. Nesse espaço livre é produzida uma descarga em forma de filamentos, onde são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio (O₃). Foi utilizado oxigênio medicinal (99,5% de pureza), como insumo primário. O fluxo e a concentração do gás ozônio utilizados nos ensaios foram determinados em testes preliminares. O fluxo foi constantemente monitorado com auxílio de um fluxômetro instalado no registro do cilindro de oxigênio. Para evitar o ressecamento dos grãos durante o processo de ozonização, utilizou-se um recipiente com solução de cloreto de sódio (NaCl) saturada (Figura 4 B). Este método consiste na passagem do gás por uma solução de NaCl antes de entrar em contato com a massa de grãos (OZKAN et al., 2011).



Figura 4 – Ozonizador (A). Recipiente com solução saturada de NaCl (B). Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Equação da titulação da solução de iodeto de potássio borbulhada pelo ozônio com tiosulfato de sódio.



A concentração do ozônio foi quantificada pelo método iodométrico (CLESCERL et al., 2000), que consiste no borbulhamento do ozônio em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 2,0%, com produção de iodo (I₂) como demonstrado (Equação 1). Para deslocar o equilíbrio no sentido de formação do I₂, o meio foi acidificado com 2,5 mL de

ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi titulada com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ (Equação 2), até que a coloração castanha do iodo se tornasse clara. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução indicadora de amido a 1% e feita a titulação até desaparecimento da coloração azul.

3.3. Determinação da concentração e tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de milho

Sabendo-se que a molécula de ozônio é instável e decai rapidamente a oxigênio, é necessário determinar o tempo de saturação, ou seja, o tempo necessário para que a concentração do gás ozônio aplicada permaneça constante na massa de grãos de milho.

Para a determinação da concentração e tempo de saturação utilizou-se um cilindro de PVC com volume de 10 L (32 x 20 cm) (Figura 5). A 10 cm do fundo do recipiente, foi colocada uma tela metálica para sustentação das placas e formação de um “plenum”, para melhor distribuição do gás. Nas tampas inferior e superior da câmara, foram instaladas conexões para injeção e exaustão do gás, respectivamente. O interior da câmara era composto por três compartimentos, cada um com capacidade para 800 g de grãos de milho. Aferições da concentração do gás foram realizadas em intervalos regulares de 5 min, até que a mesma se mantivesse constante. Este procedimento foi realizado em triplicata. A concentração do ozônio foi quantificada, utilizando-se o método iodométrico, conforme item 3.1. Os dados de saturação com ozônio foram submetidos à análise de regressão Linear Response Plateau em função do tempo, utilizando o software SAEG (UFV, Viçosa, Brasil).



Figura 5 – Câmara de ozonização composta por cilindro de PVC utilizado para acondicionamento dos grãos submetidos ou não ao processo de ozonização. Fonte: Arquivo pessoal do autor.

3.4. Processo de ozonização

As ozonizações foram realizadas separadamente para cada híbrido. Foram acondicionadas três porções de 800 g de grãos em cada uma das três divisões da câmara de ozonização, de modo que cada uma das porções representava uma repetição. A concentração utilizada foi de $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ com fluxo de $1,0 \text{ L min}^{-1}$, em cinco períodos de exposição (12, 24, 36, 48 e 60 h), baseado em trabalho semelhante (SANTOS, 2016). O tempo calculado para a saturação das câmaras foi acrescido ao tempo de exposição dos híbridos ao gás. O mesmo procedimento foi adotado para o controle, que consistiu na injeção de ar atmosférico com auxílio de um compressor de ar. O teste foi realizado em triplicata.

3.5. Avaliação do efeito fungicida do gás ozônio em grãos de milho

Para avaliação do efeito fungicida do ozônio em grãos de milho utilizou-se o método do papel de filtro (“blotter test”) (BRASIL, 2009a). Para a quantificação dos fungos, 400 grãos de cada tratamento, divididos em quatro subamostras de 100 unidades, foram distribuídos individualmente sobre uma camada dupla de papel filtro umedecido com

água destilada, em recipientes gerbox com tampas transparentes. Os recipientes com os grãos foram dispostos na sala de incubação sob lâmpadas de luz fluorescente branca e temperatura de 20 ± 2 °C por 24 h. Em seguida foram levados ao congelador a -20 °C por 24 h e, finalmente, retornados para a sala de incubação com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, durante 10 dias.

Os grãos foram avaliados com auxílio de um estereomicroscópio, quando observou-se a ocorrência de frutificações típicas do crescimento dos fungos, conidióforos com conídios e corpos de frutificação (e.g., picnídios, acérvulos, peritécios) em cada um dos grãos. Os resultados foram expressos em porcentagem de grãos infectados.

3.6. Avaliação da capacidade detoxificante do gás ozônio sobre fumonisinas em grãos de milho

Para avaliar a capacidade de detoxificante do gás ozônio, quantificou-se o teor de fumonisinas nas amostras de grãos de milho, contaminados naturalmente com fumonisinas. As amostras foram submetidas ao processo de ozonização na concentração de $13,5 \mu\text{g L}^{-1}$, em dois períodos de exposição ao gás. Para análise de fumonisinas foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Nexera X2, composto por bomba binária LC-30AD, injetor automático SIL-30AC e compartimento de coluna termostatizado CTO-20A, marca SHIMADZU acoplado em um detector de massas modelo TRIPLE QUAD 6500 marca SCIEX, para a quantificação de fumonisinas.

A metodologia da análise foi desenvolvida, otimizada e validada pelo INSTITUTO SAMITEC. De modo geral, as amostras foram moídas, homogeneizadas e pesadas. Em seguida foi adicionado a cada amostra uma solução composta por acetonitrila:água, sob agitação. Seguido ao tempo de extração as amostras foram filtradas e os extratos foram diluídos em solução composta por acetonitrila:água. Por fim as amostras foram conduzidas a análise cromatográfica. Nesta etapa utilizou-se coluna C18 e fases móveis composta por acetonitrila, água e ácido fórmico. A quantificação de fumonisinas foi realizada através de curva de calibração composta por sete pontos e o limite de quantificação do método utilizado é $125 \mu\text{g kg}^{-1}$ para fumonisina B₁ e B₂. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7. Avaliação físico-química dos grãos de milho ozonizados ou não

A avaliação físico-química dos grãos foi feita antes e depois de cada tempo de exposição ao gás. Foram realizadas as análises de teor de água, proteínas, lipídios e cinzas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7.1. Teor de água

O teor de água dos grãos de milho foi determinado utilizando-se o método padrão de estufa, segundo manual de Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b). Uma massa de 30 g de grãos foi pesada junto com recipiente de metal e sua respectiva tampa e colocados em estufa à temperatura de 105 °C, durante 24 h, em seguida foram transferidos para um dessecador e por fim pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.7.2. Proteínas

O teor de proteínas foi obtido pelo método Dumas, que consiste na queima de 0,1 g de amostra de milho moída, em temperatura variando de 700 °C a 800 °C, utilizando como catalizador o óxido cúprico na presença de oxigênio (RIBEIRO, 2010). Como resultado da combustão, são produzidos CO₂, H₂O e N₂. Todo nitrogênio é transformado em óxido nítrico (NO₂) sendo posteriormente reduzido a gás nitrogênio (N₂), que é liberado, possibilitando a determinação através da condutividade térmica (LOPES & SANTANA, 2005). Empregou-se o fator 6,25 para a conversão em proteína bruta. Foi utilizado o equipamento Leco FP-528 (LECO Corporation, St. Joseph, MI, EUA) (Figura 6).



Figura 6 – Determinador de nitrogênio e proteínas, modelo Leco FP-528. Fonte: Arquivo pessoal do autor

3.7.3. Lipídios

Para avaliar o teor de lipídios utilizou-se o extrator ANKOM modelo XT10 (Figura 7). Inicialmente realizou-se a secagem das amostras (1,0 g cada) em estufa a 102 °C por 3 horas. Em seguida as amostras foram colocadas no extrator ANKON XT10 por 30 min. O processo de extração foi conduzido em sistema fechado a 90 °C (AOCS, 2005) e foi utilizado 200 mL de éter de petróleo como solvente, partindo do princípio da solubilidade dos lipídios. O éter volatiliza e ao condensar-se, circula sobre a amostra em análise, arrastando toda a fração gordurosa e demais substâncias solúveis em éter. O éter é recuperado em outro compartimento, enquanto a gordura extraída é calculada por diferença de peso.



