

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CÁSSIA MARTINS RIBEIRO

**MÉTODOS PARA REDUZIR OS NÍVEIS DE MICOTOXINAS NA CEVADA  
DESTINADA PARA A FABRICAÇÃO DE CERVEJA**

Porto Alegre, junho de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CÁSSIA MARTINS RIBEIRO

**MÉTODOS PARA REDUZIR OS NÍVEIS DE MICOTOXINAS NA CEVADA  
DESTINADA PARA A FABRICAÇÃO DE CERVEJA**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Química Industrial.

Profa. Dra. Juliane Elisa Welke  
Orientadora

Porto Alegre, junho de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, Luiz e Ivanir, por todo amor, dedicação e apoio.

Ao meu namorado, Rafael, por todo amor, apoio e incentivo.

À professora Juliane Welke, pela orientação, conselhos e dedicação.

Às amigas, Greice e Camila, pela amizade, pelas risadas e desabafos.

Ao amigo Tiago, por sempre me ajudar nos estudos e tirar minhas dúvidas.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram durante minha jornada acadêmica até o momento, muito obrigada.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de cevada no Brasil e no mundo, desde 2013/14 .....	11
Tabela 2 – Ocorrência de micotoxinas em cervejas produzidas em diferentes países .....	13
Tabela 3 – Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em grão de cevada e cevada maltada .....	14
Tabela 4 – Micotoxinas encontradas em grãos, seus efeitos tóxicos e fungos produtores .....	15
Tabela 5 – Propriedades físicas do ozônio puro .....	19
Tabela 6 – Características dos lotes de cevada avaliadas no estudo de Kottapalli <i>et al.</i> (2006) .....	30
Tabela 7 - Efeito dos <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> no crescimento de <i>F. graminearum</i> e na produção de desoxinivalenol (DON) .....	35
Tabela 8 - Efeito dos <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> no crescimento de <i>F. culmorum</i> e na produção de zearalenona (ZEA) .....	36
Tabela 9 - Efeito dos <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> no crescimento de <i>F. proliferatum</i> e na produção de fumonisina B1 (FUB1) .....	36
Tabela 10 – Resumo dos métodos estudados em relação à redução dos níveis de micotoxinas .....	38

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Estrutura molecular de micotoxinas comumente presentes em cereais .....	12
Figura 2 – Estruturas de ressonância da molécula de ozônio .....	19
Figura 3 – Diagrama esquemático da geração de ozônio pelo método de descarga eletroquímica (efeito corona) .....	20
Figura 4 – Efeito da ozonização na infecção por <i>Fusarium</i> na cevada com (A) baixa contaminação (0,25 µg/g) e (B) alta contaminação (1,4 µg/g) em cada estágio da maltação .....	23
Figura 5 – Efeitos da ozonização na concentração de desoxinivalenol na cevada com (A) baixa contaminação (0,25 µg/g) e (B) alta contaminação (1,4 µg/g) em cada estágio da maltação .....	24
Figura 6 - Efeito da ozonização na energia germinativa na cevada com (A) baixa contaminação (0,25 µg/g) e (B) alta contaminação (1,4 µg/g) em cada estágio da maltação .....	26
Figura 7 – Espectro eletromagnético .....	27
Figura 8 - Efeito da radiação por feixe de elétrons na infecção por <i>Fusarium</i> nas amostras de (A) cevada e (B) malte preparado da cevada irradiada .....	31
Figura 9 – Efeito da radiação por feixe de elétrons na concentração de desoxinivalenol (DON) nos lotes de (A) cevada e (B) do respectivo malte produzido a partir da cevada irradiada .....	32
Figura 10 - Efeito da radiação por feixe de elétrons na energia germinativa nos lotes de cevada .....	33

## RESUMO

A pesquisa de métodos para reduzir os níveis de micotoxinas na cevada destinada para a fabricação de cerveja foi feita nas bases de dados “*Web of Science*” e “*Scopus*”. Três métodos são sugeridos na literatura para esse fim, incluindo a ozonização, a radiação e o uso de bactérias ácido lácticas. A eficiência desses métodos para reduzir o desenvolvimento de fungos toxigênicos e/ou micotoxinas sem afetar a capacidade germinativa da cevada foi avaliada. O uso do ozônio não prejudica a capacidade germinativa da cevada. Entretanto, pouca diferença entre a porcentagem de infecção fúngica e nível de DON (desoxinivalenol) foi observada entre as amostras tratadas ou não com ozônio. Cabe salientar que apesar do custo de implementação da ozonização ser mais baixo do que dos demais métodos, o gerador de ozônio orçado aplica-se a um silo pequeno (2,00 x 1,80m), o que não reflete a realidade das maltarias. Em relação à aplicação de radiação, não foi possível chegar a uma dose de radiação que diminua eficientemente a infecção por *Fusarium*, reduza os níveis de DON e não prejudique a capacidade germinativa da cevada. O biocontrole através do uso de BAL, especialmente *Lactobacillus rhamnosus*, parece ser promissor no que diz respeito à redução no desenvolvimento de fungos e nos níveis de micotoxinas. Entretanto, a utilização desses microrganismos deve ser pesquisada em relação à sua influência na capacidade germinativa da cevada.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. ESTADO DA ARTE .....</b>	<b>10</b>
2.1 ELABORAÇÃO DE CERVEJA .....	10
2.2 CEREAIS USADOS PARA A ELABORAÇÃO DE CERVEJA .....	11
2.3 MICOTOXINAS .....	12
2.3.1 Ocorrência de micotoxinas na cerveja .....	13
2.3.2 Efeitos tóxicos das micotoxinas encontradas na cerveja .....	15
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>17</b>
<b>5. PROPOSTA TECNOLÓGICA .....</b>	<b>18</b>
5.1 MÉTODOS PARA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE MICOTOXINAS NA CEVADA PARA A ELABORAÇÃO DE CERVEJA .....	18
5.1.1 Ozonização .....	18
5.1.2 Radiação .....	27
5.1.3 Bactérias Ácido Lácticas .....	33
5.2 Estimativa de custos para implantação de tecnologia para reduzir níveis de micotoxinas na cevada .....	37
<b>6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A APLICAÇÃO DA OZONIZAÇÃO, RADIAÇÃO E BAL PARA REDUZIR FUNGOS E MICOTOXINAS DA CEVADA.....</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE ABREVIações

<b>AFB1</b>	Aflatoxina B1
<b>AFB2</b>	Aflatoxina B2
<b>AFG1</b>	Aflatoxina G1
<b>AFG2</b>	Aflatoxina G2
<b>AFs</b>	Aflatoxinas
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASBC</b>	<i>American Society of Brewing Chemists</i>
<b>BAL</b>	Bactérias Ácido Lácticas
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CONAB</b>	Companhia Nacional de Abastecimento
<b>DON</b>	Deoxinivalenol
<b>EG</b>	Energia germinativa
<b>EPRI</b>	<i>Electric Power Research Institute</i>
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nation</i>
<b>FUB1</b>	Fumonisina B1
<b>FUB2</b>	Fumonisina B2
<b>FIPA</b>	<i>Food Irradiation Processing Alliance</i>
<b>IAEA</b>	<i>International Atomic Energy Agency</i>
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>JECFA</b>	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
<b>JECFI</b>	<i>Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food</i>
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MMA</b>	Ministério do Meio Ambiente
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida
<b>USDA</b>	<i>United States Department of Agriculture</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>ZEA</b>	Zearalenona



## 1. INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto oriundo do malte de um cereal e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. O Brasil é um dos principais fabricantes de cerveja do mundo, cuja produção está atrás apenas da China e dos Estados Unidos. De acordo com os mais recentes dados disponíveis, 14 bilhões de litros de cerveja foram produzidos no Brasil em 2014, sendo que o consumo dessa bebida pelos brasileiros foi de aproximadamente 67 litros per capita.

A qualidade da cerveja e das matérias-primas utilizadas para sua produção é de extrema importância, visto que influenciará nas características sensoriais desta bebida. O desenvolvimento de fungos em alguma etapa do cultivo, transporte ou armazenamento dos cereais destinados à elaboração da cerveja ou ainda durante a maltação pode influenciar negativamente no aroma e sabor da cerveja. Além disso, alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos, chamados de micotoxinas.

A diminuição dos níveis de micotoxinas é importante tanto do ponto de vista toxicológico quanto econômico, visto que as micotoxinas podem ser mutagênicas, imunossupressoras, desreguladoras endócrinas e/ou cancerígenas. Além disso, a presença destes compostos pode dificultar, ou até impedir, as exportações de alimentos e bebidas.

Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu limites para a presença de micotoxinas em vários tipos de alimentos, incluindo o grão de cevada e a cevada maltada. As empresas têm manifestado temor em relação a estes limites. Em resposta, a ANVISA declarou que a possibilidade de revogação dos limites em vigor está descartada, mas que a vigência destes limites que seria em 2016, está prorrogada para janeiro de 2017.

Considerando que a presença de micotoxinas na cevada é inevitável em muitos casos, a pesquisa de métodos para reduzir os níveis destes compostos tóxicos é primordial para garantir que a cerveja produzida possua concentração de micotoxinas que não ofereçam risco para a saúde da população.

## 2. ESTADO DA ARTE

### 2.1 Elaboração da cerveja

A cerveja é produzida a partir de cereais maltados. A primeira etapa da elaboração do malte é a maceração da cereal, que envolve o aumento da umidade do grão de 12-14% para 44-48%. Nessa condição ocorre a germinação e ativação das amilases que transformam o amido do cereal em unidades menores de açúcar. A hidrólise do amido é necessária para o desenvolvimento das leveduras relacionadas à fermentação alcoólica (MORADO, 2009). Por fim, a matéria-prima passa por secagem ou torrefação. Nesse processo, dependendo da intensidade, o malte pode assumir colorações e aromas que contribuem para formar a personalidade da cerveja (PALMER, 2006).

Para a produção da cerveja o malte deve ser moído. A finalidade da moagem é remover a casca para quebrar o interior do grão. A etapa seguinte chama-se brassagem, pode ser dividida em mosturação e fervura. A mosturação é a fase de preparo do mosto e consiste em misturar o malte moído com água quente (aproximadamente 65°C), a qual hidrata e também ativa as enzimas que convertem o amido dos grãos em açúcares fermentáveis. Posteriormente, malte moído e hidratado é filtrado para separação da fase sólida (bagaço) da fase líquida (mosto). O mosto é transferido para uma caldeira de fervura, onde permanece por cerca de 1h. Durante a fervura, o lúpulo é adicionado em diferentes quantidade e estágios da fervura, com a finalidade de conferir amargor e aroma à cerveja (PALMER, 2006).

Após a fervura, as leveduras são adicionadas ao mosto para conversão de açúcares do mosto em álcool e gás carbônico. A fermentação ocorre até que determinado grau alcoólico seja atingido, o que depende do tipo de cerveja. As fermentações “Ale” (de alta fermentação) duram de 5 a 10 dias a temperaturas de 16 a 21°C. As fermentações “Lager” (de baixa fermentação) geralmente são mais longas, com uma fermentação inicial de 10 a 13°C, seguida de um período de maturação a 1°C (MORADO, 2009).

