UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**VANESSA DE PAULA BERNARDES**

# EFEITO DO PLASMA FRIO NO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium graminearum* E NA MICOTOXINA DESOXINIVALENOL EM AMOSTRAS DE CEVADA

**CAMPINAS**
**2022**

**VANESSA DE PAULA BERNARDES**

# EFEITO DO PLASMA FRIO NO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Fusarium graminearum* E NA MICOTOXINA DESOXINIVALENOL EM AMOSTRAS DE CEVADA

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

**Orientadora: Prof.ª Dr.ª Liliana de Oliveira Rocha**

Este trabalho corresponde à versão final
da dissertação defendida pela aluna
Vanessa de Paula Bernardes e orientada pela
Prof.ª Dra Liliana de Oliveira Rocha

**CAMPINAS**

**2022**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Gardênia Garcia Benossi - CRB 8/8644

B456 Bernardes, Vanessa de Paula, 1987-
Efeito do plasma frio no complexo de Fusarium graminearum e na micotoxina desoxinivalenol em amostras de cevada. / Vanessa de Paula Bernardes. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Liliana de Oliveira Rocha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Sementes, doenças. 2. Cevada. 3. Micotoxinas. 4. Plasma de baixa temperatura. I. Rocha, Liliana de Oliveira, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effect of cold plasma on the Fusarium graminearum species and on the mycotoxin deoxynevalenol in the barley samples.

**Palavras-chave em inglês:**

Seeds, diseases

Barley

Mycotoxins

Low temperature plasmas

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Liliana de Oliveira Rocha

Lorena Carnielli Queiroz

Nathália Cristina Cirone Silva

**Data de defesa:** 07-04-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-7439-9913
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/7940161400971241

## COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Liliana de Oliveira Rocha

**Presidente e Orientadora/UNICAMP**

Profa. Dra Lorena Carnielli Queiroz

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

Profa. Dra Nathália Cristina Cirone Silva

**UNICAMP**

*A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimento*

# AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha fé, que me sustentaram.

À minha professora Dra Liliana de Oliveira Rocha pela orientação, por toda confiança, apoio, amizade e disponibilidade para a realização deste trabalho. Sou muita grata por esta oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Isabel e José, por todo apoio e suporte que me deram para realizar este meu objetivo, pelas palavras de incentivo e amor.

À minha irmã Isabella, por me dar suporte aos cuidados com minha filha.

À minha filha Luiza, que é a razão da minha fortaleza, que soube entender todas as vezes que precisei deixar que brincar e passear para estudar.

Aos colegas de laboratório de microbiologia, que me ajudaram muito no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Plasma do ITA, Instituto Tecnológico de Aeronáutica, que aceitou esta parceria para realização do trabalho.

Ao professor Munemasa Machida que sempre esteve à disposição e pelas palavras de incentivo e carinho.

À Dobber, por todo o apoio e confiança em meu trabalho.

A todos meus amigos que me deram de alguma forma, um incentivo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## RESUMO

A cevada é um cereal de inverno utilizado como matéria-prima para a produção de malte para a fabricação de bebidas, alimentos, rações animais e medicamentos. Está como quinto cereal mais produzido no mundo, sendo que no Brasil, ainda é pouco cultivado devido às limitações climáticas, porém sua produção é mais concentrada na região sul do país. A contaminação por fungos toxigênicos nos grãos de cevada é de extrema preocupação por parte da indústria cervejeira, que ocorre devido ao seu manejo inadequado desde a pré-colheita, no transporte e no armazenamento. Além disso, as condições climáticas, associadas à infestação por insetos e fatores intrínsecos da matéria-prima, são considerados relevantes, pois podem favorecer o crescimento destes micro-organismos e a produção de micotoxinas, que são compostos tóxicos para animais vertebrados. O complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) é o principal contaminante de cevada, capaz de produzir diversas micotoxinas, principalmente o tricoteceno tipo B desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEN). Buscando-se a eliminação da contaminação por fungos e micotoxinas desta *commoditie* e a melhoria na qualidade do produto, diversas tecnologias de descontaminação vêm sendo desenvolvidas e neste sentido, recentemente, o potencial do plasma frio tem sido citado na literatura, para controle de fungos e micotoxinas em alimentos, devido às suas propriedades antimicrobianas e o potencial de degradar micotoxinas. Considerando que a cevada é um cereal importante para a economia e com elevado potencial de contaminação por *F. graminearum* e suas micotoxinas, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do plasma não térmico em pressão atmosférica em isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* e na micotoxina desoxinivalenol (DON) em amostras de cevada naturalmente contaminadas. Com base nos resultados encontrados neste estudo, o experimento com plasma não térmico de arco deslizante, demonstrou o potencial de inibir o crescimento dos representantes do CEFG, *F. meridionale* e *F. graminearum,* após exposição por 15 e 20 minutos, respectivamente. Os testes de viabilidade celular demonstraram que 100% das hifas de *F. meridionale* foram marcadas pelo corante de morte celular enquanto para *F. graminearum,* apenas uma parte das hifas tornaram-se inviáveis. Posteriormente, grãos de cevada foram tratados durante 10, 20 e 30 minutos, demonstrando a redução de cerca de 1log UFC/g da micobiota natural de cevada, composta por leveduras, CEFG, *Alternaria* e *Aspergillus.* Observou-se redução dos níveis de DON (até 89%) após exposição por 20 minutos, no entanto, verificou-se o aumento da toxina D3G nos grãos de cevada. Estudos posteriores serão necessários para avaliar os potenciais compostos formados após a exposição da micotoxina ao plasma frio.



**Palavras-chave**: cevada; micotoxina; *Fusarium graminearum*; plasma frio; desoxinevalenol

## ABSTRACT

Barley is a winter cereal used as a material to produce malt and beverages, processed foods, animal feed and medicines. It is the fifth most produced cereal worldwide, and in Brazil the production of barley is still limited due to climatic conditions but its concentrated in the Southern region. The contamination of barley grains by toxigenic fungi is a concern in brewing industry; this occurs due to inadequate management from pre-harvest, transportation, and storage of the grains. In addition, climatic conditions associated with insect infestation and intrinsic factors of the raw material are considered relevant, as they can favor the growth of these microorganisms and the production of mycotoxins, which are compounds that are toxic for vertebrate animals when ingested. The *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) is the main contaminant of barley, able to produce several mycotoxins, mainly type B trichothecene (deoxynivalenol - DON) and zearalenone (ZEN). To eliminate the contamination by fungi and mycotoxins in barley grains and to improve the quality of the product, several decontamination technologies have been developed. Recently, the potential of cold plasma has been described in the literature for the control of fungi and mycotoxins in food, due to their antimicrobial properties and the potential to degrade mycotoxins. Considering that barley is an important cereal for the economy and can be highly contaminated by *F. graminearum* and its mycotoxins, this study aimed to evaluate the effect of non-thermal plasma at atmospheric pressure in isolates of the *Fusarium graminearum* species complex and deoxynivalenol in naturally contaminated barley samples. Based on the results found in this study, the experiment with gliding arc discharge plasma demonstrated the potential to inhibit the growth of FGSC representatives, *F. meridionale* and *F. graminearum*, after exposure for 15 and 20 minutes, respectively. Cell viability tests showed that 100% of the hyphae of *F. meridionale* were stained by the cell death dye while for *F. graminearum*, only part of the hyphae became unviable. Subsequently, barley grains were treated for 10, 20 and 30 minutes, demonstrating a reduction of approximately 1log CFU/g of the mycobiota, which was composed of yeasts, FGSC, *Alternaria* and *Aspergillus*. A reduction in DON levels (up to 89%) was observed after exposure for 20 minutes, however, an increase in D3G toxin was observed in barley grains. Further studies will be necessary to evaluate the potential compounds formed after mycotoxin exposure to cold plasma.

**Keywords:** barley; mycotoxin; *Fusarium graminearum*; cold plasma; deoxynevalenol

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Espigas de cevada. ..... 15
**Figura 2.** Anatomia do Grão de Cevada. ..... 17
**Figura 3**. Esporos de Fusarium graminearum. ..... 19
**Figura 4**. Principais micotoxinas produzidas por Fusarium. ..... 21
**Figura 5**. Estrutura química de DON. ..... 23
**Figura 6.** Proposta dos termos utilizados para denominar micotoxinas modficadas. Fonte:Andrade,2016. ..... 27
**Figura 7.** Estrutura molecular D3G. ..... 28
**Figura 8.** (A) Tratamento de tomate por plasma de arco deslizante e forma e dimensão dos eletrodos. (B) Esquema de arco deslizante e circuito elétrico. ..... 36
**Figura 9**. (**a**) Configuração experimental, (**b**) reator e (**c**) fotografia do reator FVFR de arco deslizante para tratamento de F. graminearum em cevada. ..... 41
**Figura 10. (a)** Formas de onda da tensão do gliding arc; **(b)** forma de onda da corrente do gliding arc; **(c)** potência da descarga de plasma do gliding arc usado para calcular a potência média através dos gráficos 2a e 2b com o auxílio da equação 1; e **(d)** espectro OES de jato de plasma de arco deslizante operando com fluxo de ar de 5 $L.min^{-1}$. ..... 43
**Figura 11.** Crescimento do fungo F. meridionale, após tratamento com PNT nos tempos de 5, 10 e 15 minutos. 1-Controle Positivo; 2 - 5 min.; 3 - 10 min; 4 - 15 min. ..... 50
**Figura 12**. Crescimento do fungo F. graminearum, após tratamento com PNT nos tempos de 5, 10 e 15 minutos.1-Controle Positivo; 2 - 5 min.; 3 - 10 min; 4 - 15 min. ..... 51
**Figura 13.** Efeito do PNT no crescimento radial médio de F. meridionale, após o tratamento por 5 e 10 minutos. ..... 52
**Figura 14.** Efeito do PNT no crescimento radial médio de F. graminearum, após o tratamento por 5, 10 e 15 minutos. ..... 53
**Figura 15**. Tratamento de plasma em *F. oxysporum.* ..... 53
**Figura 16***.* Efeito do PNT na viabilidade celular de *F. meridionale.* Verde: laranja de tiazol (TO), Vermelho: iodeto de propídeo (PI). a) visualização no microscópio ótico (aumento de 40x), b) visualização no canal para TO (aumento de 40x), demonstrando células viáveis e não viáveis; c) visualização no canal para PI (aumento de 40x), demonstrando apenas as células não viáveis. ..... 55
**Figura 17.** Efeito do PNT na viabilidade celular de F. graminearum. Verde: laranja de tiazol (TO), Vermelho: iodeto de propídeo (PI). a) visualização no microscópio ótico (aumento de 40x), b) visualização no canal para TO (aumento de 40x), demonstrando células viáveis e não viáveis; c) visualização no canal para PI (aumento de 40x), demonstrando apenas as células não viáveis; d) visualização nos canais para TO e PI, demonstrando as diferentes marcações entre as células viáveis e não viáveis. ..... 56

# SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO** ..... 11

**2. OBJETIVOS** ..... 14

2.1 Objetivo Geral ..... 14

2.2 Objetivos específicos ..... 14

**3. Revisão da literatura** ..... 15

3.1 Cereais de inverno ..... 15

3.2. Cevada ..... 16

3.3 Fusarium ..... 18

3.3.1 Complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) ..... 19

3.4 Micotoxinas ..... 20

3.4.1. Desoxinivalenol ..... 22

3.4.2 Zearalenona ..... 24

3.4.3 Toxina T2 ..... 24

3.4.4 Fumonisinas ..... 25

3.4.5 Micotoxinas Modificadas ..... 26

3.5 Ocorrência de micotoxinas em grãos de cevada ..... 28

3.6 Controle de fungos e micotoxinas ..... 29

3.6.1 Controle Biológico ..... 30

3.6.2 Controle Químico ..... 32

3.6.3 Controle Físico ..... 33

**4. MATERIAL E MÉTODOS** ..... 40

4.1. Cepas do complexo de espécies *Fusarium graminearum* ..... 40

4.2. Configuração experimental do plasma não térmico - descarga arco deslizante ..... 40

4.2.1 Técnicas de caracterização do plasma ..... 41

4.2.1. Parâmetros do processo de tratamento por plasma não térmico ..... 44

4.3. Efeito do plasma não térmico nos fungos *F. graminearum* e *F. meridionale* ..... 44

4.3.1. Preparo do inóculo ..... 44

4.3.2. Efeito do plasma não térmico no complexo de espécies do *Fusarium graminearum* ..... 45

4.3.3 Efeito do plasma não térmico na viabilidade celular no CEFG - Microscopia confocal ..... 45

4.4. Avaliação das amostras de cevada tratadas por Plasma Não Térmico .....46
4.4.1. Avaliação da microbiota dos grãos de cevada .....46
4.4.2. Análise de DON e D3G.....47
4.5 Análise estatística dos dados.....48
**5. Resultados e Discussão** ..... 49
5.1 Avaliação dos efeitos do tratamento com plasma de ar comprimido no CEFG49
5.2 Avaliação do efeito do PNT na viabilidade celular das espécies *F. meridionale* e *F. graminearum*.....54
5.3. Efeito do PNT na micobiota dos grãos de cevada, com enfoque no CEFG ...57
5.4. Perfil de contaminação por DON e D3G nos grãos de cevada tratados com PNT .....60
**6. Conclusão**..... 62
**7. Referências Bibliográficas**..... 63

# 1. INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* sp*. vulgare*.) é um cereal de inverno pertencente à família das gramíneas, com indícios de seu uso desde o Egito Antigo (6000 – 5000 aC). Nessa época, foi considerada um dos principais cereais para a alimentação humana, sendo atualmente, apontada como um dos cereais mais produzidos, ocupando a quinta posição em ordem de importância econômica mundial (EMBRAPA, 2022).