Figura 7 – Extrator ANKOM modelo XT10. Fonte: Arquivo pessoal do autor.

3.7.4. Cinzas

Para a determinação do teor de cinzas utilizou-se 2 g de grãos de milho moído por amostra. As amostras foram colocadas em mufla a 600 °C por 4 h (Figura 8), arrefecidas em dessecador e, por fim, pesadas em balança analítica (modelo Marte AW220), conforme o método 923.03 descrito por Horwitz (2000).



Figura 8 – Mufla e amostras em cadinho de porcelana depois de serem submetidas a queima a 600 °C por 4 h. Fonte: Arquivo pessoal do autor.

O teor de cinzas foi então obtido através da seguinte equação:

$$\text{Cinzas (\%)} = (\text{massa do cadinho com cinzas (g)} - \text{massa do cadinho (g)} \times 100) / \text{massa de amostra pesada.}$$

3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi instalado em esquema de parcela subdividida, tendo nas parcelas dois tratamentos (ar atmosférico e gás ozônio) e nas subparcelas os tempos de exposição ao ozônio (12, 24, 36, 48 e 60 h). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Para cada período de exposição os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p > 0,05$). Os períodos de exposição foram submetidos a análise de regressão e os modelos escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, no coeficiente de determinação (R^2), na análise do resíduo e no fenômeno biológico. Independente da interação ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma devido ao interesse. O software R foi utilizado para realização das análises estatísticas e o software SigmaPlot, versão 13.0, para a representação gráfica dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização inicial dos híbridos de milho

A caracterização inicial dos grãos de cada híbrido encontra-se representada na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização inicial dos grãos de milho.

Parâmetro Avaliado	Híbrido	
	30F53H	AS1581 PRO
Ocorrência de <i>Fusarium verticillioides</i> (%)	56,90±11,20	53,10±10,31
Ocorrência de <i>Penicillium</i> spp. (%)	67,50±17,63	76,00±11,61
Ocorrência de <i>Aspergillus flavus</i> (%)	6,20±3,67	8,65±3,45
Teor de FB ₁ (µg kg ⁻¹)	10643,85±2161,13	2149,6±184,13
Teor de FB ₂ (µg kg ⁻¹)	4492,3±1131,51	811,45±129,47
Teor de água (% b.u.)*	12,8±0,41	13,5±0,22
Teor de Lipídeos (%)	4,07±0,08	4,51±0,48
Teor de Cinzas (%)	1,03±0,09	1,09±0,16
Teor de Proteínas (%)	8,99±0,16	9,00±0,35

* b.u. – base úmida

4.2. Tempo de saturação e concentração residual de ozônio nos híbridos de milho

As equações que descrevem o comportamento da concentração residual do gás ozônio em função do tempo de exposição da massa de grãos ao gás na concentração de 13,5 mg L⁻¹, de acordo com a análise de regressão, com seu respectivo coeficiente de determinação (R²), estão representados na Tabela 3. A Figura 9 apresenta as estimativas dos referidos comportamentos.

Tabela 3 - Equações de regressão ajustadas da concentração residual do gás ozônio (mg L⁻¹) em função tempo de ozonização (min), e respectivos coeficientes de determinação (R²), durante o processo de saturação do gás.

Híbrido	Equação ajustada	Intervalo	R ²
AS1581 PRO	$\hat{y} = 0,0815 + 0,4182 X$	$0,00 \leq X \leq 67,34$	0,93
	$\hat{y} = 5,9089$	$67,34 < X \leq 90,00$	
30F53H	$\hat{y} = -0,6401 + 0,2241 X$	$0,00 \leq X \leq 41,74$	0,98
	$\hat{y} = 8,7163$	$41,74 < X \leq 90,00$	

X = período de ozonização (min) e \hat{y} = concentração residual de ozônio (mg L⁻¹).

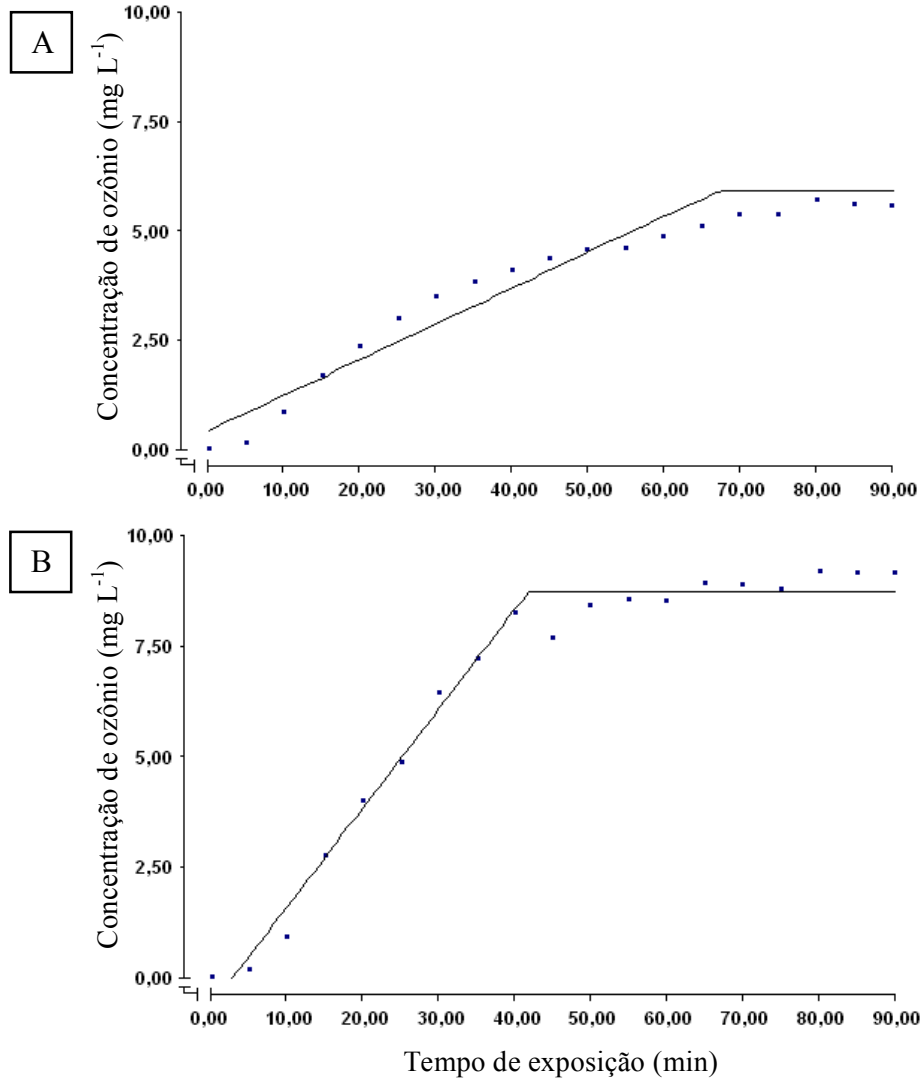


Figura 9 - Concentração residual do gás ozônio (mg L^{-1}) em função do tempo de ozonização (min) durante o processo de saturação dos grãos dos híbridos AS1581 PRO (A) e 30F53H (B).

Para o híbrido AS1581PRO, o tempo de saturação calculado e a concentração residual do gás ozônio foram $5,91 \text{ mg L}^{-1}$ e $67,34 \text{ min}$, respectivamente (Tabela 3). A concentração residual $5,91 \text{ mg L}^{-1}$ corresponde a $43,8\%$ da concentração inicial do gás ($13,5 \text{ mg L}^{-1}$).

Para o híbrido 30F53H, o tempo de saturação calculado foi de $41,74 \text{ min}$ e a concentração residual do gás ozônio de $8,72 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 3), o que corresponde a $64,6\%$

da concentração inicial (13,5 mg L⁻¹).

Utilizando procedimentos semelhantes, Santos et al. (2016), ao ozonizar grãos de arroz em casca com umidade de 14,3%, na concentração 10,13 mg L⁻¹ e fluxo de 1,0 L min⁻¹, obtiveram tempo e concentração de saturação de 13,97 min e 5,0075 mg L⁻¹, respectivamente.