Após a fermentação, é feita a maturação, onde substâncias indesejadas, oriundas da última etapa, são eliminadas, e o açúcar residual é consumido pelas células de fermento remanescentes. A cerveja pode ser maturada de seis a trinta

dias, e ao fim desse estágio, a cerveja está praticamente concluída (MORADO, 2009).

A filtração é utilizada para eliminar o excesso de leveduras, porém não é necessário realizar em todas as cervejas. Então, a cerveja é envasada em garrafas ou barris. As garrafas ainda podem passar por um processo de pasteurização, onde a cerveja é aquecida até 60°C e resfriada até chegar à temperatura ambiente, que garantem maior durabilidade ao produto (PALMER, 2006).

## 2.2 CEREAIS USADOS PARA A ELABORAÇÃO DE CERVEJA

Cereais e produtos à base de cereais são importantes fontes de alimentação para os humanos e também para os animais. As principais culturas de cereais produzidas mundialmente são de trigo, arroz, milho e cevada (USDA, 2016). Os principais cereais empregados na elaboração da cerveja são a cevada e o trigo, sendo que a cevada é o cereal mais frequentemente usado na produção dessa bebida. No Brasil, a produção de cevada alcançou 314 mil toneladas na última safra (Tabela 1), deste volume, 75% foram aproveitados na fabricação de malte e 95% do que foi destinado para a maltação, foi utilizado para a produção de cerveja (MAPA, 2012).

Tabela 1 – Produção de cevada no Brasil e no mundo desde 2013/14.

Safra	Escala	Brasil (em mil toneladas)	Mundo (em milhões de toneladas)
	2013/14	361,1 <sup>1</sup>	144,2
	2014/15	305,4 <sup>2</sup>	141,0
	2015/16	314,2 <sup>3</sup>	147,2

Fonte: USDA, 2016 e CONAB.

Nota: <sup>1</sup>Estimativa em Abril/2014, <sup>2</sup>Abril/2015 e Maio/2016.

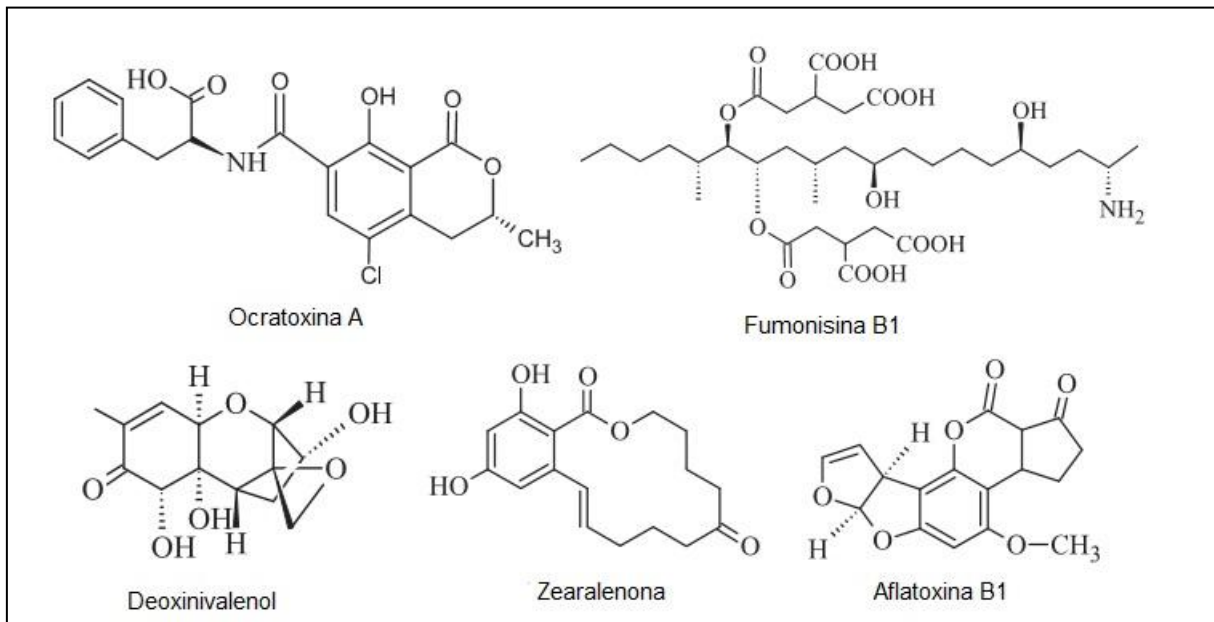
As culturas agrícolas, incluindo a cevada, são vulneráveis a infecções por um amplo espectro de patógenos, cujo controle é um desafio contínuo. O desenvolvimento de fungos na cevada pode resultar na produção de compostos que afetam negativamente o aroma e sabor da cerveja. Além disso, alguns fungos são produtores de compostos tóxicos chamados micotoxinas (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

### 2.3 MICOTOXINAS

As micotoxinas são compostos tóxicos produzidos pelo metabolismo de alguns fungos que afetam uma variedade de culturas, incluindo os cereais. Estes compostos podem ser produzidos tanto no campo quanto durante o transporte e armazenamento dos cereais (ANFOSSI *et al.*, 2016; SHAPIRA, 2004). O desenvolvimento de fungos depende de condições ambientais favoráveis, especialmente com temperaturas entre 20 e 30°C e umidade entre 75 e 95%. Para a produção das micotoxinas é necessário que ocorra oscilação de temperatura e/ou umidade ambiental (ANFOSSI *et al.*, 2016).

Dentre os fungos produtores de micotoxinas, os mais frequentes pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. As micotoxinas (Figura 1) produzidas por esses fungos são aflatoxinas (AFs), ocratoxinas (OTA), patulina (PAT), tricotecenos (desoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2), fumonisinas (FMs) e zearalenona (ZEA) (ANFOSSI *et al.*, 2016.)

Figura 1 – Estrutura molecular de micotoxinas comumente presentes em cereais



Fonte: TIWARI, *et al.*, 2010.

### 2.3.1 Ocorrência de Micotoxinas na Cerveja

A cevada é o cereal mais utilizado na produção de cerveja. Esse grão está frequentemente associado à contaminação por fungos e micotoxinas durante alguma etapa do seu cultivo, transporte e/ou armazenamento (PEREIRA, *et al.*, 2014; BERTUZZI, *et al.*, 2011; BAUER, *et al.*, 2016). Além das micotoxinas presentes na cevada, a etapa de maltação também é considerada um ponto crítico de controle relacionado ao desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas. Na maltação, o teor de umidade do cereal é aumentado, o que o deixa mais vulnerável ao desenvolvimento de fungos.

Vários estudos têm detectado a presença de micotoxinas, incluindo aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), OTA, ZEA, desoxinivalenol (DON), fumonisina B1 (FUB1) e B2 (FUB2), em cervejas comercialmente disponíveis em diversos países (Tabela 2). A porcentagem de amostras contaminadas com micotoxina pode chegar a 86% (HLYWKA, *et al.*, 1999).

Tabela 2 - Ocorrência de micotoxinas em cervejas produzidas em diferentes países.

<b>Micotoxinas detectadas</b>	<b>% de amostras contaminadas</b>	<b>Níveis encontrados (ng/mL)</b>	<b>País</b>	<b>Referência</b>
Ocratoxina A Desoxinivalenol	67,9 66	0,189 18,6	Diversos países da Europa	BERTUZZI, <i>et al.</i> , 2011
Desoxinivalenol Fumonisina B1	32 15	127-501 29-285	Brasil	PIACENTINI, <i>et al.</i> , 2015
Ocratoxina A	4,1	1-18	Brasil	KAWASHIMA, <i>et al.</i> , 2007
Fumonisina B1 Fumonisina B2	86 42	0,3-12,7 0,3-12,7	Estados Unidos	HLYWKA, <i>et al.</i> , 1999
Ocratoxina A	82,9	0,007-0,204	Diversos países da Europa	MEDINA, <i>et al.</i> , 2005

Aflatoxina B1	3,9	0,004	Diversos países do mundo	MABLY, <i>et al.</i> , 2005
Aflatoxina B1	4,3	0,015-0,031	Diversos países da Europa	BENEŠOVÁ, <i>et al.</i> , 2012
Aflatoxinas B2+G1+G2	1,7	0,005-0,011		
Zearalenona	4,3	0,264	Diversos países da Europa	ZÖLLNER, <i>et al.</i> , 2000

Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu limites para a presença de micotoxinas em vários tipos de alimentos, incluindo o grão de cevada e a cevada maltada. Desde 2011 esses limites têm se tornado cada vez mais rígidos, chegando aos limites que deverão entrar em vigor em 2017, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em grão de cevada e cevada maltada.

Ano	Micotoxina	Produto	LMT (µg/kg)
2011	Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	Cevada maltada	5
	Ocratoxina A	Cevada maltada	10
2012	Desoxinivalenol	Grão de cevada	2000
		Cevada maltada	1750
	Zearalenona	Cevada maltada	200
2014	Ocratoxina A	Grão de cevada	20
	Desoxinivalenol	Grão de cevada	1500
		Cevada maltada	1250
2017	Desoxinivalenol	Grão de cevada	1000
		Cevada maltada	750
	Zearalenona	Cevada maltada	100

Fonte: BRASIL, 2011

### 2.3.2 Efeitos tóxicos das micotoxinas encontradas na cerveja

As micotoxicoses são divididas em duas categorias: aguda e crônica. A toxicidade aguda geralmente tem um início rápido e com resposta tóxica que inclui dor abdominal, náusea, vômito e diarreia, enquanto a toxicidade crônica é caracterizada pela exposição em doses baixas por um longo período de tempo, resultando em redução da função renal, problemas hepáticos, câncer e outros efeitos irreversíveis (ZAIN, 2011).

Os efeitos crônicos são mais frequentemente associados à exposição às micotoxinas (Tabela 4). As AFs, por exemplo, são conhecidas por causarem danos ao fígado e rins, serem mutagênicas, carcinogênicas e imunossupressoras (AIKO *et al.*, 2015). Dentre as micotoxinas, a AFB1 é considerada a mais tóxica e é classificada como carcinogênica para humanos (grupo 1) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*IARC*, do inglês: *International Agency for Research on Cancer*) (*IARC*, 2002). A OTA e as FUB1 e FUB2 são classificadas no grupo 2B (possivelmente cancerígeno para humanos), a ZEA e o DON são classificadas no grupo 3 (não classificável quanto a sua carcinogenicidade em humanos).

Tabela 4 – Efeitos tóxicos das principais micotoxinas encontradas em cereais e seus respectivos fungos produtores.

Micotoxinas	Commodities	Efeitos tóxicos	Fungo produtor
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1, M2)	Amendoim, milho, trigo, arroz, cevada	Mutagênico, carcinogênico, hepatotóxico, nefrotóxico, imunossupressor	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nominus</i> , <i>A. Tamari</i>
Desoxinivalenol (Tricotecenos)	Milho, trigo, cevada, aveia	Vômito, diarreia, imunossupressor	<i>F. graminearum</i> , <i>F. Culmonarum</i>
Fumonissina	Milho, trigo, cevada	Tumores nos rins e fígado	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. Proliferatum</i>
Ocratoxina A	Cereais, amendoim, cevada	Nefrotóxico, hepatotóxico, teratogênico, carcinogênico	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. Viridicatum</i>
Toxina T-2	Milho, trigo, cevada, aveia	Emético, citotóxico, teratogênico	<i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. Roseum</i>

Zearalenona	Milho, cevada	Hiperestrogênico, aborto	<i>F. graminearum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. Culmorum</i>
-------------	---------------	--------------------------	---

Fonte: Adaptado de AIKO, 2015.