No Brasil, produção de cevada é mais concentrada na região sul do país (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), porém em outros estados como São Paulo, Minas Gerais e Goiás, pode também encontrada (Conab, 2020), sendo que o principal uso da cevada é para a produção de cerveja, porém o grão pode ser utilizado na produção de rações para animais, na composição de farinhas ou flocos para panificação, na produção de remédios, na formulação de produtos dietéticos e do café (Piacentini et. al., 2015).

A malteação, processo para produção de cerveja, exige um controle, pois é a etapa que ocorre a germinação, no qual o grão é imerso em água e acondicionado a 10 – 12 $^{o}$C, produzindo enzimas capazes de modificar o amido da cevada em açúcares fermentescíveis, além de fornecer aminoácidos nas medidas adequadas e outros nutrientes para que a levedura aja no processo de fermentação, que tem como produto álcool e gás carbônico (Takeiti, 2012).

O crescimento de fungos filamentosos nos grãos de cevada, é de extrema preocupação por parte da indústria cervejeira, que ocorre devido ao seu manejo inadequado desde a pré-colheita, no transporte e no armazenamento. Além disso, as condições climáticas, associadas à infestação por insetos e fatores intrínsecos da matéria-prima, são considerados relevantes, pois podem favorecer o desenvolvimento destes micro-organismos, ocorrendo uma contaminação fúngica e por micotoxinas, que são compostos tóxicos, representando um contaminante importante na alimentação humana e animal, produzidos principalmente pelos gêneros *Alternaria, Aspergillus*, *Fusarium e Penicillium,* sendo *Alternaria* e *Fusarium* frequentemente relatados em cevada (Piacentini et. al., 2015).

Micotoxinas, são compostos com baixo peso molecular que apresentam potencial carcinogênico, mutagênico e podem provocar efeitos tóxicos no organismo,

mesmo quando consumidos em baixa concentração. Dentre os efeitos mais graves encontrados estão a neurotoxicidade e hepatoxicidade. Sendo assim, qualquer contato com fungos toxigênicos pode ser consideravelmente nocivo (Tadei, et al., 2020).

Além disso, as micotoxinas são quimicamente estáveis e tendem a se manter íntegras durante o período beneficiamento e armazenamento dos grãos ou ainda no pós-processamento do alimento podendo ser encontradas em todos os níveis da cadeia alimentar, por isso devem ser constantemente monitoradas desde a produção no campo até o processamento final pelas indústrias alimentícias e agências do governo. (Cast, 2003; Nicolli et al, 2020).

Dentre as micotoxinas mais comumente encontradas em grãos de cevada, destacam-se o tricoteceno tipo B desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEN), os quais são produzidos, principalmente, por *Fusarium graminearum sensu stricto* (Leslie e Summerell, 2006).

*Fusarium graminearum sensu stricto* (*s.s.*) é a espécie predominante em grãos de inverno, incluindo a cevada, afetando negativamente a saúde da planta no campo, ocasionando a doença denominada giberela ou *Fusarium Head Blight* (FHB), que proporciona danos aos grãos levando a perdas de produtividade, diminuição da capacidade de germinação e redução da qualidade do malte (Schmale III et. al., 2003). Além disso, grãos afetados pela doença, apresentam elevados níveis de tricotecenos, o que ocasiona a rejeição de lotes pela indústria de alimentos e bebidas (Pereira et al., 2020).

Buscando-se a eliminação da contaminação por fungos e micotoxinas dessas *commodities* e a melhoria na qualidade do produto, diversas tecnologias de descontaminação vêm sendo desenvolvidas, como o tratamento com radiação gama (Braghini et al., 2009), ozonização (Alexandre et al., 2018), enzimático (Wang et al., 2011) e os adsorventes, tradicionalmente utilizados em ração animal para remoção de micotoxinas (Jans et al., 2014). Neste sentido, recentemente, o potencial do plasma frio tem sido citado na literatura, para controle e descontaminação de fungos e micotoxinas em alimentos (Sarangapani et al., 2018).

O plasma é composto, fisicamente, por uma mistura gasosa ionizada, parcial ou total (Mandal et al., 2018). Apresenta espécies reativas, como elétrons, íons positivos e negativos, radicais livres, moléculas de gás excitadas ou não excitadas, com a capacidade de interagir com substratos orgânicos e/ou inorgânicos (Ekzie et

al., 2017). Sendo assim, estudos têm demonstrado que as espécies reativas presentes em plasmas frios em pressão atmosférica, interagem com micro-organismos, inativando-os e podendo levar à sua eliminação, aumentando a segurança do produto e prolongando a sua vida útil (Karlovsky 2016, Misra 2019, Wang 2020).

Em fungos filamentosos, o plasma frio pode atuar na parede e membrana celular, resultando em perda de estrutura. Além disso, pode ocasionar o estresse oxidativo da célula, proporcionando alterações nos ácidos nucléicos e, como consequência, morte celular (Misra et al., 2019). Já com relação às micotoxinas, estudos demonstraram que o plasma frio proporciona a decomposição química das mesmas, resultando em produtos de degradação que podem apresentar toxicidade inferior à molécula original (Ten Bosch et al., 2017; Misra et al., 2019).

Devido às suas propriedades antimicrobianas, o plasma frio é considerado uma tecnologia de interesse contemporâneo para a indústria de alimentos (Misra et al., 2019). A descontaminação rápida dos alimentos em condições de temperatura ambiente e pressão atmosférica, sem incorrer em custos demasiados, quando se utiliza o ar ambiente como gás de trabalho, torna o plasma frio particularmente atrativo para o mercado. Alguns dos setores de alimentos que poderiam se beneficiar da propriedade antimicrobiana do plasma frio incluem: produtos frescos, grãos e oleaginosas, especiarias, carnes secas e indústrias de peixe (Gavahian et al, 2020).

Considerando que a cevada é um dos cereais importantes para a economia e com elevado potencial de contaminação por *F. graminearum* e suas micotoxinas, este trabalho visa avaliar os efeitos do plasma não térmico em pressão atmosférica em isolados do complexo de espécies *Fusarium graminearum* e na micotoxina desoxinivalenol em amostras de cevada naturalmente contaminadas.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do plasma frio gerado por descarga de arco deslizante no complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG) e na micotoxina desoxinivalenol em amostras de cevada naturalmente contaminadas.

## 2.2 Objetivos específicos

- Verificar o perfil de contaminação pelo complexo de espécies *F. graminearum* em amostras de cevada provenientes da região Sul do Brasil;
- Verificar a ocorrência de desoxinivalenol em amostras de cevada provenientes da região Sul do Brasil;
- Avaliar o efeito do plasma frio no crescimento *F. graminearum s.s.* e *F. meridionale*, espécies comumente associadas à cevada brasileira;
- Definir as melhores condições do plasma frio (voltagem e tempo de exposição) para inativação do CEFG;
- Avaliar o efeito do plasma frio, a partir da melhor condição definida, na ocorrência do CEFG e desoxinivalenol em amostras de cevada naturalmente contaminadas.

# 3. Revisão da literatura

## 3.1 Cereais de inverno

Os cereais de inverno considerados mais importantes para produção de alimento tanto humano quanto como o principal constituinte na alimentação animal, incluem a aveia, centeio, cevada, trigo e o triticale. São gramíneas anuais, de crescimento ereto, que alcançam de 0,6 a 1,5 m de altura e cujas inflorescências são espigas (**Figura 1**), exceto para as aveias, que são panículas (Fontaneli et al., 2009).

**Figura 1.** Espigas de cevada.

Fonte: Embrapa, 2014

No geral, os cereais de inverno têm um elevado valor nutritivo durante seu estágio vegetativo, sendo variável de acordo com o desenvolvimento da planta, bem como genótipos dentro da mesma espécie. A ***Tabela 1***, descreve o teor proteico e energético dos cereais de inverno (Fontaneli et al., 2009).

**Tabela 1** .Teor proteico e energético dos cereais de inverno.

| Cereal | PB (%) | NDT (%) |
|---|---|---|
| Aveia branca | 13,4 | 78,0 |
| Cevada | 12,4 | 82,0 |
| Trigo | 14,2 | 88,0 |
| Triticale | 12,6 | 82,3 |

Legenda: PB: Proteína bruta (%); NDT: Nutrientes digestíveis totais (%).
Fonte: Rebesquin, R. et.al.,2020.

A produção agrícola de cereais, em geral, pode ser considerada uma das mais importantes no mundo. O desenvolvimento da agricultura em tempos pré-históricos, foi fortemente associado à domesticação de grãos de cereais e desde seu primeiro cultivo, a maioria das civilizações tornaram-se dependentes dos cereais como suprimento alimentar (Cordain L., 1999).

No Brasil, cerca de 90% da produção dos cereais de inverno está concentrada na região sul do país (Rebesquin et al.,2020), sendo que o trigo ocupa a maior área cultivada, 2.338,8 toneladas em 1000 hectares, comparativamente à aveia (415,7 toneladas em 1000 ha), cevada (102,5 toneladas em 1000 ha) e centeio (4,7 toneladas em 1000 ha) (Conab, 2020).

### 3.2. Cevada

A cevada é um cereal considerado como um dos primeiros a serem domesticados pelo homem, conforme averiguado por numerosos restos fósseis provenientes de jazidas arqueológicas do período neolítico. É um dos cereais mais citados na Bíblia, pois foi um dos primeiros alimentos a serem cultivados e consumidos pela humanidade. Era o principal cereal da fabricação de pão entre os Hebreus, Gregos e os Romanos (KRUKLIS, 2019).

Pertencente ao gênero *Hordeum*., a espécie economicamente mais importante e que deve ser destacada é a *Hordeum vulgare sp. Vulgare*. A planta pode atingir até 1 metro de altura e o grão pode medir de 8 a 14 milímetros de comprimento, 1,5 a 4,5 milímetros de largura, apresenta formato alongado (Piacentini et. al., 2015).

Está como o quinto cereal mais produzido no mundo, mas no Brasil, que produz cevada em escala comercial desde 1930, ainda não é muito cultivado devido as limitações climáticas. Esse cereal pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de malte para a fabricação de bebidas (cervejas e destilados), além de alimentos, rações animais e medicamentos (Rebesquin et.al.,2020).

Como produto do processo de malteação, o malte consiste na germinação do grão de cevada, em condições controladas, por três a seis dias, interrompida bruscamente por secagem sob elevadas temperaturas (Embrapa, 1999). Clima e manejo são considerados fatores determinantes para a produção de cevada com padrão

adequado para malteação, destacando principalmente o poder germinativo, tamanho e sanidade dos grãos (Piacentini et. al., 2015). No Brasil, os produtores de cevada para fins cervejeiros, estão principalmente nos três estados da região sul do Brasil, devido ao clima da região ser propício para o cultivo deste grão (Conab, 2020).

Os grãos que não aprovados pelo controle de qualidade das maltarias, geralmente são para produção de alimentação animal, sendo utilizados como forragem verde, feno, silagem, fabricação de ração, sendo este último, constitui o maior uso mundial da cevada (Rebesquin, et.al.,2020).

A estrutura anatômica do grão da cevada é composta por: casca, embrião e endosperma ( ***Figura 2***). Na casca encontramos a membrana externa, com função de proteger e delimitar o grão. É rica em fibras, vitaminas do complexo B, minerais e antioxidantes. Quando colhida, uma boa quantidade de fibra pode ser retirada da semente, se a camada externa for removida (Kruklis, 2019).

Rico em minerais e vitaminas do complexo B, o embrião da cevada é formado por três partes: o cotilédone, o epicótilo (dá origem ao broto) e a radícula (dá origem a raiz). O endosperma é a fonte de nutrientes do embrião, pois abriga os carboidratos da planta, entre outros nutrientes como lipídeos, proteínas, minerais e vitaminas do complexo B (Kruklis, 2019).

O endosperma da cevada é rico em polissacarídeos, por conta disto, é importante na indústria cervejeira, pois proporciona os substratos necessários para a conversão de açúcares em álcool no processo de fermentação da cerveja (Brennan et al., 1997).

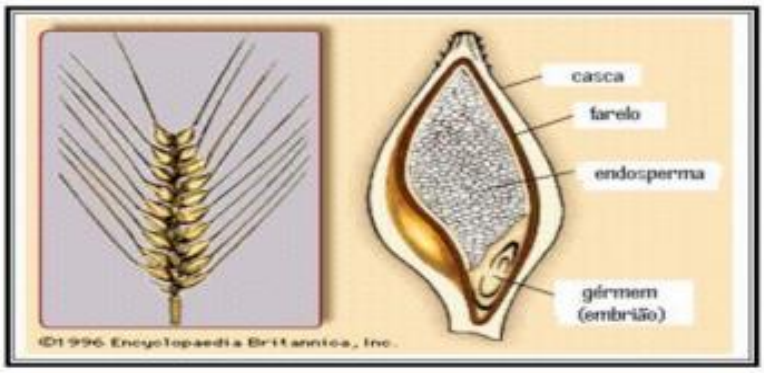


**Figura 2.** Anatomia do Grão de Cevada.

Fonte:Kruklis,2019.

Como mencionado anteriormente, os grãos de cevada podem ter sua qualidade afetada devido à contaminação por insetos e micro-organismos, motivo de grande preocupação da indústria de grãos, pois afeta-os tanto quantitativamente quanto qualitativamente (Rebesquin et.al.,2020).

Muitos gêneros fúngicos que podem ser encontrados em cevada, no entanto, os mais relatados são: *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria* (Piacentini et al., 2015).