Avaliando o tempo de saturação e a concentração residual do gás ozônio nos grãos de milho dos dois híbridos, verificou-se que o híbrido AS1581 PRO apresentou um maior tempo de saturação e menor concentração residual do gás em relação ao híbrido 30F53H. Este fato pode ser explicado pelo maior teor de água (13,5%) no início do processo (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Alencar et al. (2011) ao estudarem a saturação de grãos de amendoim com teores de água de 10,5% e 7,1%. Os autores obtiveram maior tempo de saturação e menor concentração residual do gás ozônio para os grãos de amendoim com teor de água inicial maior (10,5%). A explicação para este fato é que o teor de água é um fator chave no processo de absorção gasosa do ozônio em superfícies (GRONTOFT et al., 2004). A absorção do ozônio pelos grãos aumenta à medida que se aumenta o teor de água e, em consequência, promove a absorção do ozônio na superfície dos grãos e a reatividade do gás (ALENCAR et al., 2011).

4.3. Efeito fungicida do gás ozônio em híbridos de milho

O efeito do gás ozônio, na concentração de 13,5 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição, foi observado na redução significativa ($p > 0,05$) do percentual de grãos contaminados por *A. flavus*, *Penicillium* spp. e *F. verticillioides* nos híbridos AS1581 PRO e 30F53H, exceto para o índice de ocorrência de *A. flavus* nos períodos de 12 h, para ambos os híbridos, e 24 h para o híbrido 30F53H (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Valores médios referentes ao índice de ocorrência dos fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., *Fusarium verticillioides* (%) nos grãos de milho do híbrido AS1581 PRO ozonizados ou não por diferentes períodos.

Índice de ocorrência dos fungos (%)	Tratamento	Período de exposição (horas)				
		12	24	36	48	60
<i>Aspergillus flavus</i>	Controle	5,00 a	7,42 a	7,17 a	3,17 a	9,33 a
	Ozônio	4,25 a	3,67 b	3,50 b	2,50 a	0,58 b
<i>Penicillium</i> spp.	Controle	75,42 a	63,58 a	73,92 a	81,50 a	74,50 a
	Ozônio	18,83 b	13,00 b	10,17 b	2,42 b	0,25 b
<i>Fusarium verticillioides</i>	Controle	48,08 a	43,08 a	45,25 a	49,75 a	45,67 a
	Ozônio	15,08 b	10,50 b	7,58 b	4,33 b	0,33 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada variável não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 5 - Valores médios referentes ao índice de ocorrência dos fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., *Fusarium verticillioides* (%) nos grãos de milho do híbrido 30F53H ozonizados ou não por diferentes períodos.

Índice de ocorrência dos fungos (%)	Tratamento	Período de exposição (horas)				
		12	24	36	48	60
<i>Aspergillus flavus</i>	Controle	8,58 a	7,17 a	8,58 a	6,00 a	7,33 a
	Ozônio	11,42 a	4,33 a	0,50 b	0,08 b	0,25 b
<i>Penicillium</i> spp.	Controle	74,08 a	57,42 a	53,83 a	66,92 a	52,50 a
	Ozônio	5,17 b	8,42 b	6,00 b	4,50 b	0,75 b
<i>Fusarium verticillioides</i>	Controle	38,08 a	50,00 a	65,92 a	58,75 a	55,76 a
	Ozônio	29,25 b	11,25 b	5,50 b	3,67 b	0,75 b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada variável não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

No tempo de exposição de 60 h, os índices de ocorrência de *A. flavus*, *Penicillium* spp. e *F. verticillioides* para o híbrido AS1581 PRO reduziram o equivalente a 93,8, 99,7 e 99,3%, em relação ao controle. Ao analisar o efeito do ozônio no índice de ocorrência dos fungos, os resultados sugerem uma maior tolerância de *A. flavus* ao gás ozônio em razão do efeito fungicida do gás ter ocorrido somente a partir de 24 h de exposição (Tabela 4).

Para o híbrido 30F53H, os índices de ocorrência dos fungos *A. flavus*, *Penicillium* spp. e *F. verticillioides* apresentam redução superior a 96% no tempo de exposição de 60 h. A mesma tolerância do fungo *A. flavus* presente no híbrido AS1581 PRO ao gás ozônio foi observada no híbrido 30F53H, embora o efeito do gás tenha ocorrido a partir de 36 h (Tabela 5).

Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentadas as equações de regressão ajustadas para o índice de ocorrência (%) de *Penicillium* spp., *A. flavus* e *F. verticillioides* para os híbridos

AS1581 PRO e 30F53H, respectivamente, expostos ou não ao gás ozônio, em diferentes períodos de exposição (h). Nas Figuras 10 e 11 é possível observar que a redução do índice de ocorrência dos fungos foi maior à medida que se aumentou o período de exposição dos grãos ao O₃.

Tabela 6 - Equação de regressão ajustada referente ao híbrido AS1581 PRO, para o índice de ocorrência (%) de *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. e *Fusarium verticillioides* em função dos tempos de ozonização (h) e seus coeficientes de determinação (R²).

Índice de ocorrência dos fungos (%)	Tratamento	Equação de regressão	R ²
<i>Aspergillus flavus</i>	Controle	$\hat{y} = 6,41$	-
	Ozônio	$\hat{y} = 3,6998 + 0,0542^{ns} X - 0,0017^{\circ} X^2$	0,97
<i>Penicillium</i> spp.	Controle	$\hat{y} = 73,78$	-
	Ozônio	$\hat{y} = 23,2557 - 0,3979^* X$	0,97
<i>Fusarium verticillioides</i>	Controle	$\hat{y} = 46,36$	-
	Ozônio	$\hat{y} = 18,2650 - 0,2973^{**} X$	0,99

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

° Significativo a 10% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

^{ns} Não Significativo a 10% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

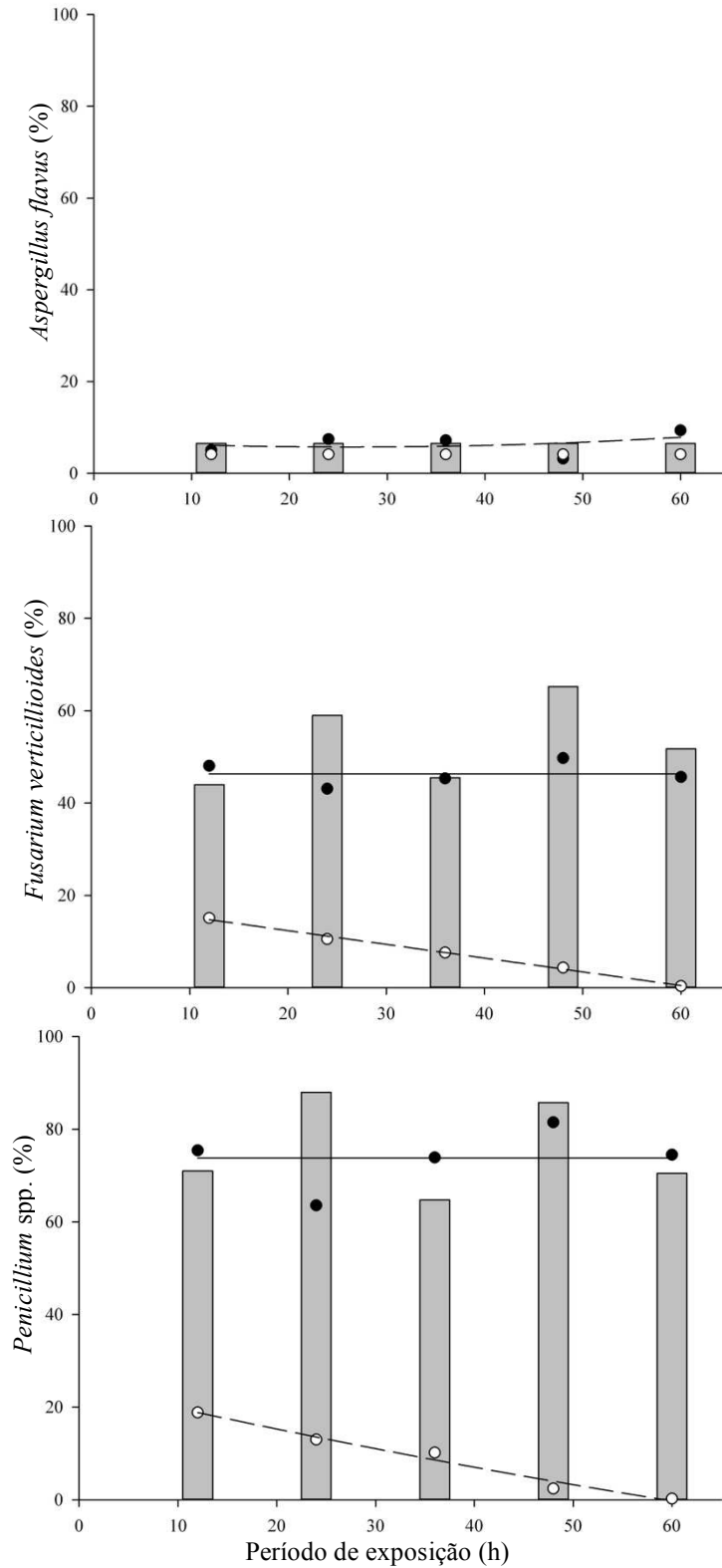


Figura 10 - Valores estimados e observados referentes a porcentagem de grãos contaminados por *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.* e *Fusarium verticillioides* em função do tempo em grãos de milho do híbrido AS1581 PRO expostos (○) ou não (●) ao gás ozônio e antes de cada tratamento (barras) nos períodos de exposição de 12, 24, 36, 48 e 60 h.