Casos de micotoxicoses em humanos são relatados na literatura. Em 1974, 100 pessoas morreram devido a ocorrência de hepatite relacionada ao consumo de milho contaminado. Em 1987, um surto de problemas gastrintestinais associado ao consumo de pão produzido com trigo contaminado foram relatados. Esses dois episódios ocorreram na Índia. Um dos maiores surtos relacionados à exposição às micotoxinas ocorreu no Quênia, em 2004, onde 125 pessoas vieram a óbito devido a insuficiência hepática causada por aflatoxicose aguda relacionada ao consumo de milho contaminado (KRISHNAMACHARI *et al.*, 1975; BHAT *et al.*, 1989; MUTURE *et al.*, 2005).

Parâmetros de ingestão segura são estabelecidos para vários contaminantes pelo Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês: *Food and Agriculture Organization of United Nations*) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês World Health Organization) (JECFA, do inglês: *Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives*). O conceito de ingestão segura baseia-se na quantidade de um composto que pode ser consumida durante toda a vida de um indivíduo sem causar danos para a sua saúde. O JECFA estabelece para a ocratoxina A um valor de ingestão diária tolerável de 14 ng/kg de peso corporal, para as FUB1, FUB2 e FUB3 o valor é de 2 mg/kg de peso corporal, para o DON a ingestão diária tolerável é de 1 mg/kg de peso corporal e para as toxinas T-2 e HT-2 a ingestão é de 60 ng/kg de peso corporal.

Portanto, considerando: (i) os efeitos tóxicos das micotoxinas, incluindo o potencial carcinogênico de algumas delas; (ii) a contaminação por micotoxinas, em muitos casos, inevitável mesmo quando boas práticas agrícolas, de transporte e armazenamento dos cereais são empregadas e (iii) a cerveja é uma bebida popular e seu consumo é atrativo devido as suas propriedades organolépticas e custo menor do que quando comparada a outros tipos de bebidas alcoólicas como o vinho, por exemplo, este projeto tecnológico é dedicado à pesquisa de métodos que visam à



redução de fungos e micotoxinas na cevada destinada à maltação ou durante a elaboração do malte empregado para a elaboração da cerveja.

### **3. OBJETIVOS**

- Pesquisar na literatura métodos para reduzir os níveis de micotoxinas na cevada destinada para a fabricação de cerveja.

- Verificar a viabilidade econômica para implementação da tecnologia para reduzir os níveis das micotoxinas na indústria cervejeira.

### **4. METODOLOGIA**

Os métodos descritos na literatura para reduzir os níveis de micotoxinas na cevada foram pesquisados nas bases de dados “Scopus” e “Web of Science” no período de janeiro até abril de 2016. Estudos publicados a partir de 2003 foram considerados. Diferentes combinações de palavras-chaves foram utilizadas na pesquisa, incluindo “beer, barley, malt, mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin, aflatoxin, irradiation, ozone, methods to reduce mycotoxins”. A partir de tecnologias sugeridas na literatura como eficientes na redução dos níveis destes compostos tóxicos, os custos para adequação do processamento da cerveja foram estimados para verificar a viabilidade de aplicação destas tecnologias.

## 5. PROPOSTA TECNOLÓGICA

### 5.1 MÉTODOS PARA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE MICOTOXINAS NA CEVADA

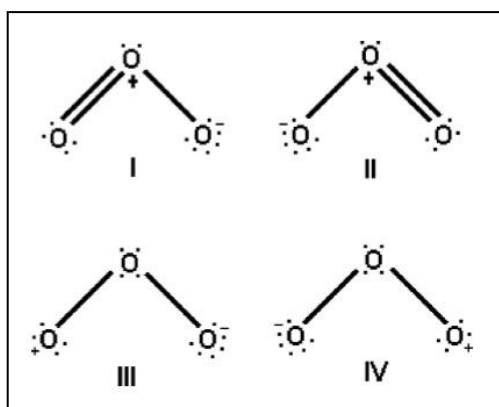
Os métodos sugeridos na literatura para reduzir os níveis de micotoxinas em cevada incluem o uso de ozonização, radiação e bactérias ácido lácticas (SPANOGHE, *et al.*, 2016; KOTTAPALLI, *et al.*, 2005; DODD, *et al.*, 2011; AZIZ, *et al.*, 2006; KOTTAPALLI, *et al.*, 2003; KOTTAPALLI, *et al.*, 2006; FRANCO, *et al.*, 2011; OLIVEIRA, *et al.*, 2015; GOMAH E ZOHRI, 2014). O princípio de cada um desses métodos e o potencial de aplicabilidade para o controle de micotoxinas na cevada foram considerados nessa pesquisa.

#### 5.1.1 Ozonização

O ozônio ( $O_3$ ) é uma forma alotrópica instável do oxigênio ( $O_2$ ), resultado de um rearranjo de átomos quando moléculas de oxigênio são submetidas a uma descarga elétrica de alta voltagem. O produto é um gás azulado de odor pungente e com fortes propriedades oxidantes (CHIATTONE, *et al.*, 2008; KHADRE, *et al.*, 2001).

Os três átomos de oxigênio que formam a molécula de ozônio estão dispostos em ângulo obtuso, onde o átomo de oxigênio central está ligado a dois átomos de oxigênio, a uma mesma distância. As quatro possibilidades de estruturas de ressonância da molécula de ozônio estão apresentadas na Figura 2 e as propriedades físicas do ozônio estão descritas na Tabela 5. (GUZEL-SEYDIM, *et al.*, 2004).

Figura 2 – Estruturas de ressonância da molécula de ozônio



Fonte: GUZEL-SEYDIM, *et al.*, 2004.

Tabela 5 – Propriedades físicas do ozônio puro.

Massa molecular	48 u.m.a.
Ponto de ebulição	-111,9±0,3°C
Ponto de fusão	-192,5±0,4°C
Temperatura crítica	-12,1°C
Pressão crítica	54,6 atm

Fonte: Adaptado de GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004.

Naturalmente, o ozônio é formado na estratosfera em pequenas quantidades (0,05 mg/L) pela ação da radiação ultravioleta do sol no oxigênio. Uma pequena quantidade de ozônio também é formada na troposfera, como um subproduto das reações fotoquímicas entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio lançados pelo escapamento dos automóveis, indústrias, florestas e pela ação vulcânica. No entanto, o gás produzido é muito instável e se decompõe rapidamente no ar (KIM, *et al.*, 1999).

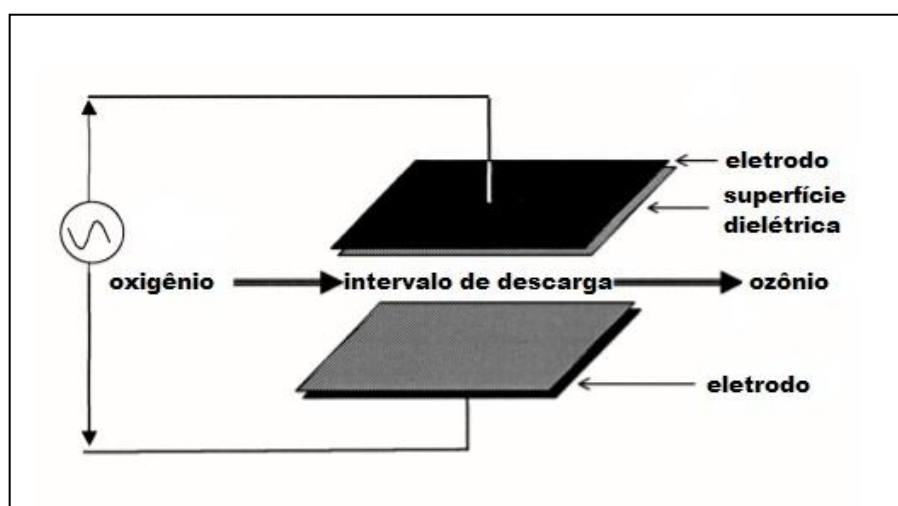
Na indústria, os principais métodos para sintetizar o ozônio baseiam-se na exposição do oxigênio à luz ultravioleta e também pela descarga eletroquímica (CHIATTONE, *et al.*, 2008; GUZEL-SEYDIM, *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 1999).

Inicialmente, uma molécula de oxigênio diatômica deve ser dissociada para gerar o ozônio. No entanto, uma grande quantidade de energia é requerida para romper a ligação O-O. Portanto, utilizam-se os métodos de radiação ultravioleta ou descarga eletroquímica para iniciar a formação do oxigênio livre. O oxigênio livre

resultante desta dissociação reage com outra molécula de oxigênio e, assim, origina a molécula triatômica de ozônio (TIWARI, *et al.*, 2010).

Na síntese de ozônio pelo método da radiação ultravioleta, que utiliza um comprimento de onda de 185 nm, ocorre uma fotodissociação da molécula de  $O_2$ . Os átomos formados reagem com outra molécula de oxigênio e dão origem ao ozônio. O método de descarga eletroquímica, conhecido como efeito corona, é o mais utilizado, devido a maior taxa de conversão do oxigênio em ozônio. Neste método, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (Figura 3). (ALMEIDA, *et al.*, 2004).

Figura 3 – Diagrama esquemático da geração de ozônio pelo método de descarga eletroquímica (efeito corona)



Fonte: Adaptado de KIM, *et al.*, 1999.

Durante o processo de ozonização, a oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos pode ocorrer através de uma reação direta (via ozônio molecular) ou indireta (via radical hidroxila) (KIM, *et al.*, 1999). Entretanto, na prática, pode haver uma contribuição simultânea destes dois mecanismos.

Na reação direta, ocorre o ataque eletrofílico do ozônio molecular aos compostos que contêm ligações do tipo  $C=C$ , a alguns grupos constituídos por funcionais específicos ( $OH$ ,  $CH$  e  $OCH_3$ ), e outros contendo átomos que apresentam densidade de carga negativa ( $N$ ,  $P$ ,  $O$  e  $S$ ) (CHIATTONE, *et al.*, 2008).

A reação indireta, por não ser seletiva, é capaz de promover um ataque aos compostos orgânicos  $10^6$  a  $10^9$  vezes mais rápido que outros agentes oxidantes. O radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) pode reagir através de três mecanismos: 1) abstração de hidrogênio, 2) transferência de elétrons e 3) adição de radicais. Processos de desinfecção ocorrem predominantemente via ozônio molecular, enquanto que processos de oxidação podem acontecer tanto por meio do ozônio molecular quanto via radical hidroxila (ALMEIDA, *et al.*, 2009).

O ozônio tem potencial antimicrobiano e atua inicialmente na membrana celular do microrganismo, sendo a superfície de sua célula o primeiro alvo a ser atingido. Sua ação antimicrobiana é decorrente da oxidação de glicolípídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando sua rápida lise. O ozônio ataca também grupos sulfidríla de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Além disso, sua ação sobre o material nuclear dos microrganismos altera as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos, como ocorre com alguns vírus, onde o ozônio destrói seu RNA além de alterar as cadeias polipeptídicas do capsídeo protéico (SILVA, *et al.*, 2011).