O gênero *Fusarium* é apontado como um dos mais infectantes em cereais, causando uma grande preocupação para o setor agrícola e segurança alimentar em todo o mundo (Desjardins, 2006). Espécies deste gênero, tem a capacidade de causar doenças e produzir micotoxinas, ameaçando, portanto, o rendimento e a qualidade dos cereais (MA et al., 2013).

### 3.3 Fusarium

O gênero *Fusarium* pertence ao filo Ascomycota, a classe Sordariomycetes, a ordem Hypocreales e a família Nectriaceae. Sua taxonomia é definida por apresentar hifa septada, macroconídios em forma de fusos e possuir célula basal. Apresentam micélio com aspecto aveludado, com coloração variando de rosada, vermelha, violeta e marrom (Leal et al. 2005; Pitt & Hocking, 2009).

Há uma diversidade de espécies de *Fusarium* amplamente distribuídas pelo mundo, encontradas no solo, vestígios de tecidos vegetais e animais, podem colonizar ramos e folhas, serem disseminados pela água e ar e possuem capacidade de sobreviver por longos períodos no solo pelos seus clamidósporos. Exigem elevada atividade de água para se desenvolver e após a invasão na semente, algumas espécies podem produzir micotoxinas, ocasionando uma certa preocupação para o setor da agricultura e industrial, durante os períodos de pré e pós-colheita dos grãos. Devido à necessidade de elevada atividade de água para o crescimento, tende a ser eliminado por outros fungos durante o processo de armazenagem dos grãos, onde somente a sua toxina formada permanece (Leal et al., 2005, Milase, 2009).

Dentre os representantes do gênero *Fusarium,* o complexo de espécies *F. graminearum* (CEFG) é considerado o responsável determinante pelo desenvolvimento da giberela em trigo e cevada, uma doença de infecção floral causada principalmente, por elevada umidade e temperaturas entre 20 a 25ºC. Este

grupo provoca diversos prejuízos na economia, devido à contaminação por fungos visível e presença de micotoxinas (Embrapa, 2006).

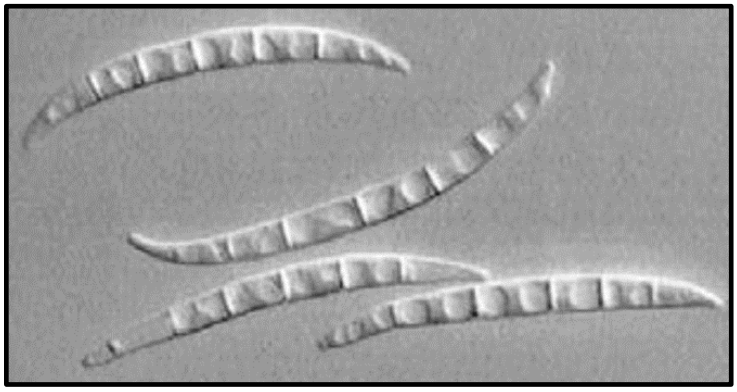

**Figura 3**. Esporos de *Fusarium graminearum*.

Fonte: Leslie et al., 2006.

### 3.3.1 Complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CEFG)

O gênero *Fusarium* contém mais de 90 espécies caracterizadas e possivelmente há muitas outras espécies para caracterizar-se. As espécies do gênero *Fusarium* foram estruturadas em diferentes complexos como o complexo de espécies de *F. graminearum* (CEFG*)* (Nicolli et al, 2021).

Em estudos filogenéticos, O'Donnell et al. (2004), definiram que *F. graminearum* é constituído por um complexo por pelo menos 16 espécies determinadas através do sequenciamento de 12 genes primários, das quais 15 foram descritas. Estas espécies do CEFG, diversificam quanto ao fenótipo químico em relação aos tricotecenos do tipo B e estão sendo utilizados métodos moleculares para genotipar isolados, pela presença de alelos de genes pertencente à síntese dessas micotoxinas (Júnior et al., 2013; O'DONNELL et al., 2004).

As espécies filogeneticamente identificadas são: *Fusarium acacia-mearnsii*, *F. aethiopicum, F. asiaticum, F. austroamericanum, F. boothii, F. brasilicum, F. cortaderiae, F. gerlachii, F. graminearum sensu stricto, F. meridionale, F. mesoamericanum, F. ussurianum, F. vorosii, F. nepalense* e *F. lousianense* (Nicolli et al, 2021; O'DONNELL et al., 2004). A presença do (CEFG) em grãos, indica a ocorrência de giberela como já mencionado anteriormente e no entanto, não há

informações sobre o estágio fenológico mais suscetível à infecção por esse patógeno (Scheidt et al., 2019).

O CEFG é constantemente encontrado em cereais de inverno, como a cevada, destacando-se as micotoxinas desoxinivalenol (DON) e a zearalenona (ZEA) (Tadei, et al., 2020).

### 3.4 Micotoxinas

A contaminação microbiana dos cereais pode afetar a segurança, qualidade e propriedades dos grãos, pois pode levar a mudanças nutricionais como perda de carboidratos, proteínas e vitaminas, diminuição da germinação, mudanças químicas, entre outros efeitos. Alguns bolores, além de proporcionar a deterioração visível dos alimentos como descoloração e odor desagradável, podem produzir micotoxinas, sendo prejudiciais e causando um grave risco na saúde tanto humana como dos animais quando ingeridas (Laca et al., 2006).

Os fungos filamentosos produzem metabólitos secundários, com propriedades tóxicas que induzem vários efeitos nocivos, cancerígenos, mutagênicos, hepatóxicos, imunotóxicos e neurotóxicos quando ingeridas em qualquer alimento contaminado, afetando a saúde de humanos e animais. São formadas sob condições de estresse, desbalanceamento nutricional, como também em condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Possuem baixo peso molecular, podem estar presente em todos os níveis da cadeia alimentar, por isso devem ser monitoradas desde a pré colheita, armazenamento dos grãos, até o processamento final nas indústrias (Tadei et al., 2020, Piacentini et. al., 2015, Barbosa, 2014).

O fungo toxigênico pode estar presente no alimento, porém isso não acarreta necessariamente, a presença da micotoxina, assim como, o metabólito secundário pode estar no alimento mesmo sem a presença do fungo, devido a sua propriedade termoestável (Piacentini et. al., 2015).

Os principais fungos toxigênicos, correspondem ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo que cada um desses gêneros, pode produzir tipos diferentes de micotoxinas, da mesma forma, que determinada micotoxina, pode ser produzida por espécies diferentes de fungo (Rocha, et al, 2020). A **Figura 4** demonstra as principais toxinas produzidas por *Fusarium.*

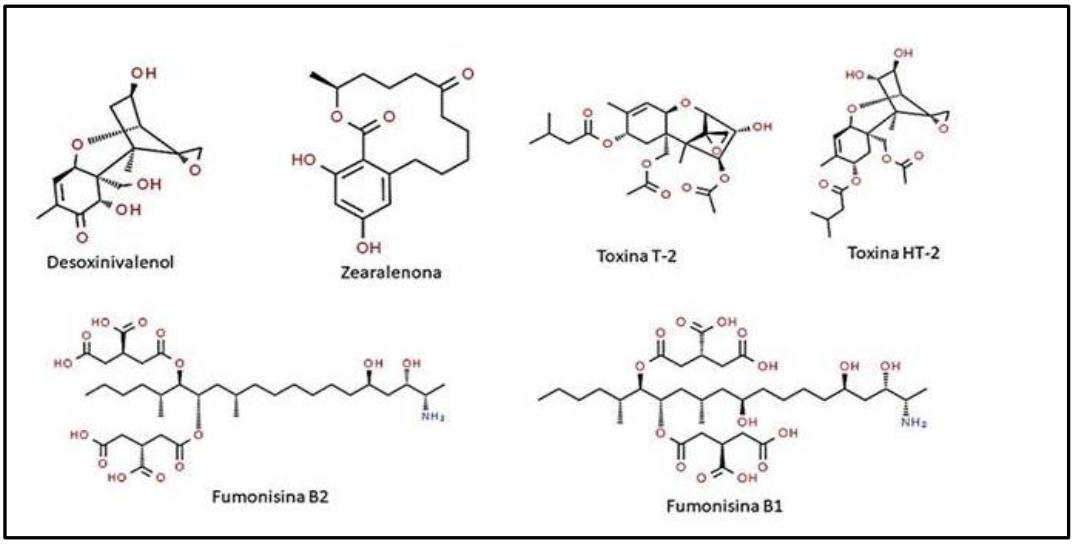


**Figura 4**. Principais micotoxinas produzidas por *Fusarium*.

Fonte: Tadei, N. S. et al., 2020.

A *Food and Agriculture Organization of the United Nation* (FAO) considera que pelo menos 25% de cereais do mundo, estão afetados por micotoxinas, causando prejuízos econômicos por vários fatores, tais como perdas diretas de produtividade agrícola e pecuária como por exemplo, morte de animais e a causa de doenças em humanos e perdas indiretas como a rejeição ou desvalorização de produtos pelo mercado, queda na exportação e aumento da importação, entre outros (Liu; Gao; Yu, 2006).

Devido às perdas econômicas e aos riscos relacionados ao consumo de micotoxinas, diversos países estabeleceram limites em alimentos para o controle destes compostos. No Brasil, a Resolução RDC nº 487 e Instrução Normativa 88, de 26 de março de 2021 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) propõe sobre os limites máximos tolerados para DON nos cereais, conforme demonstrado na **Tabela *2***.

**Tabela 2.** Limites máximos tolerados (LMT) da micotoxina desoxinivalenol em cereais.

| Micotoxinas | Alimentos | LMT (µg/kg) |
|---|---|---|
| Desoxinivalenol (DON) | Trigo integral, trigo para quibe,farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, **grão de Cevada.** | 1000 |
| | Farinha de trigo, massas, crackers,biscoitos de água e sal, produtos de panificação, cereais e produtos de cereais, exceto trigo e incluindo **cevada malteada.** | 750 |

Fonte: Adaptado de Anvisa. RDC nº 487 e Instrução Normativa 88, de 26 de março de 2021.

### 3.4.1. Desoxinivalenol

A micotoxina desoxinivalenol (DON), é um tricoteceno do tipo B, produzido por espécies do gênero *Fusarium* tais como *F. graminearum* e *F. culmorum*, considerada uma das micotoxinas mais comumente em grãos de cereais como cevada, milho, trigo, aveia, arroz e centeio. Estas, crescem em temperaturas ótimas entre 21ºC e 25ºC, umidade, são termicamente resistentes e por esse motivo, podem estar diretamente na cadeia alimentar de humanos e animais (Piacentini et. al., 2015).

Como todos os tricotecenos, o DON é inibidor da síntese proteica, é uma substância teratogênica, neurotóxica, embriotóxico e de efeitos imunossupressores, no qual a exposição via ingestão em doses baixas, seus principais efeitos são dores abdominais, tonturas, dores de cabeça, gastroenterite, vômitos e recusa do alimento por animais, especialmente por suínos que são mais sensíveis ao DON provocando vômitos. Sob exposição em doses elevadas, pode ocasionar graves danos nos linfóides e nas células epiteliais da mucosa gastrointestinal, causando hemorragia e endotoxemia, além de efeitos imunotóxicos e mudanças neuroquímicas no cérebro (Barbosa, 2014).

O LD50 (dose letal média) oral em humanos, para DON varia de 46 a 78 ppm. A FAO/ OMS determinou o consumo diário tolerável máxima provisória (PMTDI) de 1 ppm de peso corporal (p.c.) para a soma de DON e suas formas acetiladas [3-acetil-16 deoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON)]. Ademais, nesta mesma avaliação, o Comitê também determinou uma dose de referência aguda

(ARfD) de 8 ppm p.c. para a combinação de DON, 3AcDON e 15AcDON, embasado na observação de emese em suínos (Tibola & Fernandes, 2020).

Baseado no consumo de trigo a partir dos dados de consumo individual de alimentos da FAO/OMS, um estudo da exposição ao contaminante DON, relatou que populações adultas no Brasil, China e Bélgica, estão sendo submetidas a exposições desta micotoxina, podendo representar riscos crônicos para a saúde (Tibola & Fernandes, 2020).

A fórmula empírica de DON é $C_{15}H_{20}O_6$ e seu nome químico (12,13-epoxi-3α,7α,15-trihidroxitricotec-9-en-8-ona). É uma substância orgânica polar de massa molar de 296,32 g/mol, solúvel em água e solventes orgânicos polares (acetonitrila, metanol, etanol, acetato de etila e clorofórmio). Possui estabilidade sob temperaturas muito elevadas, entre 170°C e 350 °C e devido esta propriedade físico-química, o risco de sua permanência em alimentos é muito grande. Sua estrutura química contém um grupo carbonila no carbono (C8) conjugado com uma dupla ligação nos carbonos (C9 e C10), que absorve no ultravioleta (cetona α,β-insaturada). Investiga-se se a carbonila conjugada pode estar associada aos efeitos tóxicos de DON, assim como o grupo epóxido situado nos carbonos (C12 e C13) (Santos, 2018; Barbosa, 2014).

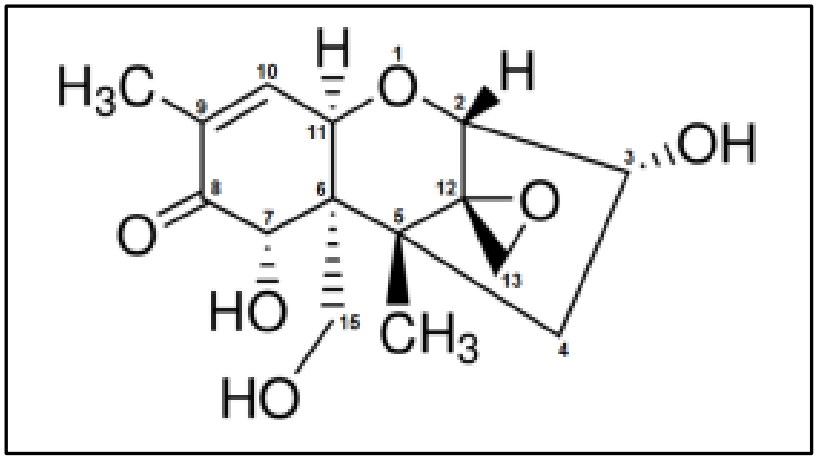


**Figura 5**. Estrutura química de DON.

Fonte: Sigma Aldrich,2022.