Tabela 7 - Equação de regressão ajustada referente ao híbrido 30F53H, para o índice de ocorrência (%) de *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp. e *Fusarium verticillioides* em função dos tempos de ozonização (h) e seus coeficientes de determinação (R²).

Índice de ocorrência dos fungos (%)	Tratamento	Equação de regressão	R ²
<i>Aspergillus flavus</i>	Controle	$\hat{y} = 7,53$	-
	Ozônio	$\hat{y} = 20,2500 - 0,8614^* X + 0,0089^* X^2$	0,99
<i>Penicillium</i> spp.	Controle	$\hat{y} = 60,95$	-
	Ozônio	$\hat{y} = 2,2560 + 0,3608^{ns} X - 0,0065^{\circ} X^2$	0,91
<i>Fusarium verticillioides</i>	Controle	$\hat{y} = 14,0140 + 2,2572^{\circ} X - 0,0262^{\circ} X^2$	0,90
	Ozônio	$\hat{y} = 46,4980 - 1,7553^* X + 0,0169^{\circ} X^2$	0,96

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

°Significativo a 10% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

^{ns} Não Significativo a 10% de probabilidade pelo teste “t” de Student.

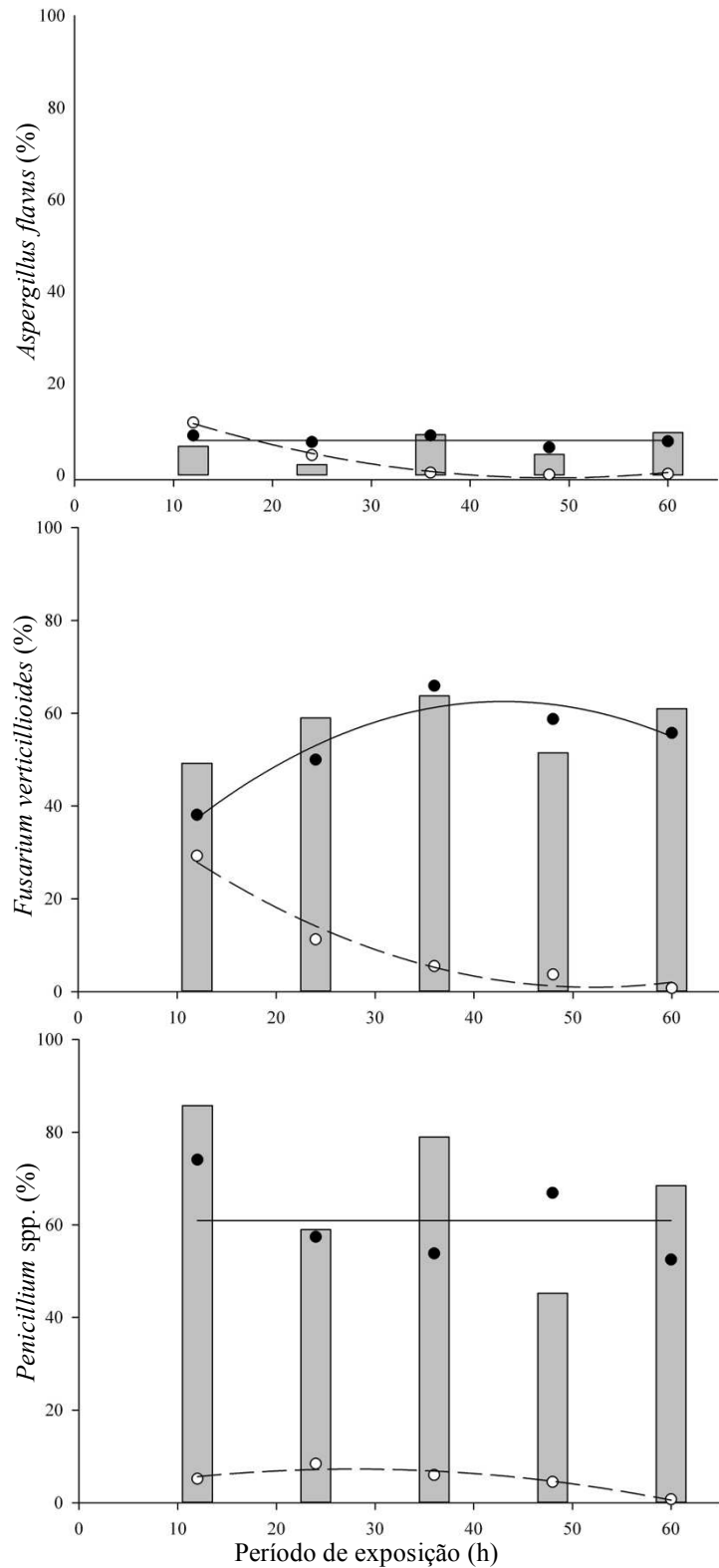


Figura 11 - Valores estimados e observados referentes a porcentagem de grãos contaminados por *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp.* e *Fusarium verticillioides* em função do tempo em grãos de milho do híbrido 30F53H expostos (○) ou não (●) ao gás ozônio e antes de cada tratamento (barras) nos períodos de exposição de 12, 24, 36, 48 e 60 h.

Em trabalho semelhante, White et al. (2013) examinando o efeito do O₃ gasoso nas concentrações de 0, 50, 500, 1000 e 15000 ppm (equivalente a aproximadamente 0; 0,11; 1,10; 2,20; 33,00 mg L⁻¹) por um período de 60 min e fluxo de 0,5 L min⁻¹ em grãos de milho com teor de água de 18, 22 e 26%, observaram que o ozônio é capaz de reduzir o índice de ocorrência de fungos em grãos de milho durante o armazenamento. Segundo os autores, a ozonização no milho com maior teor de água foi mais eficiente no controle da atividade fúngica quando comparada às amostras de milho com menor teor de água.

Do mesmo modo, Mylona et al. (2014) ao ozonizar grãos de milho, naturalmente contaminados com fungos do gênero *Fusarium*, nas concentrações de 100 e 200 ppm (equivalente a aproximadamente 0,22 e 0,44 mg L⁻¹), verificaram uma redução de 100% nas populações fúngicas, embora não tenha observado diferença entre as duas concentrações aplicadas do gás. Porém, alguns estudos comprovam que períodos de exposição mais longos podem ter um efeito mais efetivo no controle de fungos em grãos (ALENCAR et al., 2012; SANTOS et al., 2016).

Na Figura 12, é possível observar as diferenças ocasionadas pelo processo de ozonização no índice de ocorrência de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium* spp.