O ozônio tem sido amplamente utilizado no processamento de alimentos devido ao seu alto poder sanitizante e também pela sua rápida degradação, que não deixa resíduos nos alimentos tratados. Estas características permitem o consumo de alimentos ozonizados sem que haja riscos à saúde (AGRIOPOULOU, *et al.*, 2016; JERMANN, *et al.*, 2015; COELHO, *et al.*, 2015).

Em 1997, nos Estados Unidos, o Instituto de Pesquisa em Energia Elétrica, do inglês: *Electric Power Research Institute* (EPRI), reconheceu oficialmente o ozônio como agente sanitizante seguro para alimentos, podendo ser usado no tratamento, armazenamento e processamento de alimentos (EPRI, 1997). No Brasil, a utilização de ozônio ainda é limitada na indústria alimentícia e não há até o momento uma legislação para seu uso em alimentos.

Tendo por objetivo a conservação de alimentos, o ozônio pode ser aplicado diretamente nos locais de armazenamento. Como a maioria das perdas pós-colheita de grãos decorre da ação de bactérias, insetos, fungos e suas toxinas, a aplicação direta de gás ozônio em depósitos assegura maior tempo de armazenamento e vida útil dos grãos (SILVA, *et al.*, 2011; COELHO, *et al.*, 2015).

### Aplicação do ozônio para reduzir fungos e micotoxinas na cevada

Spanoghe *et al.* (2016) trataram grãos de cevada com 7; 7,6 e 9,8 ppm de ozônio diluído em água para o controle de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*. O tempo de tratamento foi de 3 segundos para 20 kg de cevada. Os melhores resultados foram obtidos quando a concentração de 9,8 ppm de ozônio foi aplicada. Nessa condição os autores observaram redução de 80% e 70% de fungos dos gêneros *Fusarium* sp. (produtores de DON) e *Aspergillus* sp. (produtores de AFs).

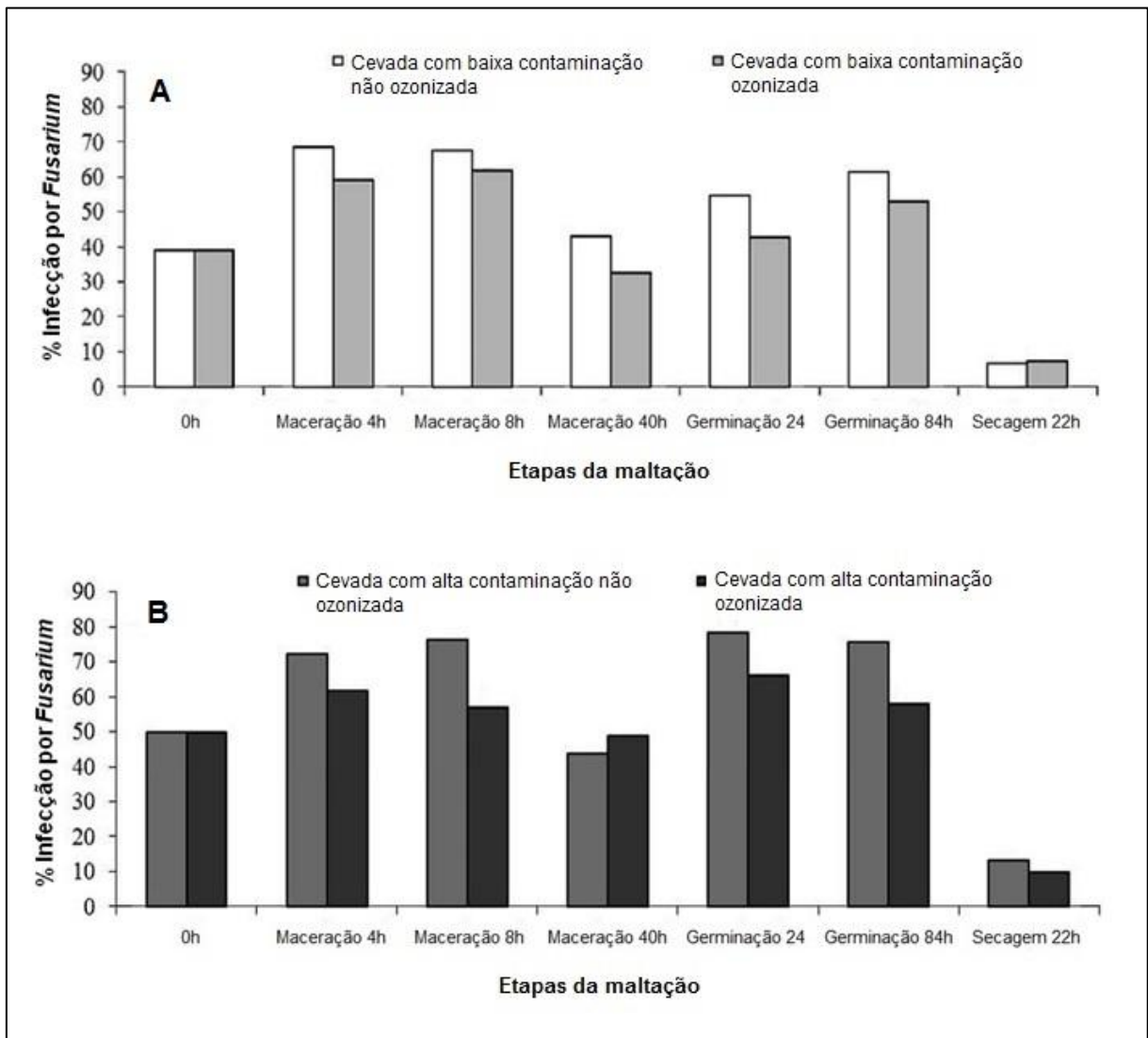
Kottapalli *et al.* (2005) avaliaram o efeito do tratamento com gás ozônio na redução de fungos do gênero *Fusarium* em cevada destinada à elaboração de malte. A cevada foi tratada com 11 e 26 mg de ozônio/g de cevada, por períodos de tempo de 15, 30 e 60 minutos. A maior redução de *Fusarium* (70%) foi observada quando a cevada foi tratada durante 30 minutos com 26 mg/g de ozônio. Entretanto, nessas condições os autores observaram que ocorria redução na capacidade germinativa da cevada, o que prejudica a qualidade do malte produzido. O tratamento mais adequado constitui-se na aplicação de 26 mg/g de ozônio durante 15 minutos. O emprego dessa combinação de tempo de aplicação e concentração de ozônio resultou na redução da concentração de *Fusarium* em 42% e não afetou a capacidade germinativa da amostra.

O estudo a seguir foi detalhado pois mostra a concentração de fungos e micotoxinas na cevada em diversos pontos do processo de maltação. Dodd *et al.* (2011) avaliaram o efeito da aplicação de ozônio durante a maltação de cevada naturalmente contaminada com alta (1,4 µg/g) e baixa (0,25 µg/g) concentração de DON. Quatro tratamentos foram estudados: 1) cevada com baixa contaminação e não ozonizada; 2) cevada com baixa contaminação e ozonizada; 3) cevada com alta contaminação e não ozonizada; e 4) cevada com alta contaminação e ozonizada. O ozônio foi aplicado através de um borrifador de gás submerso, sendo que o tratamento foi feito em escala laboratorial. A ozonização (26 mg/mL de ozônio por 120 minutos) foi aplicada em dois momentos da maltação: após 2 horas de maceração e após 6 horas de maceração da cevada. Posteriormente ocorreu a germinação da cevada durante 84h a 16°C e 95% de umidade relativa. O malte produzido foi seco pelo aumento gradual de temperatura (até 85°C) por um período de 22h, seguido da moagem.

Amostras foram coletadas nos seguintes pontos do processo de maltação: (i) antes da maceração (0h), (ii) depois de cada tratamento com ozônio (4 e 8h), (iii) após o tempo total de maceração (40h), (iv) após 24h de germinação, (v) após o tempo total de germinação e (vi) após secagem.

O resultado da infecção por *Fusarium* nas amostras de cevada com baixa contaminação e com alta contaminação em cada etapa do processo de maltação está resumido na Figura 4. As figuras foram traduzidas a partir do artigo de Dodd *et al.* (2011).

Figura 4 – Efeito da ozonização na infecção por *Fusarium* na cevada com (A) baixa contaminação (0,25 µg/g) e (B) alta contaminação (1,4 µg/g) em cada estágio da maltação.



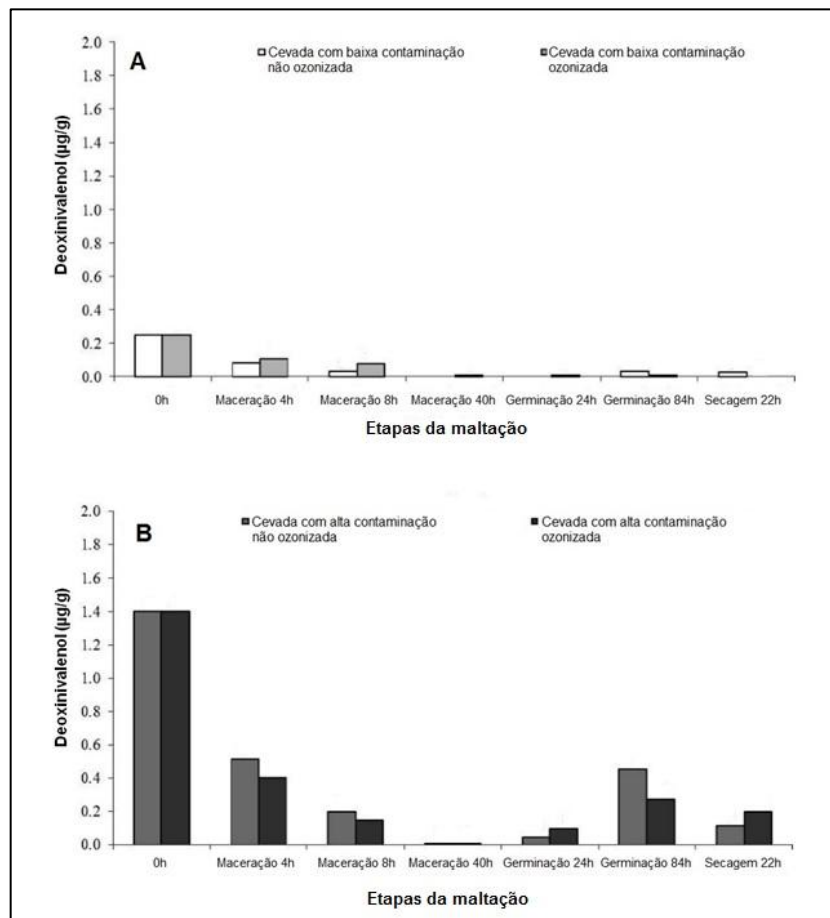
Fonte: DODD *et al.*, 2011.

Um aumento na atividade de água da cevada foi observado durante a etapa de maceração, o que facilita a germinação de esporos do fungo. Esta explicação foi dada pelos autores para justificar o aumento da infecção por *Fusarium* durante a germinação em relação ao final da maceração (40h) tanto para a cevada com alta quanto baixa concentração de DON.