### 3.4.2 Zearalenona

A Zearalenona (ZEN) é uma micotoxina também produzida pelo gênero *Fusarium*, principalmente pelas espécies *F. graminearum* e *F. culmorum,* é considerada estável e termorresistente (Barbosa, 2014; Piacentini et. al., 2015). Estas espécies invadem cereais, principalmente em épocas do ano com alto teor de umidade e temperatura amena, por tanto, esta micotoxina pode ocorrer de maneira natural em cevada, trigo, milho e arroz em diversos países (Andretta et al., 2008).

ZEN é estrogênica não esteroide e seus efeitos tóxicos estão relacionados à esta propriedade através da sua ligação ao receptor de estrogênio natural, tanto em humanos como em animais. Quando ingerida, apresenta pouca toxicidade aguda, porém em relação a toxicidade subaguda ou subcrônica, seus efeitos causam alterações no sistema reprodutivo e vários outros sintomas, tais como: redução da ninhada em animais sendo que para humanos, os dados disponíveis são poucos (Piacentini et. al., 2015).

Os suínos são os animais mais sensíveis à ingestão da ZEN, apresentando sinais clínicos de intoxicação a partir de 50µg $kg^{-1}$ nas dietas e de hiperestrogenismo com níveis > 1000 ppb, ou ainda, níveis menores. Em porcas pré-púberes, podem ocorrer inchaço vulvar, alargamento do útero e desenvolvimento mamário. A taxa de concepção reduzida, acompanhada de repetição de cio, nascimento de porcos natimortos ou fracos e muitas vezes, surtos da síndrome dos membros abertos, são sinais clínicos que também podem ser observados (Andretta et al., 2008).

### 3.4.3 Toxina T2

A toxina T-2 é pertencente aos tricotecenos do tipo A, produzidos principalmente por *F. poae* e *F. sporotrichioides,* presente em cereais tais como, cevada, milho, trigo, arroz, centeio e aveia no campo e logo após a colheita, podendo crescer em alta atividade de água e temperaturas de 2-35ºC, com temperatura ótima relativamente baixa (8-14ºC) para a ocorrência de T-2 (Piancenti, 2015).

A contaminação em alimentos por T-2, geram graves efeitos na saúde humana e em animais, podendo ocasionar até a morte. A aleucia tóxica alimentar (ATA), é uma doença causada pela ingestão desta toxina e inclui sepse, hemorragias, inibição da hematopoiese e depleção linfóide. Os mesmos sintomas foram relatados em animais

domésticos juntamente com necroses no trato gastrointestinal (Patriarca & Pinto, 2017).

Além de (ATA), esta micotoxina em humanos pode causar danos no DNA (ácido desoxirribonucleico) e indução de apoptose e em animais, causa uma grande variedade de efeitos tóxicos como perda de peso, diminuição da contagem de células sanguíneas e leucócitos, redução da glicose plasmática e alterações patológicas no fígado e estômago. Ao longo dos anos, os relatos em diferentes regiões do mundo, vem descrevendo a associação do T-2 com danos à agricultura e seus efeitos tóxicos em animais (Li et al., 2011).

### 3.4.4 Fumonisinas

As fumonisinas (FBs) representam o maior grupo das micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*, especialmente por espécies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, porém estudos mostraram que *Aspergillus Nigri* também pode produzir essa micotoxina (Andrade, 2016; Gertner, et al., 2008).

Estes fungos têm distribuição mundial, sendo que *F. verticillioides* é considerado um importante patógeno do milho em todas as fases de seu desenvolvimento, pois este fungo, pode ter a capacidade de anular o crescimento de outros fungos da espiga, ser responsável pela sua podridão rosa, doença causada em estações secas e quentes e em plantações afetadas por insetos (Andrade, 2016). Ao que tudo indica, as fumonisinas apenas são produzidas quando há um estresse hídrico na planta ou em sob outras condições não favoráveis que ocasiona uma mudança no equilíbrio entre a planta e o fungo (PITT, 2006).

As fumonisinas análogas até então descritas, foram divididas em quatro grupos principais: A, B, C e P. As fumonisinas do grupo B, desacando-se FB1, FB2 e FB3, são as micotoxinas encontradas com frequência em milho contaminado, sendo que a fumonisina B1 é a mais abundante e tóxica, e é o principal metabólito produzido pelos fungos *F. verticillioides e F.proliferatum*. Além disso, a exposição oral de FB1, pode ocasionar leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos e é relacionada com o elevado risco de câncer de esôfago em humanos que consomem milho contaminado (Gertner et al., 2008; Pinto et al., 2007).

### 3.4.5 Micotoxinas Modificadas

Além da exposição a micotoxinas, humanos e animais também estão sujeitos aos seus derivados, denominados “micotoxinas modificadas”. Estas, são metabólitos que, geralmente, não são detectados pelos métodos convencionais de análise da molécula original (mãe) e são geralmente formadas como parte do mecanismo de defesa da planta infectada pelo fungo. Ademais, as micotoxinas modificadas podem ser formadas durante o processamento dos alimentos a partir de matérias-primas contaminadas com a molécula mãe. Em alguns casos, podem ser reconvertidas à micotoxina original no sistema digestivo de animais vertebrados ou durante o processamento (no último caso, se o alimento estiver contaminado com uma forma modificada). Nesse sentido, a reconversão da molécula à sua forma original, a torna bioacessível e, eventualmente, a concentração das micotoxinas livres pode exceder o nível detectado no alimento. (Freire & Sant'Ana, 2018; Schabo, et al., 2021).

As micotoxinas modificadas apresentam alterações biológicas ou químicas em sua estrutura, sendo que as biologicamente modificadas, são as substâncias resultantes do processo de biotransformação, tanto de reações de fase I (adição ou exposição de grupos funcionais) como de fase II (conjugação com substâncias endógenas), além de outros formas de modificações biológicas. A conversão da aflatoxina B1 no fígado de humanos e animais em um metabólito altamente tóxico, é um exemplo de modificação biológica de fase I podendo causar mutações genéticas. Os metabólitos de fase II, incluem as substâncias resultantes de reações de conjugação realizada por animais (DON-glicosídeos), plantas (deoxinivalenol-3-glicosídeo) e por fungos (**Figura *6***). Os compostos quimicamente modificados, podem ser termicamente formados ou não. As modificações ocasionadas pelo tratamento térmico podem acontecer durante os processos de torrefação, frituras, cozimento ou extrusão dos alimentos (Freire & Sant'Ana 2018; Andrade, 2016).

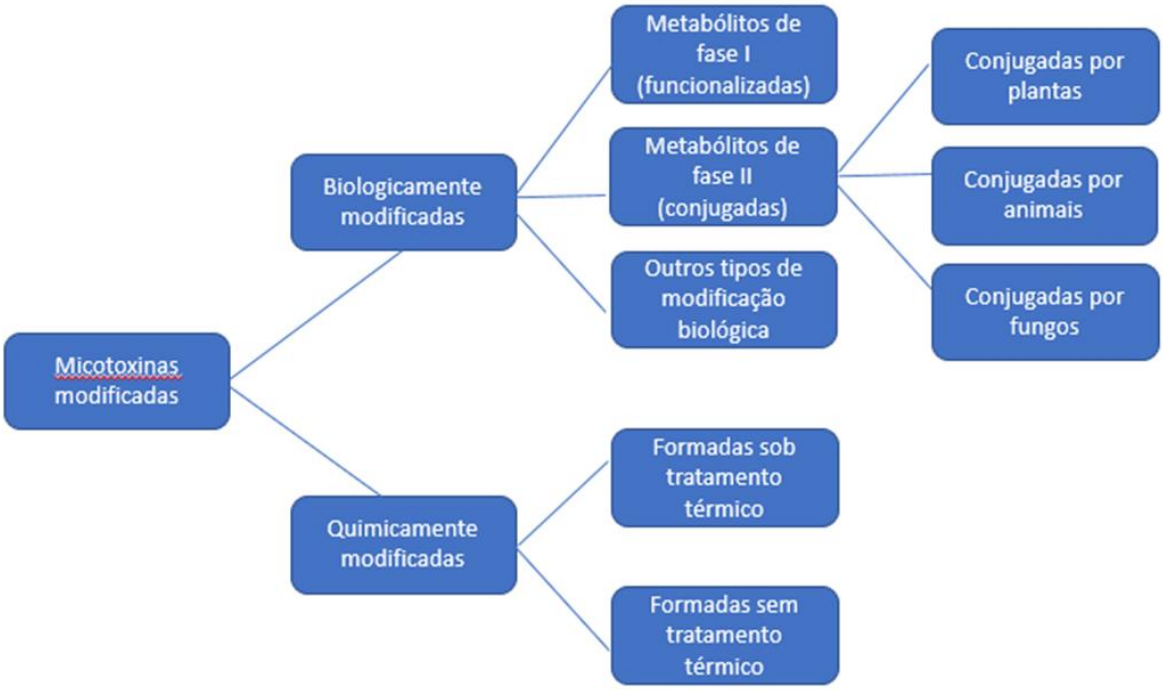


**Figura 6.** Proposta dos termos utilizados para denominar micotoxinas modficadas.

Fonte: Andrade,2016.

Devido às dificuldades na detecção da maioria das micotoxinas modificadas, pelas mudanças estruturais e físicas da molécula, alternativas no processo de extração podem ser utilizadas, por exemplo o uso de métodos enzimáticos para quebrar as ligações de conjugação. Outra alternativa, seria utilizar técnicas sensíveis, capazes de elucidar e detectar moléculas derivadas da micotoxina parental. Nesse sentido, a espectrometria de massas e a ressonância magnética, são consideradas estratégias eficazes para a detecção e elucidação de micotoxinas modificadas em alimentos (Freire et al., 2020).

### 3.4.5.1 Desoxinivalenol-3-glicosídeo (D3G)

Deoxinivalenol-3 glicosídeo (D3G) pode estar presente nos alimentos, como uma micotoxina modificada, formada através da ligação de uma molécula de glicose ao grupo hidroxila do carbono 3 da molécula de DON (**Erro! Fonte de referência não e ncontrada.**). Esta, pode ser formada no metabolismo da planta, na tentativa de detoxificação de DON ou, ainda, no processamento do alimento (Freire & Sant'Ana, 2018).

Estão ainda sob estudos, a toxicidade do D3G na saúde e o desenvolvimento de metodologias rápidas, especialmente em cereais, sendo de suma importância, devido ao elevado consumo de cereais pela população (Trombete, F. M. 2016).

O D3G contém glicose em sua molécula e por isso as propriedades químicas são diferentes do DON, como solubilidade e polaridade e, anteriormente, resultou na não identificação pelos métodos convencionais de análise, fato que levou a alguns casos de micotoxicoses em animais. Por esse motivo, houve o desenvolvimento de novas metodologias para detectar D3G em diferentes matrizes alimentares, principalmente as baseadas na quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e, atualmente, as análises são prontamente realizadas devido ao desenvolvimento de padrões analíticos para D3G (Trombete, F. M. 2016).

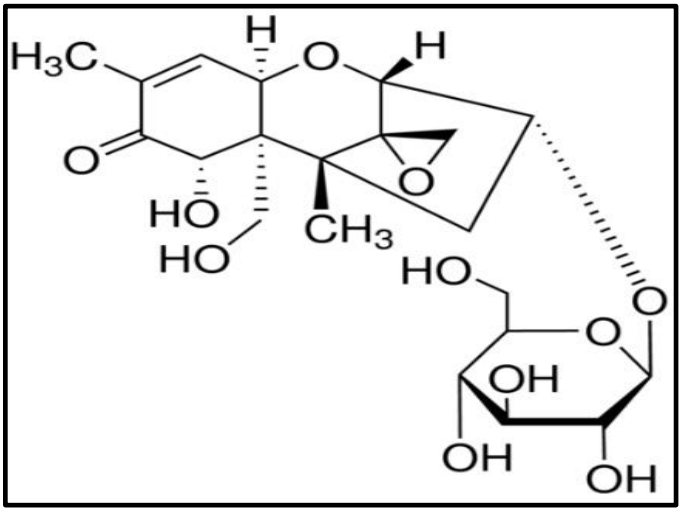


**Figura 7.** Estrutura molecular D3G.

Fonte: Sigma Aldrich.

### 3.5 Ocorrência de micotoxinas em grãos de cevada

A cevada afetada por giberela, pode ocasionar interferência negativa no processo de germinação, obtendo uma pior qualidade na maltagem e redução da produtividade, no caso do uso da cevada para produção de cerveja. *Fusarium graminearum* é o fungo responsável pela doença, capaz de produzir altos níveis das micotoxinas DON e ZEN (Tadei et al., 2020).

Em 2015 no Brasil, foram realizados estudos que relataram que 94% de amostras de cevada brasileiras colhidas, estavam infectadas por DON, com níveis médios entre

1.700 e 7.500 µg/kg, enquanto a contaminação por ZEN, 73,6% das amostras continham níveis médios entre 350 e 630 µg/kg (Tadei et al., 2020). As condições climáticas tais como temperatura e precipitação elevadas, podem influenciar na contaminação por fungos e por consequente micotoxinas nos grãos, destacando-se a relevância do monitoramento desses fatores durante o desenvolvimento da planta (Piacentini et al., 2018).