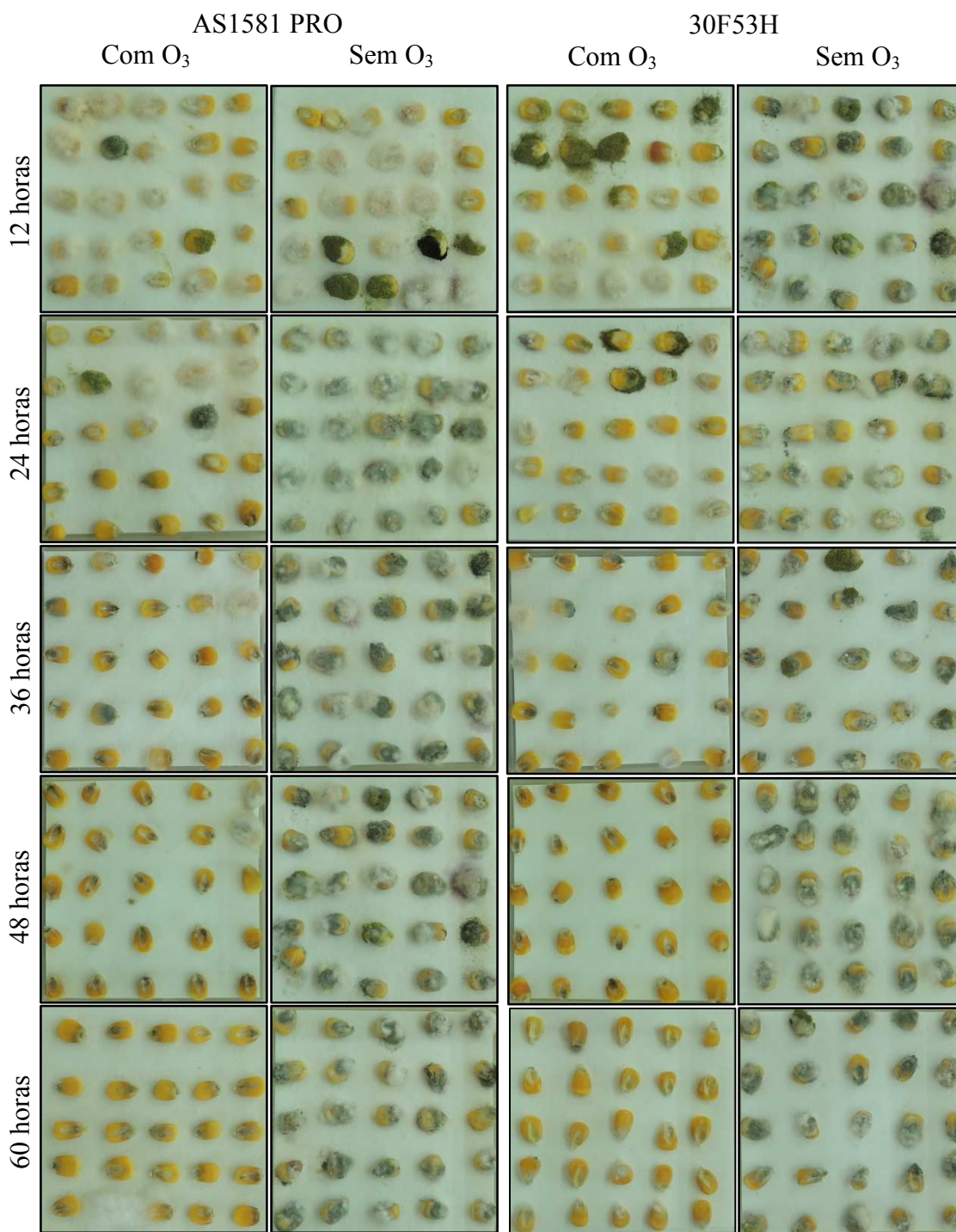


Figura 12 – Grãos de milho dos híbridos AS1581 PRO e 30F53H submetidos ou não ao processo de ozonização por diferentes períodos.

O gás ozônio, além de atuar como agente inibidor do crescimento e desenvolvimento de *A. flavus*, *Penicillium* spp. e *F. verticillioides*, também estendeu seu efeito fungicida aos demais fungos presentes na superfície dos grãos, como, por exemplo, *Diplodia maydis*.

Realizando testes em grãos de amendoim, Alencar et al. (2012) relataram que o percentual de grãos de amendoim infectados por *A. flavus* e *A. parasiticus* reduziu significativamente quando os mesmos foram ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, por um período de 96 h. Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2016) ao ozonizar grãos de arroz contaminados por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Segundo Greene et al. (2012) a ação fungicida do ozônio é explicada por sua capacidade de agir sobre diversos constituintes da parede e da membrana celular, inativando os microrganismos através da lise do envoltório celular, ocasionando o escoamento do conteúdo citoplasmático.

4.4. Efeito detoxificante do gás ozônio em híbridos de milho

O teor inicial de fumonisinas B₁ e B₂ presente no híbrido 30F53H excedeu mais de 150% em relação ao LMT determinado pela ANVISA (ANVISA, 2011). Ao avaliar efeito do gás ozônio, na concentração de 13,5 mg L⁻¹ em diferentes períodos de exposição, foi observado na redução significativa ($p > 0,05$) dos teores de fumonisinas B₁ e B₂. O período de 12 h de exposição ao gás ozônio reduziu o teor de FB₁ e FB₂ na ordem de, respectivamente, 67,31 e 76,62% para o híbrido 30F53H. Para o período de exposição de 24 h a redução no teor das fumonisinas B₁ e B₂ foram de 78,8 e 86,98%, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios referentes aos teores iniciais de fumonisina B₁ e fumonisina B₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e as porcentagens de remoção no controle e no tratamento com ozônio nos grãos de milho do híbrido 30F53H.

30F53H	FB ₁		FB ₂	
	12	24	12	24
Teor inicial ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	9115,7	12172	3692,2	5292,4
Remoção Controle (%)	24,83 aB	7,22 aB	10,22 aB	8,26 aB
Remoção O ₃ (%)	67,31 aA	78,8 aA	76,62 bA	86,98 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Ao quantificar o teor inicial de fumonisinas B₁ e B₂ presente no híbrido AS1581 PRO, observou-se valores inferiores ao LMT determinado pela ANVISA, entretanto este valor é bem próximo ao limite determinado pela Food and Drug Administration (FDA, 2015). Ao avaliar efeito do gás ozônio nessas amostras foi observado redução significativa ($p>0,05$) de 88,5% no teor de fumonisinas B₁ após exposição das amostras ao ozônio durante 24 h. A ozonização foi capaz de promover remoção superior a 82% no teor de fumonisinas B₁ e B₂ nos diferentes tempos de exposição (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios referentes aos teores iniciais de fumonisina B₁ e fumonisina B₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e as porcentagens de remoção no controle e no tratamento com ozônio nos grãos de milho do híbrido AS1581 PRO.

AS1581 PRO	FB ₁		FB ₂	
	12	24	12	24
Teor inicial ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	2279,8	2019,4	903	719,9
Remoção Controle (%)	8,1 a	14,69 aB	0,71 b	14,8 a
Remoção O ₃ (%)	>94,62	88,5 A	>86,16	>82,64

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Ao estudarem o efeito da ozonização em grãos de amendoim, Alencar et al. (2012) também observaram reduções nos teores de aflatoxinas totais e aflatoxina B₁ após 96 h de exposição ao gás ozônio na concentração de 21 mg L⁻¹. Ao estudar o efeito do O₃ em sementes de trigo, Wang et al. (2016) também observaram redução na incidência de desoxinivalenol (DON), micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium*. A degradação de DON foi na ordem de 26,4%, 39,2% e 53,5% após a exposição das amostras

a 75 mg L⁻¹ de ozônio durante 30, 60 e 90 min, respectivamente.

Luo et al. (2014), estudando o efeito do tratamento com ozônio sobre a degradação da aflatoxina B₁ (AFB₁) em milho, observaram que a taxa de degradação de AFB₁ aumentou com o acréscimo do período de exposição. A concentração utilizada foi de 90 mg L⁻¹ de ozônio durante 20 e 40 min. O teor de AFB₁ reduziu de 83 µg kg⁻¹ para 18,12 µg kg⁻¹ e 9,9 µg kg⁻¹, respectivamente.

4.5. Efeito do ozônio na qualidade dos grãos

Os valores médios do teor água, teor de proteínas, teor de lipídios, e teor de cinzas dos híbridos de milho AS1581 PRO e 30F53H, expostos ou não ao processo de ozonização, são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Valores médios do teor de água, proteínas, lipídios e cinzas do híbrido de milho AS1581 PRO para os diferentes períodos de exposição ao gás ozônio e seus respectivos controles.