Após a secagem houve redução expressiva da infecção por *Fusarium* na cevada com alta e baixa concentração de DON. Cabe salientar que, em várias etapas da maltação, a infecção fúngica foi menor quando o ozônio foi aplicado em relação às amostras que não foram ozonizadas.

Os efeitos do tratamento com gás ozônio na concentração de DON nos grãos de cevada com baixa contaminação e na cevada com alta contaminação em cada etapa do processo de maltação são mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Efeitos da ozonização na concentração de desoxinivalenol na cevada com (A) baixa contaminação (0,25 µg/g) e (B) alta contaminação (1,4 µg/g) em cada estágio da maltação



Fonte: DODD *et al.*, 2011.

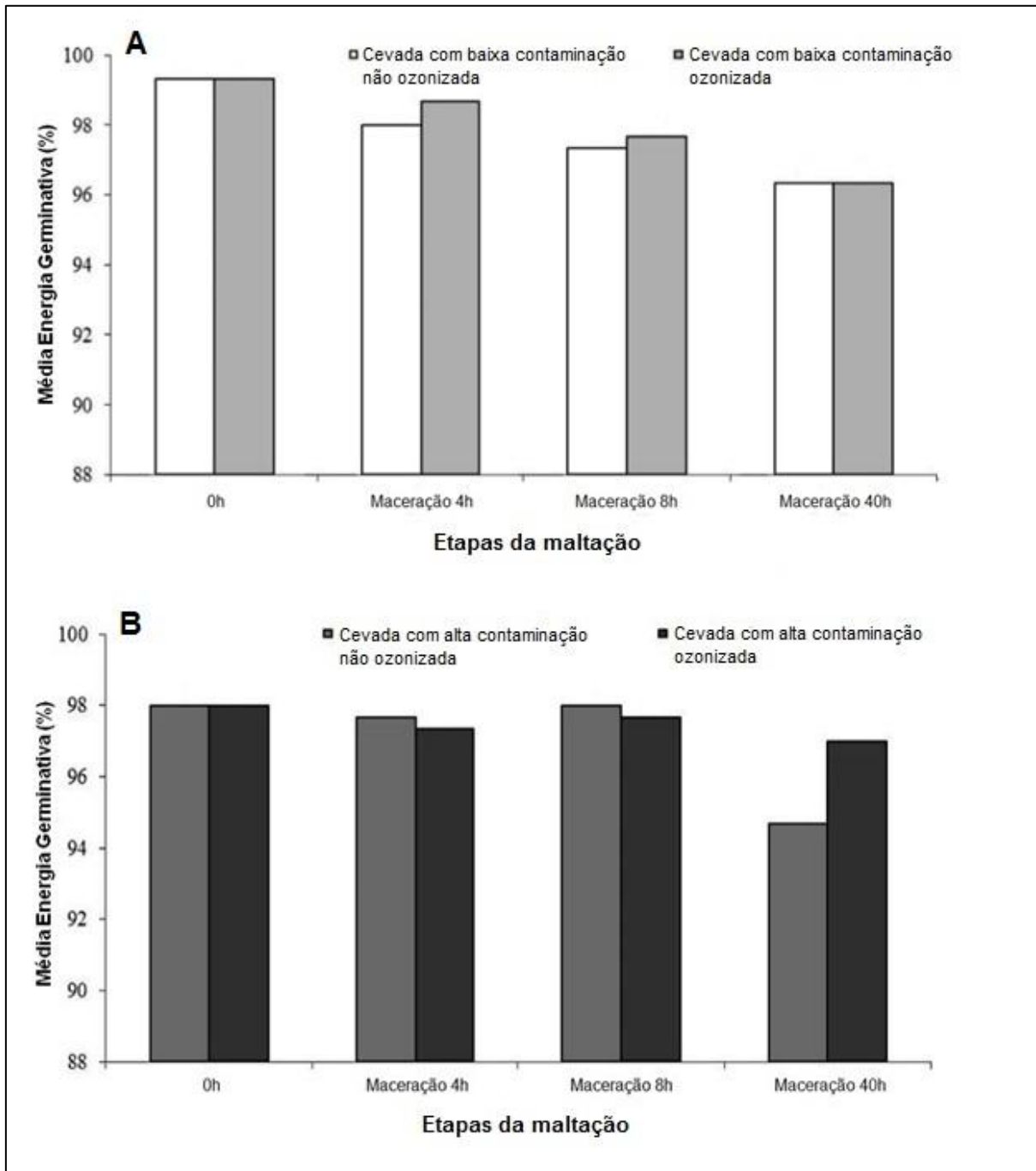


Se considerarmos a legislação brasileira, a concentração inicial de DON na cevada com alta contaminação (1,4 µg/g) seria suficiente para esta ser recusada para maltação e fabricação de cerveja (o limite máximo tolerado pela legislação brasileira a partir de janeiro de 2017 será de 1,0 µg/g).

Na cevada com baixa concentração de DON (0,25 µg/g), o tratamento com ozônio eliminou a micotoxina após todo o processo de maltação. Para a cevada com alta contaminação (1,4 µg/g de DON), houve uma redução drástica na concentração de DON no final da maceração devido à adição de água na cevada e remoção com os ciclos de troca da água. Durante a germinação, observou-se o aumento na concentração de DON devido o crescimento de fungos durante a germinação. Porém, a concentração de DON no final do processo de maltação da cevada que recebeu tratamento com ozônio foi de 0,2 µg/g, ou seja, abaixo do limite máximo tolerado pela legislação a partir de janeiro de 2017 (1 µg/g). Um resultado que merece destaque é que a aplicação de ozônio na cevada com alta concentração de DON resultou em malte com maior nível de DON do que a cevada não ozonizada (Figura 5).

A Figura 6 ilustra a capacidade germinativa da cevada, isto é, a porcentagem de grãos que germinaram, e que deve ser de no mínimo 95% para produzir malte/cerveja com qualidade satisfatória.

Figura 6 – Efeito da ozonização na energia germinativa na cevada com (A) baixa contaminação (0,25 µg/g) e (B) alta contaminação (1,4 µg/g) em cada estágio da maltação.



Fonte: DODD *et al.*, 2011.

A energia germinativa foi adequada (>95%) para produção de malte com qualidade satisfatória para ambos tratamentos (baixa e alta concentração de DON;

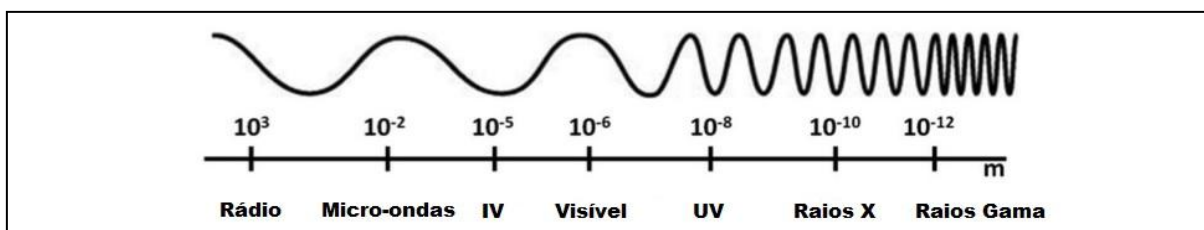
com e sem aplicação de ozônio). Cabe salientar que o tratamento com ozônio não resultou em diferenças expressivas em relação à cevada não ozonizada. Portanto, este estudo sugere que a energia germinativa não é uma questão de preocupação associada ao tratamento de cevada para maltação com ozônio. Além disso, na cevada com alta concentração de DON, observou-se maior capacidade de germinação ao final da maceração na cevada ozonizada do que na cevada que não recebeu ozônio.

A partir dos dados obtidos no estudo proposto por Dodd et al. (2011), pode-se afirmar que o uso do ozônio não prejudica a capacidade germinativa da cevada. Entretanto, pouca diferença entre a porcentagem de infecção fúngica e nível de DON foi observada entre as amostras tratadas ou não com ozônio. Dessa maneira, cabe avaliar se o investimento necessário para implementar e aplicar esta tecnologia é viável.

### 5.1.2 Radiação

A radiação é a energia que se origina a partir de uma fonte e viaja através da maioria dos materiais e através do espaço. Luz, calor e som são alguns tipos de radiação (CALADO, *et al.*, 2014). A radiação eletromagnética é comumente classificada de acordo com a frequência de onda: ondas de rádio, micro-ondas, infravermelho, luz visível, radiação ultravioleta, raios X e raios gama (Figura 7).

Figura 7 – Espectro Eletromagnético



Fonte: CALADO, *et al.*, 2014.

O espectro eletromagnético também é dividido em dois tipos de radiação: radiação não-ionizante e radiação ionizante. A radiação ionizante é aquela com capacidade de tirar um elétron de um átomo, enquanto que a radiação não ionizante não tem energia suficiente para arrancar um elétron de um átomo. As partículas

carregadas eletricamente, como os elétrons, são consideradas radiação ionizante, e quando possuem energia suficiente, ionizam os átomos que encontram em seu caminho em um determinado meio até perder toda energia. Somente os raios X e os raios gama são radiação eletromagnética ionizante (OKUNO, 2013).

A irradiação de alimentos é um processo onde o alimento é exposto à energia ionizante, tais como fótons gama emitidos por radioisótopos de  $^{60}\text{Co}$  (ou menos frequentemente de  $^{137}\text{Cs}$ ), raios X gerados por máquinas operadas abaixo de uma energia de 5 MeV e elétrons acelerados gerados por máquinas operadas abaixo de uma energia de 10 MeV (FARKAS, *et al.*, 2011). Somente estas fontes podem ser utilizadas na irradiação de alimentos, pois a energia emitida por elas é muito baixa para induzir radioatividade em qualquer material exposto (CALADO, *et al.*, 2014).

A unidade de dose absorvida de radiação é o gray (Gy), que corresponde à energia média da radiação ionizante depositada por unidade de massa da matéria (OKUNO, 2013). Dependendo da dose de radiação absorvida, pode-se observar redução do desenvolvimento de microrganismos durante o armazenamento, o que resulta em extensão do prazo de validade dos alimentos (FARKAS, 2006).

Em virtude da singularidade deste processo, a FAO, a Agência Internacional de Energia Atômica, (IAEA, do inglês: *International Atomic Energy Agency*) e a WHO criaram o Comitê Conjunto FAO/IAEA/WHO de Especialistas sobre a Salubridade de Alimentos Irradiados (JECFI, *Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food*), dedicado à investigação da integridade de alimentos irradiados (FARKAS *et al.*, 2011).

Através de estudos, em 1980, a JECFI concluiu que a irradiação de qualquer alimento até uma dose de até 10 kGy não apresenta risco toxicológico para os humanos (WHO, 1981). No Brasil, a resolução nº 21 da ANVISA (Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001) regulamenta o emprego de radiação nos alimentos, cuja dose mínima deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida, e a dose máxima deve ser inferior à dose que comprometeria as propriedades funcionais e/ou características sensoriais do alimento (BRASIL, 2001).