Conforme relatos nos últimos anos, de acordo com Tadei, et al., 2020, a contaminação da cevada por DON na Europa, registra-se entre 15 e 55%. A médias das concentrações foram de 484 µg/kg em cevada não processada, 152 µg/kg em grãos designados para consumo humano e 187 µg/kg designados para a alimentação animal.

### 3.6 Controle de fungos e micotoxinas

Como mencionado anteriormente, os fungos toxigênicos contaminam regularmente cereais em todo mundo e a exposição às micotoxinas, pode causar efeitos graves à saúde. Por consequência, a maioria dos países estabelecem níveis máximos para micotoxinas em alimentos, baseando-se na avaliação de toxicidade e nos dados de exposição (European Commission, 2006).

As matérias-primas frequentemente apresentam níveis de contaminação por micotoxinas mais elevados do que os produtos acabados, devido aos fatores climáticos e armazenamento que favorecem o crescimento dos fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus, Penicillium*, *Fusarium, Alternaria* e *Claviceps.* O efeito de diluição ao formular um produto com ingredientes não contaminados, assim como as ações de mitigação devido ao processamento industrial, pode ser a causa por trás dos produtos acabados terem menores níveis de contaminação (Karlovsky et al., 2016).

Os alimentos contaminados por micotoxinas podem ser evitados por: (a) prevenindo a contaminação na pré-colheita com práticas agrícolas como rotação de culturas, preparo do solo, produtos químicos e controle biológico de doenças de plantas e de insetos; transporte e armazenamento (b) removendo o material contaminado do produto alimentar, e (c) medidas mitigatórias nos alimentos (Kabak et al. 2006; Choudhari e Kumari 2010).

No processamento de alimentos, ocorrem mecanismos físicos e químicos que podem reduzir as concentrações de algumas de micotoxinas livres. As ações por esses mecanismos podem ser por (a) remoção física, (b) transformação química resultando em metabólitos de menor toxicidade, (c) liberação de formas modificadas (d) desintoxicação enzimática e (e) adsorção em superfícies sólidas (Kaushik 2015). Por tanto, todos esses processos podem ser considerados ações de mitigação de micotoxinas em alimentos (Karlovsky et al., 2016).

Para que a descontaminação seja eficaz, ela deve ser irreversível, formas modificadas de micotoxinas devem ser afetadas junto com a “micotoxina mãe”, os produtos devem ser atóxicos e os alimentos devem manter o valor nutritivo e permanecer palatável. Estes critérios podem ser utilizados como uma avaliação para as tecnologias de descontaminação das micotoxinas no processamento de alimentos (Milani e Maleki, 2014).

### 3.6.1 Controle Biológico

O abundante uso de agrotóxicos para a utilização do controle integrado de doenças e pragas nas culturas, resulta no acúmulo de substâncias nocivas no solo e na água, causando danos ao homem e a outros animais, contaminação de alimentos, além de levar ao surgimento de organismos resistentes aos compostos químicos utilizados (Campanhola, 2003, Bettiol & Morandi, 2009).

A sociedade vem pressionando por produção de alimentos mais saudáveis, a exemplo disso, o mercado europeu possui protocolos estabelecidos que visam a segurança do consumidor. O Brasil e outros países que têm a agricultura como principal fonte da economia, já sentem essa necessidade e começam a implantar sistemas mais sustentáveis de produção e o controle biológico é a estratégia indispensável (Lopes, 2009; Morandi & Bettiol, 2009).

O termo controle biológico é aplicado à utilização de antagonistas naturais presentes no ambiente, para reduzir a um limiar aceitável, a população de um agente causador de perdas produtivas à agricultura. Os micro-organismos selecionados como antagonistas naturais, devem possuir especificidade de ação, capacidade de se multiplicar rapidamente e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado. Além disso, as formulações precisam oferecer segurança para os

consumidores, produtores, animais, ao meio ambiente e principalmente, que ser efetivo no controle do organismo alvo (Mota, et al. 2003).

Por esse motivo, o controle biológico tem sido uma ferramenta para controlar os fungos toxigênicos, reduzindo sua presença e como consequência a concentração de micotoxinas nos alimentos (Zuchhi, T. D. & Melo, I. S., 2009).

Junior et al. (2018), realizaram estudos para observar a ação antagonista de isolados do gênero *Trichoderma* em fungos como *Fusarium* sp*., Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e tiveram resultados cabíveis. *Trichoderma* spp. têm sido muito usados como alternativa à aplicação de produtos químicos, apresentando importância econômica para a agricultura. São capazes de agirem como agentes de controle de patógenos em várias plantações, assim como serem promotores de crescimento e indutores de resistência às doenças.

O processo de fermentação é conhecido como metabolismo anaeróbio, ou seja, a produção de energia sem o uso de oxigênio. Em alimentos, a fermentação está associada à transformação dos alimentos através de enzimas liberadas por micro-organismos, como as bactérias e fungos, dando origem a vários alimentos, como por exemplo, bebidas alcoólicas, pão, alimentos em conserva e embutidos, tornando-os mais saborosos, mais digeríveis e com menor potencial de contaminação por micro-organismos patogênicos, neste último, a fermentação aumenta a segurança dos alimentos, pois produz antimicrobianos como ácido lático, bacteriocinas e etanol facilitando a inibição dos patógenos ( Katz, S. E., 1962).

Micro-organismos fermentadores, além de transformar alimentos, podem transformar as micotoxinas em compostos menos tóxicos ou modificá-las em compostos conjugados. Estudos realizados com bactérias láticas (BAL) para verificar o potencial de transformar micotoxinas, relatou que as células das BAL podem adsorver a AFM1 ou biotransformá-la por atividade enzimática, porém seu mecanismo de ação precisa ser mais explicado. Também foi descrita a redução da contaminação por patulina (PAT) e ocratoxina A (OTA) pela atividade de *Saccharomyces cerevisiae*, nesse contexto, a inativação ou modificação de micotoxinas através da fermentação alcoólica de frutas pode vir a ser uma medida promissora para sua mitigação (Karlovsky et. al., 2016).

### 3.6.2 Controle Químico

Os processamentos químicos, são usados como uma estratégia para destruir ou inativar fungos e micotoxinas, ocasionando a descontaminação em alimentos. Alguns métodos químicos relatados em estudos, especialmente para a descontaminação de alimentos com aflatoxinas e OTA, apresentam aplicação bem-sucedida como: ácidos, bases, agentes oxidantes, agentes clorados, formaldeído e amoníaco (Ten Bosch et al., 2017).

Em um estudo, foi aplicado ácido forte para tratar aflatoxinas em alimentos e destruiu a atividade biológica de aflatoxinas B1 e G1 (AFB1 e AFG1), convertendo-os em formas hemiacetais AFB2a e AFG2a, respectivamente, assim como o tratamento com ácido clorídrico (pH 2), reduziu os níveis de AFB1 em 19%. A maioria desses tratamentos, pode transformar as micotoxinas em outros compostos, principalmente em combinação com tratamentos físicos, cuja toxicidade deve ser avaliada, ademais, é fundamental que o tratamento químico, não prejudique as qualidades nutricionais, de textura ou sabor dos alimentos. (Karlovsky et.al, 2016).

A crescente busca pelo uso do ozônio nas indústrias alimentícias, é devido a procura por métodos sanitizantes mais satisfatórios nos processamentos, com melhor custo-benefício, sustentáveis e que forneçam alimentos seguros e de qualidade aos seus consumidores. O ozônio é um potente oxidante utilizado e possui diversas vantagens, destacando-se sua eficiência como desinfetante, na inativação de fungos e bactérias, principalmente, na sanitização de equipamentos e embalagens na indústria de alimentos (Bortolotto, 2014).

O ozônio está associado à habilidade de se espalhar através de membranas biológicas, sendo como primeiro alvo a ser alcançado, a superfície da membrana celular. A ação antimicrobiana é devido a oxidação dos glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos da parede microbiana, alterando a permeabilidade celular. Atua também nos grupos sulfidrila de enzimas causando o colapso da atividade enzimática, além de interagir com os ácidos nucléicos. Há muitas pesquisas se concentrando na tecnologia do ozônio, demonstrando que pode ser usada para a descontaminação de vários alimentos como frutas, vegetais, grãos, carnes e frutos do mar (O'Donnell, et. al, 2012).

Relato de alguns estudos sobre a aplicação de ozônio em grãos, demonstraram a diminuição de micotoxinas, como o tratamento com 1,1 mg / l de ozônio durante 5

min à temperatura ambiente, demonstrando a redução de 77% e 80% de AFB1 e AFG1, respectivamente. No entanto, a AFB2 e AFG2 foram resistentes ao ozônio, com degradação máxima de 51%, independentemente do tempo de exposição. O tratamento foi eficaz também para outras micotoxinas, como DON, OTA, PAT, ácido secalônico D e ZEN (Karlovsky et.al, 2016).

### 3.6.3 Controle Físico

Os processos físicos como limpeza, moagem, tratamentos térmicos (cozimento, assamento, fritura, torração, pasteurização, descascamento e extrusão) e não térmicos (irradiação e plasma frio), também são considerados estratégias para destruição e inativação de fungos e micotoxinas em alimentos (Karlovsky et.al, 2016). Embora as aplicações biológicas e químicas sejam sucedidas, as técnicas físicas apresentam mais eficiência na remoção de micotoxina de alimentos e rações (Ten Bosch et al., 2017).

O plasma frio contém efeitos antimicrobianos e pode ser usado para a descontaminação de superfícies frágeis ou sensíveis à temperatura, como alimentos. Uma revisão recente sobre o uso de plasma para processamento de alimentos (Schlüter et al., 2013) destacou o potencial desta tecnologia, porém exige um uso cauteloso pois os produtos tratados com plasma devem ser avaliados caso a caso, para avaliar seus componentes nutricionais e potencial formação de compostos tóxicos.

#### 3.6.3.1 Plasma frio

O plasma é dito como o quarto estado da matéria, composto de íons negativos e positivos, elétrons, átomos excitados e neutros, radicais livres, moléculas nos estados fundamental e excitado e os fótons UV (Thirumdasa, et al., 2018). É formado a partir da excitação do gás ou de uma mistura de gás pela aplicação de pressão e energia (corrente elétrica, mecânica, térmica, nuclear (Misra et al., 2014).

Os agentes do plasma favorecem a sua interação com o material biológico. Estudos demonstraram que o tratamento com plasma pode atuar em vários micro-organismos, incluindo esporos bacterianos (Lee et al., 2006).

As tecnologias de processamento de alimentos não térmicos como irradiação, processos de alta pressão, processamento de luz UV e ozonização vem sendo empregadas nas indústrias de alimentos, como métodos alternativos de conservação, minimizando os efeitos sobre o perfil nutricional dos produtos e estendendo a vida útil de prateleira e por este motivo, recentemente, a tecnologia de plasma frio, tem recebido mais atenção em aplicações alimentícias (Thirumdasa, et al., 2018).

O plasma frio pode ser aplicado em diversos setores na indústria de alimentos, incluindo a redução da contaminação por micro-organismos em carnes, laticínios, frutas, vegetais e grãos (Mir; Shah e Mir, 2016).

O plasma frio interage com os micro-organismos por três mecanismos primários. O primeiro é através da interação química de radicais, espécies reativas ou partículas carregadas com membranas celulares. O segundo, por sua vez, ocasiona danos às membranas e componentes celulares internos por radiação UV e o terceiro, as fitas de DNA podem ser quebradas pela radiação UV gerada durante a recombinação das espécies do plasma (Silva et al., 2018).

#### 3.6.3.2 Tipos de plasma frio

O plasma pode ser dividido em três categorias: plasma em equilíbrio termodinâmico completo (ETC), plasma em equilíbrio termodinâmico local (ETL) e plasma sem equilíbrio termodinâmico local (sem ETL). O primeiro trata-se de um estado encontrado apenas nas estrelas ou em intervalos curtos de uma forte explosão, o segundo é o estado onde todas as temperaturas consideradas são iguais, sendo considerados plasmas térmicos e o terceiro, é o que denominamos de plasmas frios (Bastos, 2010).

A classificação de plasma térmico e plasma não-térmico (PNT) baseia-se nos níveis energéticos relativos aos elétrons e espécies pesadas do plasma. O PNT (próximo à temperatura ambiente de 30–60 ºC) é obtido em pressões atmosféricas ou reduzidas (vácuo) e requer menos energia. Os PNTs são caracterizados por uma temperatura do elétron mais elevada à do gás (temperatura macroscópica) e por tanto, não apresentam um equilíbrio termodinâmico local. Em contraposição, o plasma térmico é gerado em pressões maiores, requer alta potência, e existe um equilíbrio quase térmico entre os elétrons e as espécies pesadas (Misra et al., 2011).

Há muitos problemas relacionados a qualidade dos alimentos processados termicamente, como perdas nutricionais e efeitos adversos na qualidade sensorial. Isso levou ao surgimento das tecnologias chamadas não-térmicas. O plasma não-térmico ou plasma frio é comumente denominado como processo de oxidação avançado (AOP).

As concentrações em que os agentes de plasma acontecem, dependem muito da configuração do dispositivo (geometria do reator), condições de operação (pressão do gás, tipo, fluxo, frequência e potência de excitação do plasma) e a composição do gás, configurações associadas a eficácia do tratamento por plasma. Outro critério decisivo é se o substrato a ser tratado está em contato direto com o plasma (Exposição Direta) ou distante (Exposição Remota) (Misra et al.,2011).