Parâmetro avaliado (%)	Tratamento	Período de exposição (horas)				
		12	24	36	48	60
Teor de água (b.u.)	Controle	13,64 a	13,92 a	13,69 a	13,61 a	13,62 a
	Ozônio	13,54 a	13,86 a	13,52 a	13,01 b	12,87 b
Proteínas	Controle	8,65 a	8,69 a	9,35 a	9,19 a	9,02 a
	Ozônio	8,60 a	8,81 a	9,08 a	9,13 a	8,98 a
Lipídios	Controle	4,66 a	4,98 a	4,56 a	4,95 a	5,00 a
	Ozônio	4,76 a	4,54 a	4,61 a	4,90 a	5,03 a
Cinzas	Controle	1,19 a	1,11 a	1,13 a	1,16 a	1,04 a
	Ozônio	1,11 a	1,19 a	1,22 a	1,18 a	1,15 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 11 – Valores médios do teor de água, proteínas, lipídios e cinzas do híbrido de milho 30F53H para os diferentes períodos de exposição ao gás ozônio e seus respectivos controles.

Parâmetro avaliado (%)	Tratamento	Período de exposição (horas)				
		12	24	36	48	60
Teor de água (b.u.)	Controle	12,82 a	12,87 a	12,87 a	13,50 a	12,97 a
	Ozônio	12,89 a	12,89 a	13,08 a	13,13 a	12,75 a
Proteínas	Controle	8,98 a	8,90 a	8,77 a	8,77 a	8,73 a
	Ozônio	8,94 a	8,73 a	8,83 a	9,06 a	8,73 a
Lipídios	Controle	4,16 a	3,90 a	3,97 a	3,92 a	4,26 a
	Ozônio	3,98 a	3,83 a	3,71 a	3,89 a	4,16 a
Cinzas	Controle	1,00 a	1,00 a	1,02 a	1,01 a	0,97 a
	Ozônio	1,08 a	1,06 a	0,99 a	1,01 a	1,00 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Os teores de água, lipídios, proteínas e cinzas não apresentaram diferenças significativas, pelo teste de Tukey ($p>0,05$), entre os diferentes períodos de exposição ao O_3 e seus respectivos controles para o híbrido 30F53H, entretanto foi observado redução significativa no teor de águas nos grãos de milho do híbrido AS1581 PRO nos períodos de exposição de 48 e 60 h.

Resultados análogos foram observados por Mendez et al. (2003) ao ozonizar grãos de trigo. O teor de proteína e cinza dos grãos não apresentaram diferença significativa entre os grãos de trigo tratados ou não com ozônio. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo com grãos de amendoim (ALENCAR et al., 2011). A ozonização por um período de 96 h e nas concentrações de 13 e 21 $mg L^{-1}$, não causou alterações significativas no teor de ácidos graxos livres, óleo bruto e peróxido nos grãos de amendoim. Do mesmo modo, não foi observado alteração significativa no teor de lipídios, de castanha do Brasil, após a aplicação de O_3 na concentração de 10 $mg L^{-1}$ durante 90 min (SCUSSEL et al., 2011). Comportamento análogo foi observado por Sandhu et al. (2011), em que a ozonização na concentração de 1500 ppm (equivalente a aproximadamente 3,30 $mg L^{-1}$) durante 2, 4, 5, 9 e 18 min e fluxo de 2,5 $L min^{-1}$, não alterou o teor de cinzas da farinha de trigo.

O decréscimo no teor de água dos grãos de milho do híbrido AS1581 PRO observado no presente trabalho, também foi contatado para Alencar et al. (2012). O valor

médio do teor de água dos grãos de amendoins reduziu de 7,6% para 4,4%, quando expostos ao ozônio por 96 h. Semelhantemente, Santos et al. (2016), ao ozonizar grãos de arroz em casca observou que o valor médio estimado do teor de água dos grãos reduziu 1,0% quando o período de exposição foi de 60 h.

Devido ao equilíbrio higroscópico, o teor de água dos grãos de milho do híbrido AS1581 PRO reduziu a medida em que aumentou o tempo de exposição ao gás ozônio. O teor de água de equilíbrio é alcançado quando a pressão parcial de vapor de água no produto se iguala à do ar que o envolve (CORRÊA et al., 2005). A fim de reduzir a perda de água dos grãos de milho, no presente trabalho, utilizou-se um recipiente contendo solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl).

Juntamente com a preocupação crescente sobre o uso de pesticidas prejudiciais a saúde humana e animal, o uso do ozônio pode oferecer vantagens exclusivas para o processamento de grãos, pois reduz as fontes de contaminação e preserva a qualidade do produto (TIWARI et al., 2010). Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que o ozônio, além de eficaz fungicida, é capaz de detoxificar grãos de milho com elevado teor de micotoxinas, sem interferir na qualidade dos grãos em período de exposição de até 36 h.

5. CONCLUSÕES

- O índice de ocorrência dos fungos *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium* spp. reduziu 96% no híbrido 30F53H após 60 h de exposição ao ozônio na concentração de 13,5 mg L⁻¹. Já no híbrido AS1581 PRO foram observadas reduções de 93,8, 99,3 e 99,7 para o índice de ocorrência de *A. flavus*, *F. verticillioides* e *Penicillium* spp., na mesmo tempo de exposição e concentração.
- A concentração de 13,5 mg L⁻¹ e 24 h de exposição ao ozônio reduziu o teor de fumonisinas B₁ e B₂ em 78,8 e 86,98%, respectivamente, para o híbrido 30F53H e já para o híbrido AS1581 PRO a redução foi de 88,5% no teor de fumonisina B₁ e mais de 82% o teor de fumonisina B₂.
- O teor de água, proteínas, lipídios e cinzas não foram alterados pela exposição dos híbridos ao gás ozônio na concentração de 13,5 mg L⁻¹, exceto para o híbrido AS1581 PRO nos tempos de exposição ao ozônio superiores a 48 h.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que a

utilização do gás ozônio é capaz de reduzir a incidência de fungos e o teor de fumonisinas em grãos de milho, sem alterar a qualidade físico-química dos grãos.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; MIRHOSSEINI, H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. **Food Control**, v.23, n.1, p.113-119, 2012.
- AKBAS, M.Y. & OZDEMIR, M. Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.86, n.13, p.2090-2104, 2006.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.A.; SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; CARVALHO, M.C.S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.4, p.899–905, 2012.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.A.; MARTINS, M.A.; COSTA, A.R.; CECON, P.R. Decomposition kinetics of gaseous ozone in peanuts. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, v.31, n.5, p.930-930, 2011.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A.; DURÁN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v.27, p.818-824, 2004.
- ALWI, N.A. & ALI, A. Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on freshcut bell pepper using gaseous ozone. **Food Control**, v.46, p.304-311, 2014.
- AMAIKE, S. & KELLER, N.P. *Aspergillus flavus*. **The Annual Review of Phytopathology**, v.49, p.107-133, 2011.
- ANVISA 2011 – Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 22 de fevereiro de 2016.
- AOCS. **American Oil Chemists' Society**. Official Method Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Urbana: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, 2005.
- BANKOLE, S.A. & ADEBANJO, A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.9, p.254-263, 2003.
- BARBONI, T.; CANNAC, M.; CHIARAMONTI, N. Effect of cold storage and ozone treatment on physicochemical parameters, soluble sugars and organic acids in Actinidia

- deliciosa. **Food Chemistry**, v.121, n.4, p.946–951, 2010.
- BATT, C.A. & TORTORELLO, M. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2 ed. New York: Academic Press, 2014. 3248 p.
- BAYMAN, P. & BAKER, J.L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**, v.162, p.215-223, 2006.
- BENNETT, J.W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: Machida, M.; Gomi, K. (eds). **Aspergillus molecular biology and genomics**. Japão: Horizon Scientific Press, 2010. 238 p.
- BINDER, E.M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, p.149-166, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 27 de abril de 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA, 2009. 202p. (a)
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análises de sementes**. Brasília: MAPA, 2009. 399 p. (b)
- BURGESS L.W.; SUMMERELL, B.A.; BACKHOUSE, D. **Biodiversity and population studies on Fusarium**. In: LOGRIECO A, SEIFERT K A, LESLIE J F A. Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species, v.30, p.1-11, 1997.
- CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.3, p. 319-323, 2002.
- CARÃO, A.C.P.; BURBARELLI, M.F.C.; POLYCARPOI, G.V.; SANTOS, A.R.; ALBUQUERQUEI, R.; OLIVEIRA, C.A.F. Métodos físicos e químicos de detoxificação de a toxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, v.44, p.699-705, 2014.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Composição química de sementes**. In: CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000. cap.5, p.66-97.
- CAST, 2003 - Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. Ames, Iowa, USA, n.139, 199 p.