Células vivas são inativadas quando expostas a fatores que mudam substancialmente sua estrutura celular ou funções fisiológicas, como por exemplo, com o uso da radiação. Danos letais à estrutura incluem ruptura da fita de DNA, ruptura da membrana celular ou danos mecânicos às paredes celulares (LADO *et*

*al.*, 2002). Por este motivo, os microrganismos, insetos e plantas não se reproduzem.

A ação antimicrobiana da radiação ionizante se dá através de alteração da composição molecular das células, modificando seu DNA. O mecanismo de ação pode ocorrer de duas formas:

- mecanismo direto: a radiação interage diretamente com as moléculas importantes como as de DNA, podendo causar desde mutação genética até morte celular;
- mecanismo indireto: a radiação quebra a molécula da água, formando assim radicais livres que podem atacar outras moléculas importantes. (FARKAS, 2006; OKUNO, 2013).

Desta forma, quando o DNA é danificado, lesões potencialmente letais ficam espalhadas ao longo das células durante a ionização. Assim, se a célula não for capaz de reparar os danos causados pela radiação, ela morre.

#### Aplicação da radiação para reduzir fungos e micotoxinas na cevada

Aziz *et al.* (2006) estudaram o efeito da radiação gama no desenvolvimento fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como nos níveis de AFB1 e OTA, aplicando doses de radiação de 2, 4 e 6 kGy nos grãos de cevada. Os autores observaram que o tratamento com 6 kGy inibiu completamente o crescimento dos fungos e conseqüentemente a produção de toxinas. Na cevada tratada com dose intermediária de radiação (4 kGy), não foi detectada a presença de OTA e do fungo produtor dessa micotoxina (*Penicillium*), porém a AFB1, resultado do desenvolvimento de *Aspergillus*, foi detectada na concentração de 20 µg/kg, acima do que é tolerado pela legislação brasileira (5 µg/kg). A aplicação de 2kGy de radiação não provocou a redução do crescimento de fungos, bem como dos níveis de micotoxinas.

Kottapalli *et al.* (2003) avaliaram o efeito na irradiação por feixe de elétrons na redução de infecção por *Fusarium* na cevada destinada para maltação. Foram utilizadas doses de radiação de 0 a 11,4 kGy. A redução de aproximadamente 100% no desenvolvimento de *Fusarium* foi observada quando doses entre 6,9 e 8,6 kGy foram usadas. A dose máxima de radiação de 10 kGy é permitida em alimentos de acordo com a legislação brasileira.

Os resultados do estudo de Kottapalli *et al.* (2006) foram detalhados abaixo, pois avaliam o uso da irradiação por feixe de elétrons tanto para prevenir o crescimento de *Fusarium* como reduzir os níveis de DON, mantendo as características da cevada para maltação. As figuras apresentadas foram traduzidas do artigo de Kottapalli *et al.* (2006).

Quatro lotes de cevada foram utilizados neste estudo. A Tabela 6 mostra a concentração de DON e a ocorrência de *Fusarium* em cada lote.

Tabela 6 – Características dos lotes de cevada avaliadas no estudo de Kottapalli *et al.* (2006).

Lote	DON ( $\mu\text{g/g}$ )	Infecção por <i>Fusarium</i> (%)
1	1,17	100
2	0,67	99
3	1,13	98
4	1,12	98

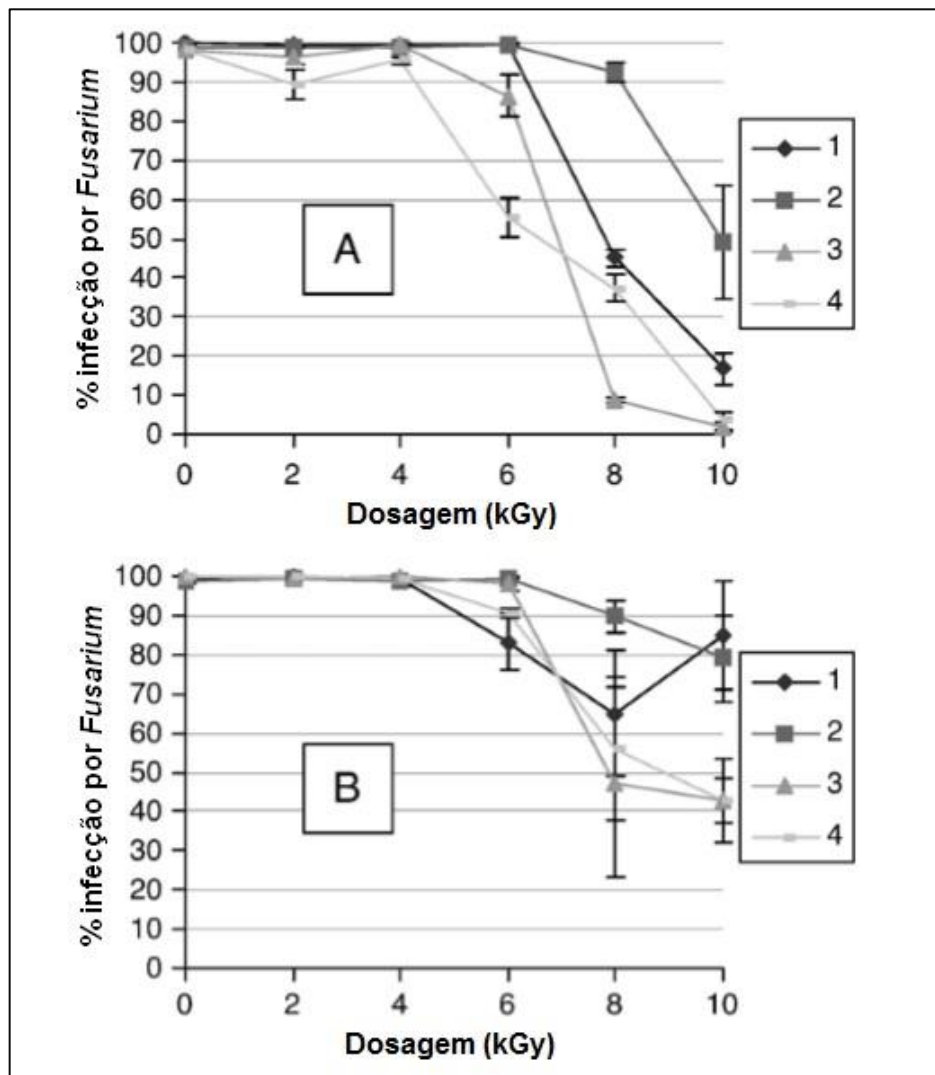
Fonte: KOTTAPALLI *et al.*, 2006.

As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis e submetidas a doses de radiação de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 kGy. Após a irradiação, as amostras foram analisadas em relação à porcentagem de infecção por *Fusarium*, energia germinativa (EG) e níveis de DON.

Parte das amostras de cevada tratadas com irradiação foram maltadas em escala piloto. Para maltação, a cevada foi macerada (45% de umidade, à 16°C por 34h). Posteriormente, a água foi drenada e o grão foi deixado para germinar por 4 dias a 15°C. A umidade foi mantida entre 85 e 90%. Após a germinação, as amostras foram secas pelo aumento da temperatura de 49 para 85°C por um período de 24h.

A Figura 8 resume o efeito da radiação por feixe de elétrons na porcentagem de infecção fúngica nas amostras de cevada e de malte. Para todas as amostras de cevada (Figura 8A), uma redução expressiva (21-62%) ocorreu entre 6 e 8 kGy, e a maior redução no desenvolvimento de *Fusarium* (50-98%) foi alcançada a 10 kGy. Resultados semelhantes foram observados em relação ao malte (Figura 8B). No malte, redução pronunciada (21-53%) na infecção fúngica ocorreu a partir de 6 kGy e a maior redução (21-58%) foi alcançada com a aplicação de 10 kGy.

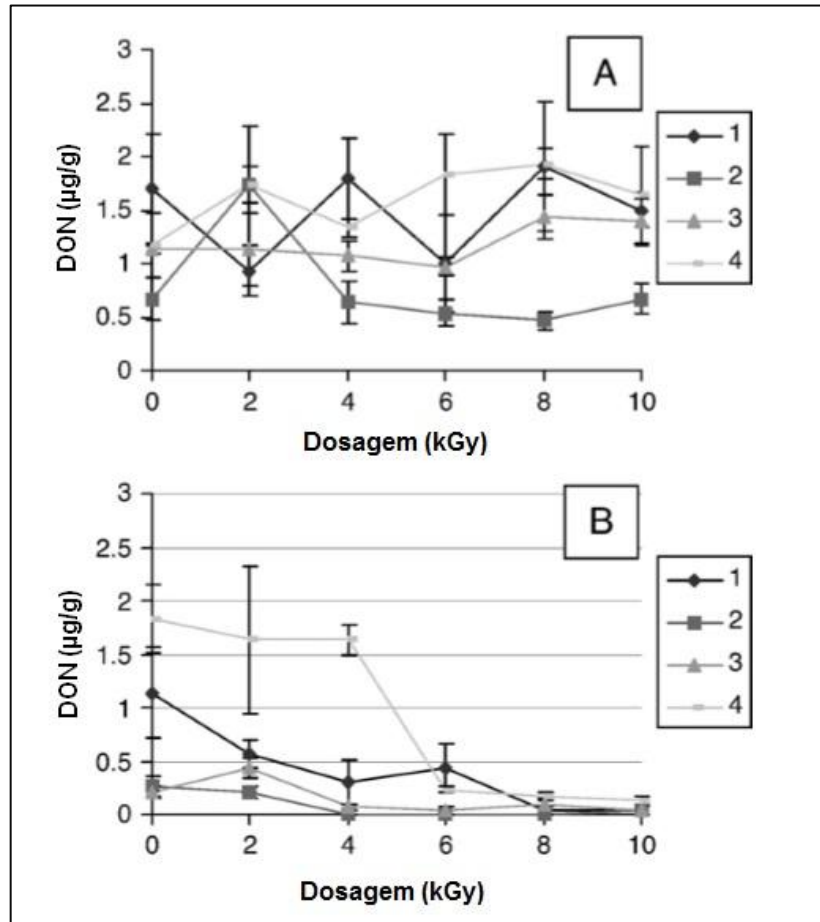
Figura 8 – Efeito da radiação por feixe de elétrons na infecção por *Fusarium* nas amostras de (A) cevada e (B) malte preparado a partir da cevada irradiada.



Fonte: KOTTAPALLI *et al.*, 2006. Os números da legenda representam os quatro lotes de cevada.

O efeito da radiação por feixe de elétrons nos níveis de DON encontrados na cevada e no malte foi ilustrado na Figura 9. Na cevada (Figura 9A), o aumento da dose de radiação causa efeito pouco expressivo na redução dos níveis de DON. Além disso, observou-se que as amostras de cevada não apresentaram o mesmo comportamento com o aumento da dose de radiação. Em relação ao malte (Figura 9B), o uso de doses entre 4 e 8 kGy podem ser suficientes para reduzir os níveis de DON próximos a zero.

Figura 9 – Efeito da radiação por feixe de elétrons na concentração de desoxinivalenol (DON) nos lotes de (A) cevada e (B) do respectivo malte produzido a partir da cevada irradiada.