Os modelos de equipamentos mais conhecidos são: descarga de barreira dielétrica (DBD), descarga de barreira resistiva (RBD), descarga de barreira dielétrica em cascata (DBD), caneta de plasma, descarga de plasma corona, plasma frio atmosférico de alta tensão (HVACP), plasma alimentado por microondas, plasma frio de arco deslizante, plasma de descarga de superfície de fase gasosa, jato de plasma de descarga corona intermitente (ICDPJ), jato de plasma frio, jato de plasma de pressão atmosférica (APPJ), jato de plasma de baixa frequência, plasma de descarga pulsada, plasma de descarga de brilho uniforme de uma atmosfera (OAUGDP), plasma frio atmosférico de radiofrequência, plasma de descarga de barreira de superfície coplanar difusa, plasma frio de baixa pressão e lanterna de plasma (Aguirre, 2020).

O dispositivo de plasma DBD é um dos reatores de plasma frio mais conhecidos. Neste equipamento, o alimento é colocado entre seus dois eletrodos, sendo que a distância entre os eletrodos varia de 0,1 mm até vários cm e uma vez que o gás é fornecido ao sistema, o plasma atua sobre o produto, produzindo micro descargas e garantindo um tratamento homogêneo. A maioria dos equipamentos DBD funciona em condições de pressão atmosférica (Coutinho et al*.,* 2018).

O sistema de plasma de arco deslizante tem uma estrutura diferente do sistema DBD que é mais conveniente para o objeto com espessura baixa e se houver um objeto grande, como por exemplo um tomate, são produzidos distúrbios na formação do plasma. Sendo assim, para processar diretamente o objeto, o plasma de arco deslizante é usado para gerar plasma independentemente do tipo de produto (Khani, et. al., 2017).

O arco deslizante é um plasma não estacionário mantido por uma descarga elétrica, que se desenvolve entre dois eletrodos divergentes paralelos e é soprado por um fluxo de gás que conduz o processo de ionização e, desta forma, o plasma flui para fora da abertura do eletrodo, sendo usado para algumas finalidades dentre elas, na indústria de alimentos para o controle de micro-organismos. Pode ser alimentada com tensão contínua ou alternada e as principais características desse sistema de plasma são: alta temperatura de elétrons (elevada energia); alta densidade de elétrons e, ainda assim, baixa temperatura do gás (menos de 350 K) (Khani, et. al., 2017; Ribeiro, 2020).

A **Figura 8** demonstra como o arco elétrico se inicia na região de menor distância entre os eletrodos, com alta corrente elétrica e, à medida que se alonga, diminui a corrente com o aumento da tensão, até a sua interrupção. A seguir, o arco reinicia novamente, estabelecendo-se, assim, um processo repetitivo.

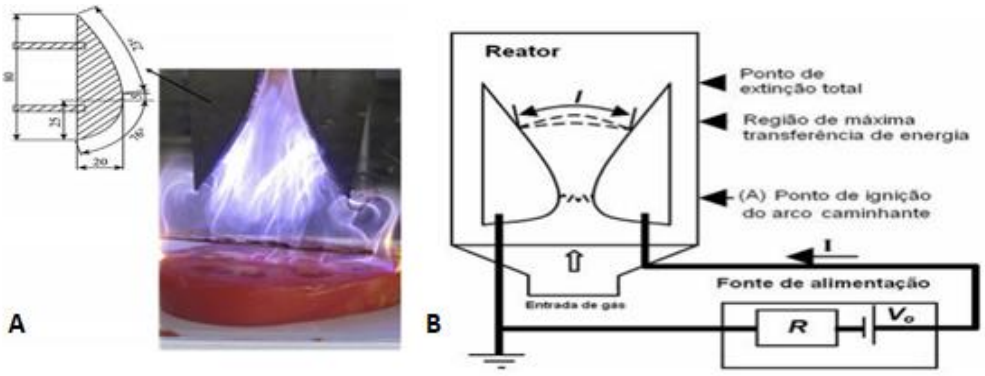


**Figura 8.** (A) Tratamento de tomate por plasma de arco deslizante e forma e dimensão dos eletrodos. (B) Esquema de arco deslizante e circuito elétrico.

Fontes: Khani et al., 2017; Ribeiro, 2020.

A descarga de plasma frio de arco deslizante é indicada como a melhor área escalável para tratamento, pois a eficiência do processo de plasma, envolve centenas de espécies e reações químicas diferentes, porém seu efeito depende do tempo de tratamento exposto sendo o fator chave para manter a qualidade do produto (Ashtiania, et al., 2020).

### 3.6.3.3 Plasma frio no controle de fungos e micotoxinas

As espécies reativas no plasma têm sido amplamente associadas aos efeitos oxidativos diretos na superfície externa das células microbianas. Como exemplo, o

plasma de oxigênio e nitrogênio gasoso são excelentes fontes de espécies reativas como O, $O_2$, $O_3$, OH, NO, $NO_2$ (Critzer et al., 2007). Estes atuam nos ácidos graxos insaturados da bicamada lipídica da membrana celular, impedindo assim o transporte de moléculas através dela. As ligações duplas de lipídios insaturados são particularmente vulneráveis ao $O_3$ (Guzel-Seydim; Greene e Seydim, 2004). Presume-se que os lipídios da membrana sejam mais significativamente afetados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à sua localização ao longo da superfície da célula microbiana, permitindo a interação com esses fortes agentes oxidantes (Montie; Kelly-Wintenberg e Roth, 2000).

A oxidação de aminoácidos e ácidos nucléicos também pode causar alterações que resultam em morte ou lesão microbiana (Critzer et al., 2007). Além de ocasionar estes efeitos celulares, o plasma também pode provocar acidificação do meio (Moreau et al., 2005).

Foi proposto que os fótons UV de diferentes comprimentos de onda estão envolvidos na dimerização das bases timina do DNA (Munakata; Saito e Hieda, 1991). A radiação UV-C (100-280 nm) é um agente de inativação eficaz no plasma (Roth; Feichtinger e Hertel, 2010). Os fótons UV desempenham um papel menos importante na descarga luminosa de pressão atmosférica (APGD) porque são facilmente absorvidos por átomos e moléculas de gás na pressão atmosférica (Vleugels et al., 2005).

O plasma frio também pode ser visto como uma ferramenta eficaz para a degradação de micotoxinas, incluindo aflatoxinas, desoxinivalenol, eniatinas, zearalenona e fumonisinas, transformando-as em outros compostos com menor toxicidade (Gavahian e Cullen, 2020).

Basaram et al. (2008), demonstraram que o plasma frio de baixa pressão reduziu até 50% das aflatoxinas em nozes. Ouf et al. (2015) observaram que o plasma frio de argônio à pressão atmosférica inativou *Aspergillus niger* e os níveis de OTA e fumonisina B2 caíram de 25 e 6 µg/100 $mm^2$, respectivamente, para abaixo dos limites de detecção.

Park et al. (2007) estudaram o efeito do plasma frio diretamente em três micotoxinas, DON, aflatoxina B1 (AFB1) e nivalenol não foram detectadas após o tratamento.

**Tabela *3*** descreve os parâmetros de alguns tipos de plasma utilizados na descontaminação de diferentes espécies de fungos.

**Tabela 3.** Parâmetros do plasma frio na descontaminação de fungos em diferentes substratos.

| Micro-organismo | Parâmetros de processamento | Gás de trabalho | Superfície / meio de tratamento | Tempo de exposição (s) | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| *Aspergillus niger* | Descarga de barreira dielétrica em cascata | Ar | Películas PET | 5 | Muranyi; Wunderlich e Heise (2007) |
| Leveduras e bolores | Descarga de barreira dielétrica; 70 $kV_{RMS}$, 50 Hz; | Ar úmido | Cereja, tomate e morango, respectivamente | 60 e 300, respectivamente | Ziuzina et al. (2014) |
| *Aspergillus flavus* | Jatos de plasma frio; Tensão de excitação DC pulsada, 12 kHz | Ar | Noz fresca e seca | 660 | Amini e Ghoranneviss -2016 |
| *Aspergillus flavus* | Jatos de plasma frio; 10 kV, 40 W, 50–600 kHz, 10 L/ Min | Ar | Barra de cereal de arroz integral | 1200 | Suhem et al. -2013 |
| *Aspergillus flavus* | Plasma frio ativado por microondas; 2,45 GHz, 900 W, 667 Pa | $N_2$; He | Pimenta vermelha em pó | 1200 | Kim; Lee e Min (2014) |
| *Aspergillus flavus*; *Alternaria alternata*; *Fusarium culmorum* | Descarga Difusa de Barreira Coplanar de Superfície (DCSBD), 400W | Ar ambiente | Milho | 30 – 300 | Zahoranova et al. (2018) |

| Micro-organismo | Parâmetros de processamento | Gás de trabalho | Superfície / meio de tratamento | Tempo de exposição (s) | Referências |
|---|---|---|---|---|---|
| Esporos de *Aspergillus niger* | Descarga de Barreira Dielétrica de Superfície (SDBD) | $O_2$, ar comprimido umidificado e $O_2$ umidificado | Pimenta preta | 240 | Tanino et al. 2019 |
| Esporos de *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium* | Plasma indutivamente acoplado; Low pressure (500 mTorr); 1 kHz; 20 kV; 300 W | Ar e $SF_6$ | Trigo, cevada, aveia, lentilha, centeio, milho, grão de bico | 300 – 1200 | Selcuk et al. -2008 |
| Esporos de *Aspergillus parasiticus* e Aflatoxinas | Plasma indutivamente acoplado; Low pressure (500 mTorr); 1 kHz; 20 kV; 300 W | Ar e $SF_6$ | Avelã, pistache, amendoim | 300 - 1200 | Basaran; Basaran-akgul; Oksuz (2008) |

Fonte: Elaboração da autora.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1. Cepas do complexo de espécies *Fusarium graminearum*

Foram utilizadas cepas de*, F. meridionale e F. graminearum,* isoladas de grãos de cevada da região do Rio Grande do Sul, previamente caracterizadas pelos *loci RPB1* e *RPB2* e perfil de genótipos no trabalho de Iwase et al., 2020. As cepas foram reconstituídas em meio ágar cravo (CLA) para as análises posteriores. Estas espécies foram selecionadas devido à elevada ocorrência em cevada e outros cereais de inverno no Brasil (Astolfi et al., 2011; Iwase et al., 2020; Piacentini et al., 2018, Pinheiro et al., 2021, Tralamazza et al.,2016).

## 4.2. Configuração experimental do plasma não térmico - descarga arco deslizante

O esquema do sistema experimental do plasma não térmico (PNT) foi embasado no trabalho de Chiappim et al. (2021) utilizando a configuração descarga arco deslizante (GA) no Laboratório de Plasmas e Processos (LPP) do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA).

A configuração experimental do sistema inclui: o reator de plasma, a fonte de alimentação de alta tensão, o circuito pulsante, o osciloscópio e o espectrômetro de emissão óptica (**Figura 9**). O plasma GA é gerado em um tipo de reator de fluxo de vórtice reverso (FVFR) e este é dividido pelas regiões de jato de plasma e de pós-descarga. O gás utilizado neste estudo foi ar atmosférico gerado por compressor médico/ortodôntico (Schulz MSV6-30, Joinville, SC, Brasil). O gás foi inserido no FVFR com uma taxa de fluxo total de 5 L/min utilizando rotâmetros separados. Para gerar o plasma, um transformador de alta tensão (3.0 kV, 20 KHz) foi conectado aos eletrodos. Uma resistência de alta tensão (1 kΩ) protege o transformador no caso de arco elétrico.

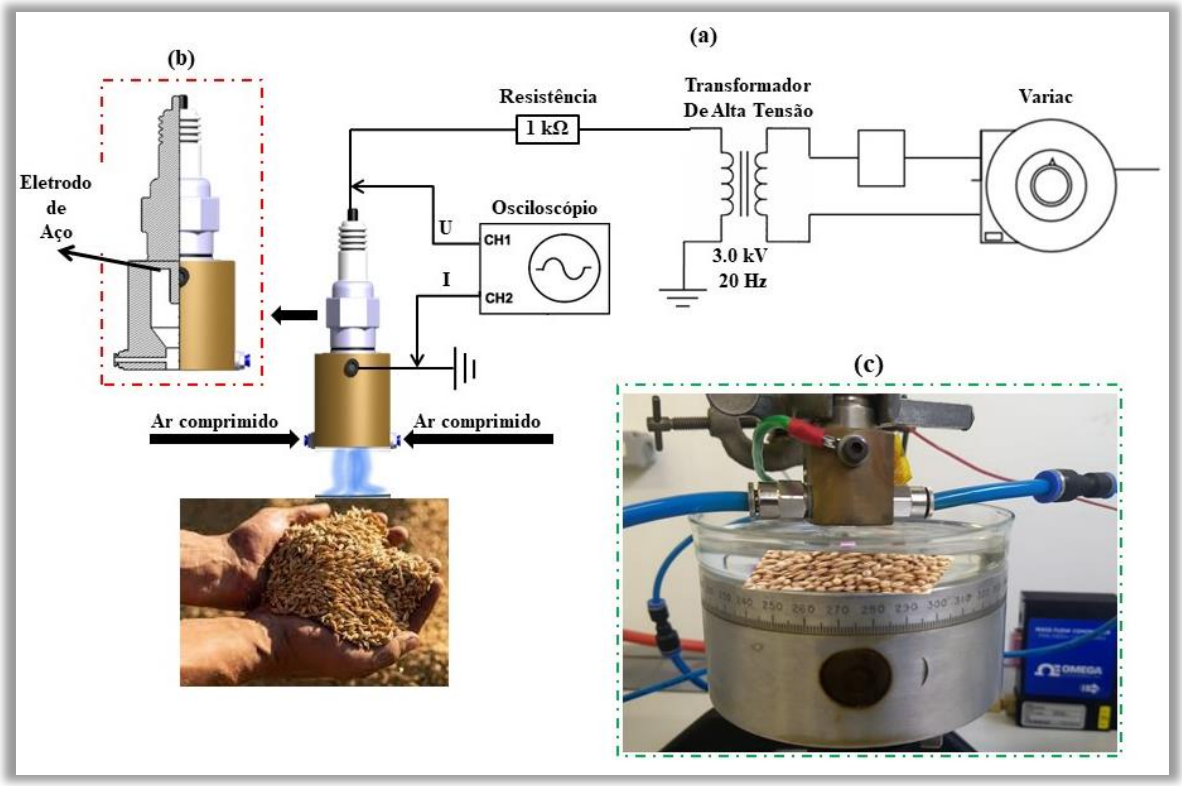


**Figura 9**. (**a**) Configuração experimental, (**b**) reator e (**c**) fotografia do reator FVFR de arco deslizante para tratamento de *F. graminearum* em cevada.