- CHELME-AYALA, P.; GAMAL EL-DIN, M.; SMITH, D.W. Kinetics and mechanism of the degradation of two pesticides in aqueous solutions by ozonation. **Chemosphere**, v.78, n.5, p.557-562, 2010.
- CHERNICHARO, C.A.L.; DANIEL, L.A.; SENS, M.; CORAUCCI FILHO, B. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por sistemas de desinfecção. In: CHERNICHARO, C. A. L. coord. **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. Belo Horizonte, p.377-453, 2001.
- CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p. 341-349, 2008.
- CHULZE, S.N. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. **Food Additives and Contaminants**, v.27, p.651–657, 2010.
- CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E; EATON, A.D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Denver: American Water Works Association, 2000, 1220p.
- CONAB, 2016 - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 5- Safra 2015/16 - Quinto levantamento**, Brasília, p. 1-182, fevereiro 2016. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_02_04_11_21_34_boletim_graos_fevereiro_2016_ok.pdf>. Acesso em 26/02/2016.
- CORCUERA, L.A.; ARBILLAGA, L.; VETTORAZZI, A.; AZQUETA, A. e LÓPEZ DE CERAIN, A. Ochratoxin A reduces aflatoxin B₁ induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells. **Food Chemical Toxicology**, v.49, p.2883-2889, 2011.
- CORRÊA, P.C.; GONELI, A.L.D.; RESENDE, O.; RIBEIRO, D.M. Obtenção e modelagem das isotermas de dessecção e do calor isotérmico de dessecção para grãos de trigo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.7, n.1, p.39-48, 2005.
- COVARELLI, L.; BECCARI, G.; SALVI, S. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.9, p.2365-2369, 2011.
- DALL'ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; BATTILANI, P. Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection, fumonisin production and masking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.3800–3808, 2012.

- DALL'ASTA, C.; FALAVIGNA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. In vitro digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.12042–12047, 2010.
- DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S.; KOCHMAN, J.K. Fusarium wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v.90, p.692-703, 2006.
- DEL FAVA, C.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; NASSAR, A.F.C.; CABRAL, A.D.; TORELLI, C.S.; CUNHA, M.S.; CUNHA, E.M.S. Ocorrência de leucoencefalomalácia (LEME) em equídeos no estado de São Paulo, Brasil: achados anatomopatológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.6, p.488-494, 2010.
- DI BERNARDO, L. & DANTAS, A.D.B. Métodos e Técnicas de Tratamento de Água. Rio de Janeiro: **ABES**, v.2, cap. 16, p.1250-1267, 2005.
- DUARTE, J.O.; GARCIA, J.C.; MIRANDA, R.A. **Economia da Produção**. Embrapa Milho e Sorgo Sistema de Produção, 7ed, set. 2011. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/economia.htm> Acesso em 20/01/2016.
- DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v.27, n.2, p.187-198, 2010.
- EMAN, 2000. European Mycotoxin Awareness Network. **Decontamination of mycotoxin contaminated raw materials**. Disponível em: <<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=64>>. Acesso em: 04 de jan, 2015.
- EMBRAPA, 2006 - DUARTE, J.O. **Introdução e importância econômica do milho**. In: CRUZ, J.C.; VERSIANI, R.P.; FERREIRA, M.T.R. (Ed.). Cultivo do milho. Sete Lagoas: (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 1). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_1_ed/importancia.htm> Acesso em: 05 de fev, 2016.
- EMBRAPA, 2012 - PIMENTEL, M.A.G. & FONSECA, M.J.O. **Cultivo do Milho – Colheita e pós-colheita – Secagem e armazenamento**. Disponível em: <

- http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/colsecagem.htm>. Acesso em: 05 de jun, 2015
- FAO, 2011. **Missing Food: The Case of Post-harvest Grain Losses in Sub-Saharan Africa**. In: Economic Sector Work Report No. 60371-AFR. World Bank, Washington, DC.
- FAO, 2016 – SAVE FOOD: **Global Initiative on food loss and waste reduction**. Disponível em: < <http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en/>>. Acesso em: 03 de mar, 2016.
- FDA – Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance**. Disponível em: < <http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/ucm109231.htm> >. Acesso em: 17 de abril, 2016.
- FLETCHER M.T. & BLANEY B.J. Mycotoxins. In: Wrigley, C.; Corke, H.; Seetharaman, K.; Faubion, J. (Eds). **Encyclopedia of food grains**. St Lucia, Australia, Elsevier Ltd, p.290-296, 2016.
- FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R.A.; LARSEN, T.O.; THRANE, U. Fumonisin B production by 2 *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.9727-9732, 2007.
- GAZZOTTI, T.; BIAGI, G.; PAGLIUCA, G.; PINNA, C.; SCARDILLI, M.; GRANDI, M.; ZAGHINI, G. Occurrence of mycotoxins in extruded commercial dog food. **Animal Feed Science and Technology**, v.202, p.81–89, 2015.
- GRAY, N.F. Chapter Thisty-three – Ozone disinfection. **Microbiology of Waterborne Diseases**, 2ed, p.599-615, 2014.
- GREENE, A.K.; GÜZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A.C. Chemical and physical properties of ozone. In: O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. (Eds.). **Ozone in food processing**. West Sussex, UK: The Atrium, p.19-29, 2012.
- GRENIER, B.; BRACARENSE, A.P.F.L.; SCHWARTZ, H.E.; TRUMEL, C.; COSSALTER, A.M.; SCHATZMAYR, G.; KOLF-CLAUW, M.; MOLL, W.; OSWALD, I.P. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B₁ correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. **Biochemical Pharmacology**, v.83, n.10, p.1465-1473, 2012.

- GRONTOFT, T.; HENRIKSEN, J.F.; SEIP, H.M. The humidity dependence of ozone deposition onto a variety of building surfaces. **Atmospheric Environment**, v.38, p.59-68, 2004.
- GUTLEB, A.C.; MORRISON, E.; MURK, A.J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.11, p.309-320, 2002.
- HANSEN, L.S.; HANSEN, P.; JENSEN, K.V. Effect of gaseous ozone for control of stored product pests at low and high temperature. **Journal of Stored Products Research**, v.54, p.59-63, 2013.
- HELENO, F.F.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; FARONI, L.R.A.; SOUSA, F.A.; OLIVEIRA, A.F. Ozone Treatment for the Removal of Residual Chlorothalonil and Effects on the Quality of Table Grapes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26, p.687-694, 2015.
- HILL, A.G. & RICE, R.G. **Handbook of Ozone Technology and Applications**. Michigan: Ann Arbor Science, 1982, 386 p.
- HUDSON, J.B. & SHARMA, M. The practical application of ozone gas as an anti-fungal (anti-mold) agent. **Ozone-Science & Engineering**, v.31, n.4, p.326-332, 2009.
- HUSSEIN, H.S. & BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.
- ISIKBER, A.A. & ATHANASSIOU, C.G. The use of ozone gas for the control of insects and micro-organisms in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.64, p.139-145, 2015.
- IVIC, D.; DOMIJAN, A.; PERAICA, M.; MILICEVIC, T. e CVJETKOVIC, B. *Fusarium* spp. Contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. **Archives of industrial hygiene and toxicology**, v.60, p.435-442, 2009.
- KECHINSKI, C.P.; MONTERO, C.R.S.; NOREÑA, C.P.Z.; TESSARO, I.C.; MARCZAK, L.D.F.; BENDER, R.J.; Effects of Ozone in Combination with Hydrothermal Treatment and Wax on Physical and Chemical Properties of Papayas. **Ozone: Science & Engineering**, v.34, p.57-63, 2012.
- KELLS, S.A.; MASON, L.J.; MAIER, D.E.; WOLOSOSHUK, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products**

- Research**, v. 37, n. 4, p. 371-383, 2001.
- KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- KHALESİ, M. & KHATİB, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.32, n.2, p.113-121, 2011.
- KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v.62, n.9, p.1071-1087, 1999.
- KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v.8, p.713-722, 2007.
- KLICH, M.A. & PITT, J. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society**, n.91, p.99-108, 1988.
- LANZA, F.E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R.V.; QUEIROZ, V.A.V.; COTA, L.V.; SILVA, D.D.; SOUZA, A.G.C. e FIGUEIREDO, J.E.F. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**, v.65, p.232-237, 2014.
- LAPOLLI, F.R.; SANTOS, L.F.; HÁSSEMER, M.E.N.; AISSE, M.M.; PIVELI, R.P. **Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização**. In. GONÇALVES, R. F. (Coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica, p.169-208, 2003.
- LATGÉ, J.P. & STEINBACH, W.J. **Aspergillus fumigatus and Aspergillosis**. Washington, US., 2009, 569p.
- LAWLEY, R.; CURTIS, L.; DAVIS, J. **The food safety hazard guidebook**. 2ed. London, UK, 2012, 534p.
- LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2ed, Curitiba: Ed. do Autor, 1997, 134p.
- LESLIE, J.F. & LOGRIECO, A.F. **Mycotoxin Reduction in Grain Chains**. 1.ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2014, 376p.