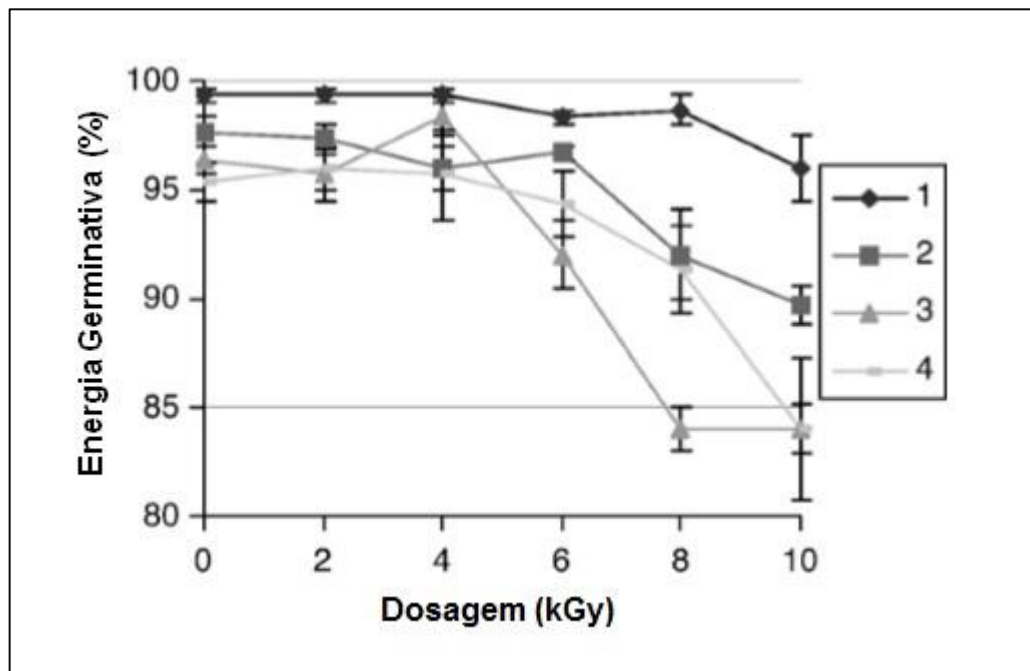


Fonte: KOTTAPALLI *et al.*, 2006. Os números da legenda representam os quatro lotes de cevada.

A Figura 10 mostra o efeito da radiação por feixe de elétrons na EG das amostras de cevada. O uso de radiação até 4 kGy não prejudicou a capacidade germinativa da cevada, pois a energia germinativa manteve-se acima de 95%.



Figura 10 - Efeito da radiação por feixe de elétrons na energia germinativa nos lotes de cevada.



Fonte: KOTTAPALLI *et al.*, 2006. Os números da legenda representam os quatro lotes de cevada.

Ao analisar os resultados obtidos por Kottapalli *et al.* (2006) verificou-se que não foi possível chegar a uma dose de radiação que diminua eficientemente a infecção por *Fusarium*, reduza os níveis de DON e não prejudique a capacidade germinativa da cevada. A dose de 4 kGy, por exemplo, foi eficiente na redução da concentração de DON e não alterou a energia germinativa da cevada, entretanto, não têm efeito na redução da infecção fúngica. Da mesma forma, Aziz *et al.* (2006) mostraram que com uma dose de 4 kGy foi possível inibir fungos do gênero *Penicillium*, bem como a produção de OTA, porém não inibiu AFB1.

### 5.1.3 Bactérias Ácido Láticas

Os microrganismos responsáveis pela fermentação de alimentos podem combater os contaminantes que causam deterioração, e sua popularidade está crescendo devido a sua habilidade em aumentar tanto a qualidade do produto como seu perfil nutricional (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são conhecidas por atribuir propriedades tecnológicas desejáveis e bioproteção em inúmeras matrizes alimentares, ao mesmo tempo em que melhoram as qualidades organolépticas e textura do produto final. Estas bactérias são microrganismos gram-positivos, ácido tolerantes, não são móveis, não formam esporos e podem ter a forma de cocos ou bastonetes. BAL fermentam carboidratos e incluem os seguintes microrganismos homofermentadores: *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, e alguns *Lactobacillus* spp. que produzem ácido láctico como produto majoritário, bem como heterofermentadores, tais como: *Weissella*, *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus* que produzem quantidades equimolares de ácido láctico, CO<sub>2</sub> e etanol (GIRAFFA, *et al.*, 2010).

A utilização de BAL durante a maltação e a fabricação de cerveja representa um obstáculo ao crescimento de microrganismos que causam deterioração. Devido a sua capacidade antifúngica, as bactérias ácido lácticas podem ser utilizadas nos estágios iniciais do processo de maltação, na produção de mosto e para fins de bioacidificação (WOLF-HALL, 2007).

Além de inibir o crescimento fúngico, as BAL podem ser úteis na desintoxicação de grãos infectados por micotoxinas. Franco *et al.* (2011) verificaram que o uso de BAL resultou na redução dos níveis DON entre 16 e 41% usando *Lactobacillus plantarum* FB VII e entre 19 e 71% ao empregar *Lactobacillus plantarum* BG112. Oliveira *et al.* (2015) avaliaram a atividade antifúngica das bactérias *Lactobacillus amylovorus* e *Lactobacillus reuteri* nos grãos de cevada infectados por *Fusarium culmorum*. Os resultados mostraram que *L. reuteri* inibiu o crescimento de *Fusarium* em 23% e a produção de DON em 83%.

O mecanismo de desintoxicação se dá por meio da absorção das micotoxinas pela parede celular das BAL, sendo que os peptidoglicanos e polissacarídeos presentes na parede celular dessas bactérias, após aquecimento ou acidificação, apresentam aumento do tamanho dos seus poros, aprimorando a capacidade de acumular as toxinas (DALIÉ, *et al.*, 2010; FRANCO, *et al.*, 2011).

A utilização de BAL resulta na redução do pH na etapa de mosturação da cerveja, o que auxilia na ativação de enzimas que atuam na hidrólise do amido transformando-o em carboidratos fermentáveis. Além disso, o emprego de BAL durante a elaboração do malte pode reduzir a propensão de crescimento

microbiológico, incluindo fungos micotoxigênicos e irá melhorar as características sensoriais da cerveja (VRIESEKOOOP, *et al.*, 2013).

No Brasil, há regulamentação para o uso de bactérias ácido lácticas como cultura probiótica, para novos alimentos e novos ingredientes (Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999), bem como para aditivos alimentares (RDC nº 45, de 03 de novembro de 2010). Cabe salientar que é de responsabilidade da empresa o pedido para aprovação do uso do aditivo alimentar ou novo alimento/ingrediente.

O estudo de Gomah e Zohri (2014) foi detalhado, pois avalia a utilização das BAL tanto na inibição do crescimento de fungos quanto na produção de micotoxinas.

Gomah e Zohri (2014) avaliaram duas espécies de Lactobacilli (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) para testar sua habilidade em inibir o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas de três espécies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. proliferatum*), que são os principais produtores das micotoxinas DON, ZEA e FUB1, respectivamente. *L. rhamnosus* foi a bactéria que se mostrou mais promissora para inibir o desenvolvimento das três espécies de *Fusarium*, bem como para inibir a produção das três micotoxinas (Tabela 7, 8 e 9).

Tabela 7 – Efeito dos *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* no crescimento de *F. graminearum* e na produção de desoxinivalenol (DON)

Cepa bacteriana	Período de incubação (dias)	Crescimento de micélio (visual)	Concentração de DON (ppm)	Redução de DON (%)
Controle	10	+++	69,2	-
	20	+++	481,6	-
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	10	++	37,9	45,2
	20	++	208,1	56,8
<i>L. rhamnosus</i>	10	-	ND	100
	20	-	ND	100

Legenda: (-) sem crescimento de fungo, (+) crescimento fraco, (++) crescimento moderado, (+++) crescimento forte, (ND) não detectado

Fonte: GOMAH E ZOHRI, 2014.

Tabela 8 – Efeito dos *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* no crescimento de *F. culmorum* e na produção de zearalenona (ZEA).

Cepa bacteriana	Período de incubação (dias)	Crescimento de micélio (visual)	Concentração de ZEA (ppm)	Redução de ZEA (%)
Controle	10	+++	3300	-
	20	+++	4900	-
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	10	++	1405	57,4
	20	++	1322	73
<i>L. rhamnosus</i>	10	-	ND	100
	20	-	ND	100

Legenda: (-) sem crescimento de fungo, (+) crescimento fraco, (++) crescimento moderado, (+++) crescimento forte, (ND) não detectado

Fonte: GOMAH E ZOHRI, 2014.

Tabela 9 – Efeito dos *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* no crescimento de *F. proliferatum* e na produção de fumonisina B1 (FUB1)

Cepa bacteriana	Período de incubação (dias)	Crescimento de micélio (visual)	Concentração de FUB1 (ppm)	Redução de FUB1 (%)
Controle	10	++	200	-
	20	+++	300	-
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	10	++	77	61,5
	20	+++	70,5	76,5
<i>L. rhamnosus</i>	10	-	ND	100
	20	-	ND	100

Legenda: (-) sem crescimento de fungo, (+) crescimento fraco, (++) crescimento moderado, (+++) crescimento forte, (ND) não detectado

Fonte: GOMAH E ZOHRI, 2014.

Os tratamentos controle em todos os experimentos mostram que todos os fungos estudados cresceram amplamente e produziram altos níveis de micotoxinas

quando cultivados na ausência de bactérias (Tabela 7, 8 e 9). Os resultados obtidos com o emprego de *L. paracasiae* subsp. *Paracasiae* foram menos promissores do que aqueles obtidos com o uso de *L. Rhamnosus*. *L. paracasiae* resultou em redução da concentração de DON, ZEA e AFB1 em 45, 57 e 61%, respectivamente. O efeito do emprego de BAL na capacidade germinativa da cevada não foi avaliada nesse estudo.

## 5.2 ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA IMPLANTAÇÃO DE TECNOLOGIA PARA REDUZIR NÍVEIS DE MICOTOXINAS NA CEVADA

Segundo orçamento solicitado à empresa, Guangzhou Netech Environmental Technology Co., Ltd, em maio de 2016, considerando um silo de medidas 2,00 x 1,80m, um gerador de ozônio portátil, com uma faixa ajustável de concentração de ozônio de 20% a 100%, custa US\$ 300, sem considerar as despesas com energia elétrica.

Já o custo para construir uma planta comercial para irradiação de alimentos está na faixa de US\$ 3 milhões a US\$ 5 milhões, dependendo do tamanho, capacidade do processo, e outros fatores, segundo a FIPA (*Food Irradiation Processing Alliance*). A aplicação de doses baixas varia entre US\$ 10 e US\$ 80 por tonelada; aplicações de doses mais altas podem custar US\$ 200 por tonelada.

O custo para aquisição das cepas de BAL estão entre US\$ 295 e US\$ 394. Após a aquisição destas, a indústria pode fazer repiques e multiplicar a quantidade dessas bactérias de acordo com a necessidade de utilização nos lotes de cevada. Para isso, é necessário implementar um laboratório de microbiologia, contendo pelo menos uma estufa, capela de fluxo laminar, autoclave, geladeira, além de bico de bunsen, alça de platina, placas de petri, meios de cultura, cujo custo de implementação é de aproximadamente US\$ 10 mil.