Fonte: Adaptado Chiappim et al., 2021.

### 4.2.1 Técnicas de caracterização do plasma

Para obter os sinais elétricos da descarga do arco deslizante, foram utilizadas uma sonda de alta tensão (Tektronix P6015A, Tektronix, Beaverton, OR, EUA) e uma sonda de corrente autoajustável (Agilent N2869B, Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Todos os sinais elétricos foram registrados em um osciloscópio digital (Keysight DSOX1202A, Keysight, Santa Rosa, CA, EUA), e o sinal de corrente foi inferido diretamente do eletrodo aterrado.

A energia elétrica dissipada no plasma ($P_{dissip}(W)$) foi calculada pela seguinte equação Chiappim et al. (2021):

$$P_{dissip}(W) = \frac{1}{T_2 - T_1} \int_{T_1}^{T_2} V(t) I(t) dt$$

onde V (t) é a tensão, I (t) é a corrente elétrica e $T_2$-$T_1$ é o período.

A **Figura 10a** mostra a forma de onda típica para os sinais de tensão e corrente elétrica registrados pelo osciloscópio. A **Figura 10b** ilustra a forma de onda da

potência de descarga em função do tempo. Vale ressaltar que a curva plotada V (t) x I (t) (**Figura 10c**) representa a potência de descarga instantânea, que é integrada em um intervalo de tempo ($T_2$-$T_1$) de 16 ms dando uma área hachurada de aproximadamente 137.2 mJ. Então, a energia elétrica dissipada no plasma é calculada como 8.6 W.

A espectroscopia de emissão óptica (OES) foi usada para caracterizar as principais espécies de plasma na faixa de UV-visível de 200-500 nm. Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro de emissão óptica (Ocean Optics USB4000, Ocean Insights, Rockster, NY, EUA) com resolução de 1,5 nm. O software OceanView (OceanView Software, Ocean Insights, Rockster, NY, EUA) foi usado para adquirir o espectro óptico. Conforme mostrado na **Figura 10d**, o espectro de emissão óptica do plasma de ar contém as espécies NH, $N_2$ e OH, que vêm do ar atmosférico Chiappim et al. (2021).

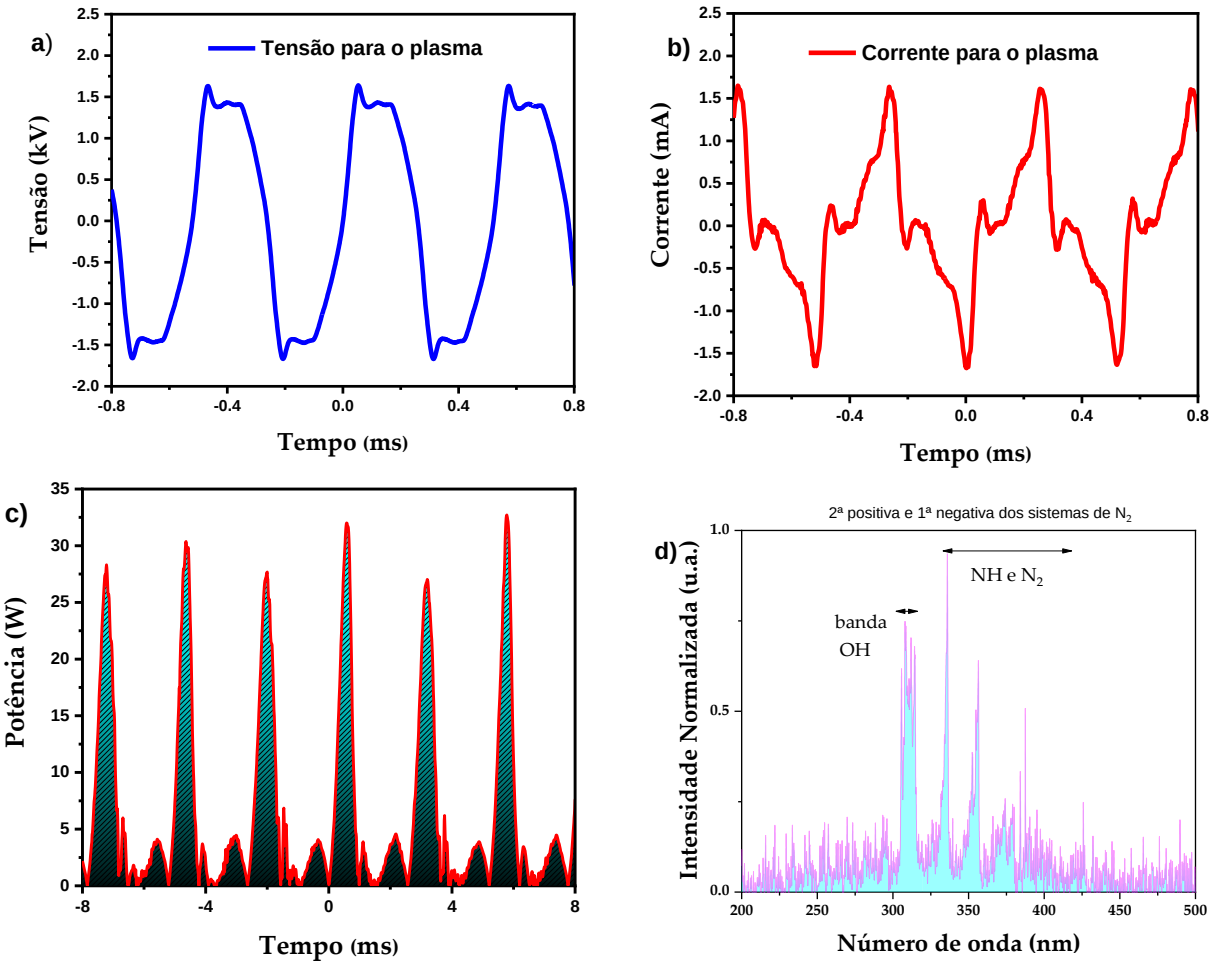


**Figura 10. (a)** Formas de onda da tensão do gliding arc; **(b)** forma de onda da corrente do gliding arc; **(c)** potência da descarga de plasma do gliding arc usado para calcular a potência média através dos gráficos 2a e 2b com o auxílio da equação 1; e **(d)** espectro OES de jato de plasma de arco deslizante operando com fluxo de ar de 5 $L.min^{-1}$.

Fonte: Chiappim et al., 2021.

### 4.2.1. Parâmetros do processo de tratamento por plasma não térmico

Os parâmetros do processo de tratamento por PNT no complexo de espécies de *F. graminearum* para este experimento estão apresentados na Tabela 4, e estes foram selecionados de acordo com a metodologia previamente descrita por Chiappim et al., (2021).

**Tabela 4.** Parâmetros do processo para os experimentos com PNT.

| **Parâmetro do Processo** | ***Glidind Arc* (GA)** |
|---|---|
| Potência (W) | 8,6 |
| Frequência de operação (KHz) | 20 |
| Tipos de gases | Ar Comprimido |
| Fluxo de gases (L/min) | 5,0 |
| Distância bocal – porta amostras (cm) | 3,0 |

Fonte: Chiappim et al., 2021.

## 4.3. Efeito do plasma não térmico nos fungos *F. graminearum* e *F. meridionale*

### 4.3.1. Preparo do inóculo

Os fungos foram inoculados, separadamente, em Ágar Batata (PDA) e mantidos sob iluminação contínua durante 15 dias em 5 placas de Petri (150 x 20mm). Após este período, a superfície da colônia formada foi levemente raspada com bisturi estéril e o micélio aéreo transferido para um tubo contendo 20 mL de água destilada estéril. A contagem de esporos foi realizada em Câmara de Neubauer e a concentração da suspensão final ajustada para 1 x $10^8$ esporos/mL. Posteriormente, a suspensão de esporos foi transferida para o meio PDA, para o crescimento por 10 dias. Para a realização dos experimentos posteriores, fragmentos de 7x7mm foram retirados com auxílio de bisturi, a partir de uma distância de 2,5 cm da região central da cultura crescida em PDA (placas de 150 x 20mm).

### 4.3.2. Efeito do plasma não térmico no complexo de espécies do *Fusarium graminearum*

O efeito do PNT no crescimento fúngico foi avaliado conforme metodologia proposta por Phan et al. (2019), com modificações. Após o crescimento fúngico, conforme descrito no item 4.3.1, fragmentos de 7x7 mm foram transferidos para o centro de uma placa de Petri contendo PDA para avaliar o efeito do PNT em diferentes tempos de exposição. Foram avaliados os tratamentos: a) controle positivo (fragmento sem tratamento); b) controle negativo (sem contaminação fúngica); c) tratamentos com PNT em 5, 10 e 15 min. Os experimentos foram realizados em triplicata. Posteriormente, o crescimento radial foi analisado. Para tanto, as placas foram incubadas à 25 ºC por 15 dias e, a taxa de crescimento radial avaliada, de acordo com o método descrito por Patriarca et al. (2001). Medidas diárias de dois diâmetros em ângulo reto das colônias foram plotadas contra o tempo, e as taxas de crescimento radial (mm / dia).

### 4.3.3 Efeito do plasma não térmico na viabilidade celular no CEFG - Microscopia confocal

Para investigar o potencial dos tratamentos com plasma frio na indução da morte celular nos isolados do CEFG, indicadores de viabilidade celular (laranja de tiazol/TO e iodeto de propídeo/PI) foram utilizados, conforme metodologia descrita por Braschi et al. (2018) e Rocha et al. (2013). O corante TO é permeável para células viáveis e não-viáveis, enquanto o PI é permeável apenas para células não-viáveis. O tratamento de 15 minutos foi selecionado para realizar este experimento, pois observou-se o efeito fungicida para *F. meridionale* e fungistático para *F. graminearum* até o 5º dia de crescimento. Após o tempo de exposição, o micélio fúngico foi removido do meio de cultura e transferido para microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, 300 µL de solução de tampão fosfato PBS foi adicionada. A suspensão foi agitada e centrifugada (12.000 RPM/15 min.) e a lavagem realizada novamente. Em seguida, 50 µL foram transferidos para outro microtubo e os corantes adicionados (3 µL do TO a 42 µmol/L e 1 µL do PI a 4,3 mmol/L). As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 II, no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD-UNICAMP), para a leitura da coloração por TO, os

comprimentos de onda para excitação e emissão foram de 514 e 525-564 nm, respectivamente. Para o PI a excitação e emissão foram 543 e 608-704 nm, respectivamente.

### 4.4. Avaliação das amostras de cevada tratadas por Plasma Não Térmico

Os tratamentos com PNT por 10, 20 e 30 minutos foram selecionados para avaliar a potencial redução da contaminação fúngica em amostras de cevada provenientes da região do Rio Grande do Sul. Para cada tempo (10, 20 e 30 minutos) e para o grupo controle (sem tratamento), as amostras de grãos de cevada foram analisadas em quintuplicata, totalizando 20 amostras. Posteriormente, a contagem de bolores e leveduras foi realizada a fim de verificar se houve diferença nos níveis de contaminação entre as amostras. O tratamento que apresentou diferença estatística na contagem de fungos totais foi selecionado para análise de amostras adicionais para micobiota e micotoxinas. Para o tempo de tratamento selecionado, foram analisadas um total de 20 amostras para a contagem e identificação dos fungos filamentosos isolados e quantificação das micotoxinas DON e D3G.

#### 4.4.1. Avaliação da microbiota dos grãos de cevada

Para o isolamento e contagem da microbiota fúngica das amostras controle e dos tratamentos por PNT, foi utilizado o meio de cultura / PDA, de acordo com Silva et al. (2010), com algumas modificações. De cada amostra de cevada foram retirados aproximadamente 10 g, que foram moídos e transferidos para 10 ml de água peptonada estéril. Após agitação por três minutos, 1 ml foi transferido para 9 ml de água destilada estéril e diluições sucessivas foram realizadas até $10^{-3}$. Em seguida, 0,1 ml de cada diluição, foram transferidos para placas de Petri contendo meio PDA, em triplicata. As placas foram então, incubadas por 7 dias à 25 ºC e as contagens, em log de UFC/mL, realizadas (Leslie; Summerell, 2006; Pitt; Hocking, 2009). As colônias pertencentes aos diferentes tipos morfológicos serão classificadas em nível de gênero de acordo com Pitt e Hocking (2009). Foram contadas as colônias identificadas como *Fusarium graminearum* e os valores convertidos para o log da contagem.

### 4.4.2. Análise de DON e D3G

As amostras foram preparadas utilizando o método QuEChERS. Cinco gramas de grãos de cevada foram triturados e homogeneizados com 10 ml de ácido fórmico (0,1%) + 10 ml de acetonitrila. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação por 20 min a 250 rpm. Posteriormente, 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl foram adicionados, agitados e as amostras centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. Após este processo, 0,5 ml da mistura foram retirados e diluídos em 0,5 ml de água deionizada. As amostras foram filtradas em microfiltro de nylon (0,2 µm) (Bolechová et al. 2015; Iwase et al., 2020).