- LINO, C.M.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p. 181-192, 2004.
- LOPES, D.C. & SANTANA, M.C.A. **Determinação de proteína em alimentos para animais: métodos químicos e físicos**. Viçosa: UFV, 2005, 98p.
- LUO, X.; WANG, R.; WANG, L.; LI, Y.; BIAN, Y.; CHEN, Z. Effect of ozone treatment on aflatoxin B₁ and safety evaluation of ozonized corn. **Food Control**, v.37, p.171-176, 2014.
- MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxina and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Den Haag, v.163, p.249–260, 2007.
- MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SANCHEZ, J.; BUCKLER, E.S.; DOEBLEY, J.F. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceeding of the National Academy Sciences**, v.99, p.6080-6084, 2002.
- MATTSSON, J. L. Mixtures on real world: The importance of plant self-defense toxicants, mycotoxins and the human diet. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.223, p.125-132, 2007.
- MCDONOUGH, M.X.; MASON, L.J.; WOLOSHUK, C.P. Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different exposure intervals. **Journal of Stored Products Research**, v.47, p.306-310, 2011.
- MENDEZ, F.; MAIER, D. E.; MASON, L. J.; WOLOSHUCK, C. P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.33-44, 2003.
- MICHAILIDES, T.J. & THOMIDIS, T. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rots of peaches in Greece. **Plant Pathol**, v.56, p.352, 2007.
- MORGAVI, D.P. & RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.201–212, 2007.

- MOTARJEMI, Y.; MOY, G.; TODD, E. (Eds). 2014. **Encyclopedia of Food Safety**. London: Elsevier Ltd, 2014.
- MUNKVOLD, G.P. & DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?. **Plant Disease**, v.81, p.556- 565, 1997.
- MYLONA, K.; KOGKAKI, E.; SULYOK, M.; MAGAN, N. Efficacy of gaseous ozone treatment on spore germination, growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* *in vitro* and *in situ* in maize. **Journal of Stored Products Research**, v.59, p.178-184, 2014.
- NERBASS, F.R.; CASA, R.T.; ANGELO, H.R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.7, p.30-36, 2008.
- NIDERKORN, V.; MORGAVI, D.; ABOAB, B.; LEMAIRE, M.; BOUDRA, H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in binding of fumonisin B₁ and B₂ by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, n.3, v.106, p. 977-985, 2009.
- O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P.J.; RICE, R.G. **Ozone in food processing**. West Sussex, UK: The Atrium, p.55-80, 2012.
- OZKAN, R.; SMILANICK, J.L.; KARABULUT, O.A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.60, p.47-51, 2011.
- PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Circular Técnica**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, n.15, p.1-6, 2006.
- PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.S29-S35, 2007.
- PEREIRA, A.M.; FARONI, L.R.A.; SOUSA, A.H.; URRUCHI, W.I.; ROMA, R.C.C. Efeito imediato e latente da fumigação com ozônio na qualidade dos grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.32, n.2, p.100-110, 2007.
- PICOT, A.; BARREAU, C.; PINSON-GADAIS, L.; CARON, D.; LANNOU, C.; RICHARD-FORGET, F. Factors of the *Fusarium verticillioides* - maize environment modulating fumonisin production. **Critical Reviews in Microbiology**, v.36, n.3, p. 221-231, 2010.

- PRIYANKA, B.S.; RASTOGI, N.K.; TIWARI, B.K. Opportunities and Challenges in the Application of Ozone in Food Processing. In: DA-WEN SUN (Ed). **Emerging Technologies for Food Processing**. 2ed, Dublin, Elsevier Ltd, 2014, p.335–358
- QIANG, Z.; LIU, C.; DONG, B.; ZHANG, Y. Degradation mechanism of alachlor during direct ozonation and O₃/H₂O₂ advanced oxidation process. **Chemosphere**, v.78, n.5, p.517-526, 2010.
- RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v.35, p.1003-1009, 2005.
- RIBEIRO, P.E.A. **Implementação de análise de nitrogênio total em solo pelo método de Dumas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010.
- SAMSON, R.A. Current systematics of the genus *Aspergillus*. In: POWEL, K.A.; RENWICK, A. & PEBERDY, J.F. **The Genus *Aspergillus*: From Taxonomy and genetics to industrial application**. Canterbury, United Kingdom, Springer, 1994, p.260-276.
- SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004.
- SANDHU, H.P.S.; MANTHEY, F.A.; SIMSEK, S.; OHM, J.B. Comparison between potassium bromate and ozone as flour oxidants in breadmaking. **Cereal Chemistry**, v.88, n.1, p.103-108, 2011.
- SANTOS, J. P. Controle de pragas durante o armazenamento de milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p.257-302, 2008.
- SANTOS, R.R.; FARONI, L.R.A.; CECON, P.R.; FERREIRA, A.P.S.; PEREIRA, O.L. Ozone as fungicide in rice grains. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.20, n.3, p.230-235, 2016.
- SAVI, G.D.; PIACENTINI, K.C.; BORTOLOTTO T.; SCUSSEL, V.M. Degradation of bifenthrin and pirimiphos-methyl residues in stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.) by ozonation. **Food Chemistry**, n.203, p.246–251, 2016.
- SCUSSEL, V.M.; GIORDANO, B.N.; SIMAO, V.; MANFIO, D.; GALVÃO, S.; RODRIGUES, M.N.F. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of

- packaged shelled Brazil nuts during storage. **International Journal of Analytical Chemistry**, p.1-9, 2011.
- SHEELAMARY, M. & MUTHUKUMAR, M. Effectiveness of ozone in inactivating *Listeria monocytogenes* from Milk Samples. **World Journal of Young Researchers**, v.1, n.3, p.40-44, 2011.
- SORIANO, J.M. & DRAGACCI, S. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. **Food Research International**, v.37, n.4, p.367-374, 2004.
- SOUSA, A.H.; FARONI, L.R.A.; PIMENTEL, M.A.G.; GUEDES, R.N.C.; GUEDES, R.N.C. Ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) populations under selection pressure from ozone. **Journal of Stored Products Research**, v.65, p.1-5, 2016.
- STUCKI, S.; SCHULZE, D.; SCHUSTER, D.; STARK, C. Ozonization of purified water systems. **Pharmaceutical Engineering**, v.25, n.1, p.1-7, 2005.
- SWEENEY, J. & DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.141-158, 1998.
- TIWARI, B.K.; BRENNAN, C.S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P.J.O.; D'ONNELL, C.P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v.51, p.248-255, 2010.
- TORLAK, E.; AKATA, I.; ERCI, F.; UNCU, A.T. Use of gaseous ozone to reduce aflatoxin B1 and microorganisms in poultry feed. **Journal of Stored Products Research**, v.68, p.44-49, 2016.
- USDA, 2016 - United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. Circular Series. WAP 3-16 Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em 19/03/2016.
- VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v.37, p.1443-1467, 2003.
- WANG, L.; SHAO, H.; LUO, X.; WANG, R.; LI, Y.; LI, Y.; LUO, Y.; CHEN, Z. Effect of Ozone Treatment on Deoxynivalenol and Wheat Quality. **PLoS ONE**, v.11, n.1, p.1-13, 2016.
- WANG, L.; LUO, Y.; LUO, X.; WANG, R.; LI, Y.; SHAO, H.; CHEN, Z. Effect of

deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains. **Food Control**, v.66, p.137-144, 2016.

WHITE, S.D.; MURPHY, P.T.; LEANDRO, L.F.; BERN, C.J.; BEATTIE, S.E.; LEEUWEN, J.H.V. Mycoflora of high-moisture maize treated with ozone. **Jornal of Stored Products Research**, v.55, p.84-89, 2013.

WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M.A. Investigation of gaseous ozone as an anti-fungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.81, n.7, p.1288-1293, 2006.

YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.192–202, 2005.