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A APLICAÇÃO DA OZONIZAÇÃO, RADIAÇÃO E BAL PARA REDUZIR FUNGOS E MICOTOXINAS NA CEVADA

Três diferentes métodos utilizados para a redução de micotoxinas na cevada destinada à fabricação de cerveja foram sugeridos. O método de ozonização apresentou uma redução de 85,7% na concentração de DON ao final do processo de maltação, a uma concentração de ozônio de 26 mg/mL; o método de radiação mostrou reduções de 93 a 100% na concentração de DON, a uma dose de radiação de 10 kGy. O método utilizando bactérias ácido lácticas apresentou reduções de 57, 73 e 76% na concentração de DON, ZEA e FUB1, respectivamente, quando os *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* foram utilizados. No entanto, quando os *Lactobacillus rhamnosus* foram usados, a redução de todas as micotoxinas foi de 100%.

Tabela 10 – Resumo dos métodos estudados em relação à redução dos níveis de micotoxinas.

Método	Redução (%)
Ozonização	85,7
Radiação	93-100
Bactérias ácido lácticas	45,2-76,5 ( <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ) 100 ( <i>L. rhamnosus</i> )

Fonte: DODD, et al., 2011; KOTTAPALLI, et al., 2006; GOMAH E ZOHRI, 2014.

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, dados publicados na literatura sobre os métodos de ozonização, radiação e utilização de bactérias ácido lácticas foram comparados quanto a sua eficiência em reduzir o desenvolvimento de fungos toxigênicos, bem como os níveis de micotoxinas na cevada destinada para a fabricação de cerveja.

Os três métodos estudados reduziram os níveis de micotoxinas das amostras de cevada e malte, mantendo a concentração final desses compostos tóxicos abaixo dos limites máximos tolerados pela legislação brasileira. Além disso, a otimização das doses de ozônio ou radiação é importante para que o emprego dessas tecnologias não afete a capacidade fermentativa da cevada.

Apesar do custo de implementação da ozonização ser mais baixo do que dos demais métodos, cabe salientar que o gerador de ozônio orçado aplica-se a um silo pequeno (2,00 x 1,80m), o que não reflete a realidade das maltarias. O uso de BAL parece ser promissor no que diz respeito à redução no desenvolvimento de fungos e nos níveis de micotoxinas. Entretanto, a utilização desses microrganismos deve ser pesquisada em relação à sua influência na capacidade germinativa da cevada.

Cabe salientar que apesar de alguns estudos se dedicaram a avaliação de métodos para reduzir o crescimento de *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como dos níveis de AFB1, ZEA e OTA, os estudos publicados na literatura até o momento têm focado especialmente na redução do desenvolvimento de *Fusarium* e dos níveis de DON. Poucos estudos têm avaliado mais de um fungo ou micotoxina. Estudos abrangentes são primordiais, pois a legislação brasileira estabelece limites máximos permitidos para quatro micotoxinas em cevada maltada e um mesmo fungo pode produzir mais de um tipo de micotoxina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOPOULOU, S.; KOLIADIMA, A.; KARAIISKAKIS, G., KAPOLOS, J. Kinetic study of aflatoxins' degradation in the presence of ozone. **Food Control**, v. 61, p. 221-226, 2016.

AIKO, V.; MEHTA, A. Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. **Journal of Biosciences**, v. 40, n. 5, p. 943-954, 2015.

ALLEN, B.; WU, J.; DOAN, H. Inactivation of Fungi Associated with Barley Grains by Gaseous Ozone. **Journal of Environmental Science and Health**, v. B38, n. 5, p. 617-630, 2003.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.

ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120-126, 2016.

AZIZ, N. H.; MATTAR, Z. A.; MAHROUS, S. R. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. **Journal of Food Safety**, v. 26, p. 184-201, 2006.

BAUER, J. I.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. **Food Control**, v. 63, p. 135-139, 2016.

BENEŠOVÁ, K.; BĚLÁKOVÁ, S.; MIKULÍKOVÁ, R.; SVOBODA, Z. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Control**, v. 25, p. 626-630, 2012.

BERTUZZI, T.; RASTELLI, S.; MULAZZI, A.; DONADINI, G.; PIETRI, A. Mycotoxins occurrence in beer produced in several European countries. **Food Control**, v. 22, p. 2059-2064, 2011.



BHAT, R.; RAMAKRISHNA, Y.; BEEDU, S. R.; MUNSHI, K. L. Outbreak of tricothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, India. **The Lancet**, v. 333, n. 8628, p. 35-37, 1989.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 07, de 22 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, 2011.

CALADO, T.; VENÂNCIO, A.; ABRUNHOSA, L. Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1049-1061, 2014.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Aplicação de ozônio na indústria de alimentos. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 341-349, jul.-set. 2008.

COELHO, C. C. S.; SILVA, O. F.; CAMPOS, R. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 369-375, 2015.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Companhia Nacional de Abastecimento. v. 1, n. 7, abril de 2014, p. 83. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=&Pagina\\_objcmsconteudos=5#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=&Pagina_objcmsconteudos=5#A_objcmsconteudos)>. Acesso em: 02 de maio de 2016.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Companhia Nacional de Abastecimento. v. 2, n. 7, abril de 2015, p. 88. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=&Pagina\\_objcmsconteudos=5#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=&Pagina_objcmsconteudos=5#A_objcmsconteudos)>. Acesso em: 02 de maio de 2016.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Companhia Nacional de Abastecimento. v. 3, n. 8, maio de 2016, p. 146-147. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=&Pagina\\_objcmsconteudos=5#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=&Pagina_objcmsconteudos=5#A_objcmsconteudos)>. Acesso em: 02 de maio de 2016.

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, p. 370-380, 2010.

DODD, J. G.; VEGI, A.; VASHISHT, A.; TOBIAS, D.; SCHWARZ, P.; WOLF-HALL, C. E. Effect of Ozone Treatment on the Safety and Quality of Malting Barley. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 12, p. 2134-2141, 2011.

EPRI. Electric Power Research Institute, Technical Report-108026, v. 1, 2, 3. Expert Panel Report: Evaluation of the History and Safety of Ozone in Processing Food for Human Consumption, 1997.

FARKAS, J. Irradiation for better foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 148-152, 2006.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. History and future of food irradiation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 121-126, 2011.

FIPA. Food Irradiation Processing Alliance. Food Irradiation: Questions and Answers, 2016.

FRANCO, T. S.; GARCIA, S.; HIROOKA, E. Y.; ONO, Y. S.; SANTOS, J. S. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 739-748, 2011.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 480-487, 2010.

GOMAH, N. H.; ZOHRI, A. N. Inhibition of fungal growth and Fusarium toxins by selected cultures of lactic acid bacteria. *Microbial & Biochemical Technology*, v. S7, p. 1-7, 2014.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie**, v. 37, p. 453-460, 2004.

HLYWKA, J. J.; BULLERMAN, L. B. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in beer. **Food Additives & Contaminants**, v. 16, n. 8, p. 319-324, 1999.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the *IARC Monographs*, v. 1-107. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2016.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/publications>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2016.

JERMANN, C.; KOUTCHMA, T.; MARGAS, E.; LEADLEY, C.; ROS-POLSKI, V. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 14-27, 2015.

KAWASHIMA, L. M.; VIEIRA, A. P.; SOARES, L. M. V. Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n. 2, p. 317-323, abr.-jun. 2007.

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.

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, 1999.

KOTTAPALLI, B.; WOLF-HALL, C.; SCHWARZ, P, SCHWARZ, J.; GILLESPIE, J. Evaluation of hot water and electron beam irradiation for reducing *Fusarium* infection in malting barley. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 7, p. 1241-1246, 2003.

KOTTAPALLI, B.; WOF-HALL, C. E.; SCHWARZ, P. Evaluation of Gaseous Ozone and Hydrogen Peroxide Treatments for Reducing *Fusarium* Survivall in Malting Barley. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 6, p. 1236-1240, 2005.

KOTTAPALLI, B.; WOLF-HALL, C. E.; SCHWARZ, P. Effect of electron-beam irradiation on the safety and quality of *Fusarium*-infected malting barley. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 224-231, 2006.

KRISHNAMACHARI, K. A. V. R.; NAGARAJAN, V.; BHAT, V.; TILAK, T. B. G. Hepatitis due to aflatoxicosis: An outbreak in Western India. **The Lancet**, v. 1, n. 7915, p. 1061-1063, 1975.

LADO, B. H.; YOUSEF, A. E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 433-440, 2002.

MABLY, M.; MANKOTIA, P.; CAVLOVIC, P.; SCOTT, P. M. Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1252-1257, 2005.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Procedimentos para Tratamentos Fitossanitários com Fins Quaternários, 2006.

MAPA. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada. Documentos online. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. n. 139, outubro, 2012, p. 1-20. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/trigo/busca-de-publicacoes/-/publicacao/969146/aspectos-economicos-e-conjunturais-da-cultura-da-cevada>>. Acesso em: 02 de maio de 2016.

MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid

chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 7-13, 2005.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Programa Nacional de Eliminação do Brometo de Metila, 2006.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. 1ª Ed. Larousse, 2009. 360 p.

MUTURE, B. N.; OGANA, G. Aflatoxin levels in maize and maize products during the 2004 food poisoning outbreak in eastern province of Kenya. **East Africa Medical Journal**, v. 82, n. 6, p. 275-279, 2005.

OKUNO, E. Efeitos bilógicos das radiações ionizantes. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 185-199, 2013.

OLIVEIRA, P. M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. **Food Microbiology**, v. 37, p. 78-95, 2014.

OLIVEIRA, P.; BROSNAN, B.; JACOB, F.; FUREY, A.; COFFEY, A.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. **Food Control**, v. 51, p. 444-452, 2015.

PALMER, J. J. **How to Brew**. 1ª Ed. Natl Book Network, 2006. 347 p.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, p. 96-136, 2014.

PIACENTINI, K. C.; SAVI, G. D.; OLIVO, G.; SCUSSEL, V. M. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. **Food Control**, v. 50, p. 925-929, 2015.

SHAPIRA, R. Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: Detection and**

Control. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd e Boca Raton: CRC Press LLC, 2004. Cap. 9, p. 190-213.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso de ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, abr/jun. 2011.

SPANOGHE, M.; ALLARD, O.; DELVOYE, S.; MARIQUE, T.; VAN KONINCKXLOO, M. Industrial-scale malting barley (*Hordeum vulgare* L.) seed disinfection by fog of ozonated water application. *Ozone: Science & Engineering*, v. 38, n. 2, p. 115-123, 2016.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, p. 248-255, 2010.

USDA. Grain: World Markets and Trade. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Abril, 2016, p. 1-57. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>>. Acesso em abril de 2016.

VRIESEKOOOP, F.; KRAHL, M.; HUCKER, B.; MENZ, G. 125<sup>th</sup> Anniversary Review: Bacteria in Brewing: The good, the bad and the ugly. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, p. 335-345, 2012.

WHO. Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Technical Report Series 659. Geneva: World Health Organization, 1981.

WOLF-HALL, C. E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 89-94, 2007.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZÖLLNER, P.; BERNER, D.; JODLBAUER, J.; LINDNER, W. Determination of zearalenona and its metabolites  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 738, p. 233-241, 2000.