As análises cromatográficas foram baseadas no método descrito por Arraché et al., (2018). O método foi ajustado para a validação apropriada no laboratório em que as análises foram conduzidas (Laboratório de Micotoxinas e Ciência dos Alimentos – LAMCA, Universidade Federal do Rio Grande). Tricotecenos do tipo B foram determinados por HPLC (Shimadzu) composto por auto-injetor SIL-20AHT, coluna GEMINI 5µm C18 110A (4,6 x 250 mm), fase móvel: água ultrapura e acetonitrila (30:70) modo de eluição isocrático, bomba LC-20 AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20AC (30ºC), controlador CBM-20A e *software* LC SOLUTION-SHIMADZU, detecção em 220nm e volume de injeção de 20 µL.

#### 4.4.2.1 Validação do método

Linearidade e parâmetros de calibração foram baseados em oito pontos na curva de calibração. Análise da recuperação foi realizada em triplicata com os padrões das micotoxinas nas mesmas faixas de concentrações da curva de calibração em três dias diferentes, sendo o desvio padrão relativo (DPR) utilizado para avaliar a precisão. A recuperação foi de 70 - 120% para todas as micotoxinas (DON e D3G) - 90%.

O limite de detecção (LOD) foi determinado através da concentração mínima detectada com sinal 3x acima do ruído, bem como o limite de quantificação (LOQ) 10x acima do ruído. Os valores encontram-se na Tabela 5**.**

A seletividade foi avaliada através do tempo de retenção do analito e da pureza do pico através do detector de arranjo de diodos. As soluções de

calibração matriciais foram preparadas em 3 diferentes níveis de quantidades de amostra com água: 1:2, 1:4 e 1:8 (v / v) e comparadas com o padrão de calibração das soluções em solvente. A quantificação foi realizada com base em gráficos de calibração usando a área de pico da transição mais intensa do analito (Arraché et al., 2018).

**Tabela 5.** LOD (3x sinal do ruído) e LOQ (10x sinal do ruído) para desoxinivalenol e desoxinivalenol 3-glicosídeo das amostras de cevada, através do método CLAE e detecção por DAD.

| Micotoxina | LOD (µg/Kg) | LOQ (µg/Kg) |
|---|---|---|
| DON | 15 | 62,5 |
| D3G | 15 | 62,5 |

Legenda: LOD= limite de detecção; LOQ= limite de quantificação; DON= desoxinivlenol; D3G desoxinivalenol 3 glicosídeo.

Fonte: Elaboração da autora.

## 4.5 Análise estatística dos dados

As análises foram realizadas no Excel (Microsoft Office). O método de análise de variância (ANOVA) usando o teste de Tukey foi conduzido para os resultados de crescimento fúngico nos meios de cultura e nas amostras de cevada. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a relação tempo de tratamento pelo plasma frio / contagem de colônias.

## 5. Resultados e Discussão

Estudos recentes, relataram que a exposição prolongada de micro-organismos a espécies reativas produzidas pelo plasma frio, possui efeitos antimicrobianos, comprovando a eficácia do tratamento com plasma (Los A, et al., 2018).

Os fungos sob tratamento com plasma, sofrem intensas reações de elétrons ou íons e por este motivo, esporos ou membranas e componentes da parede celular sofrem danos (Selcuk et al., 2008) e fitas de DNA podem ser quebradas pela radiação UV, resultando então, em efeitos fungicidas e/ou fungistáticos.

### 5.1 Avaliação dos efeitos do tratamento com plasma de ar comprimido no CEFG

Para a avaliação dos efeitos inibitórios no crescimento radial após do tratamento com plasma de ar comprimido no CEFG sob os tempos de exposição determinados (5, 10 e 15 minutos), foram realizadas medidas diárias do crescimento radial dos fungos *F. meridionale* e *F. graminearum* à 25ºC por 15 dias. Foi obtido como resultado, um efeito fungistático na espécie *F. meridionale*, sob a exposição nos tempos de 5 e 10 minutos por aproximadamente 5 dias e, posteriormente, observou-se crescimento fúngico até o 15º dia. No entanto, observou-se um efeito fungicida no tempo de 15 minutos, com ausência de crescimento de *F. meridionale* por 15 dias. Já a espécie *F. graminearum*, apresentou-se ser mais resistente ao tratamento com plasma, demonstrado pelo efeito fungistático em todos os tempos de tratamento. Por este motivo, o tratamento por 20 min foi adicionado e o fungo não demonstrou crescimento pelo período de 15 dias (dados não demonstrados). **Figura 11** e **Figura 12**, mostram tais efeitos nos fungos que ocorrem naturalmente na cevada, *F. meridionale* e *F. graminearum*.

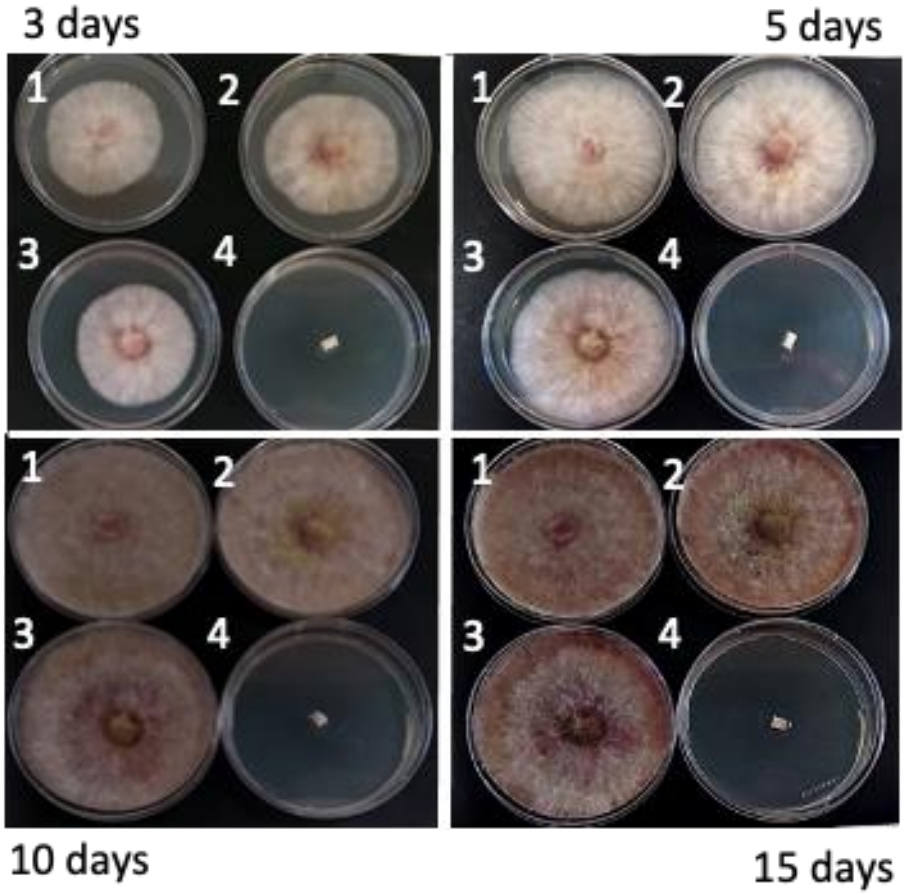


**Figura 11.** Crescimento do fungo *F. meridionale*, após tratamento com PNT nos tempos de 5, 10 e 15 minutos. 1-Controle Positivo; 2 - 5 min.; 3 - 10 min; 4 - 15 min.

Fonte: Elaboração da autora.

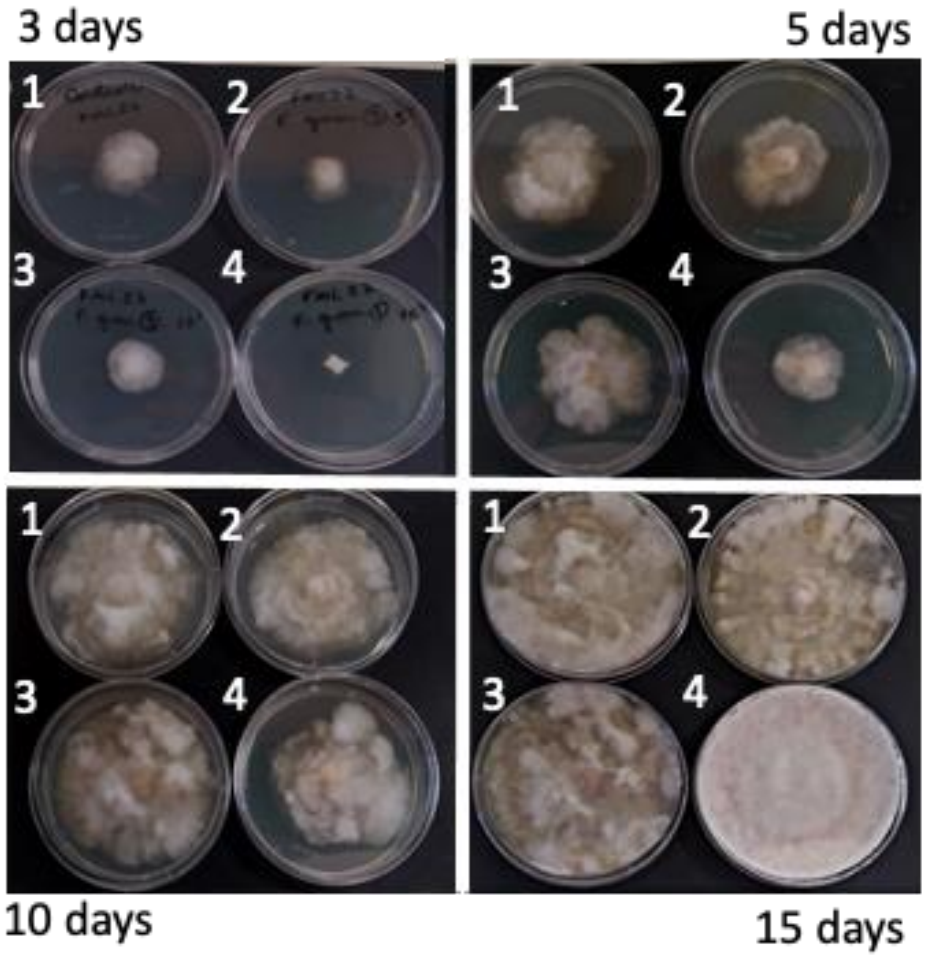


**Figura 12**. Crescimento do fungo *F. graminearum*, após tratamento com PNT nos tempos de 5, 10 e 15 minutos.1-Controle Positivo; 2 - 5 min.; 3 - 10 min; 4 - 15 min.

Fonte: Elaboração da autora.

Os efeitos inibitórios do tratamento com plasma de ar comprimido no CEFG, pode ser mais eficaz conforme aumenta gradualmente o tempo de tratamento com PNT. De uma maneira geral, na **Figura 13** e **Figura 14** abaixo, demostram a média de tais efeitos no CEFG.

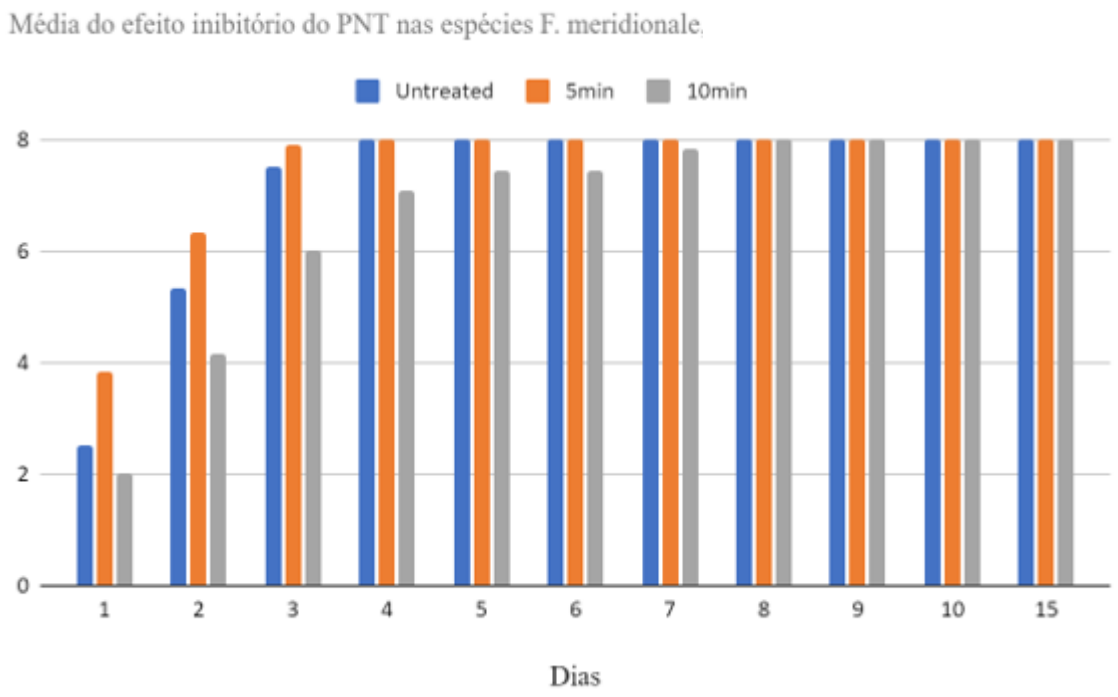


**Figura 13.** Efeito do PNT no crescimento radial médio de *F. meridionale*, após o tratamento por 5 e 10 minutos.

Fonte: Elaboração da autora.

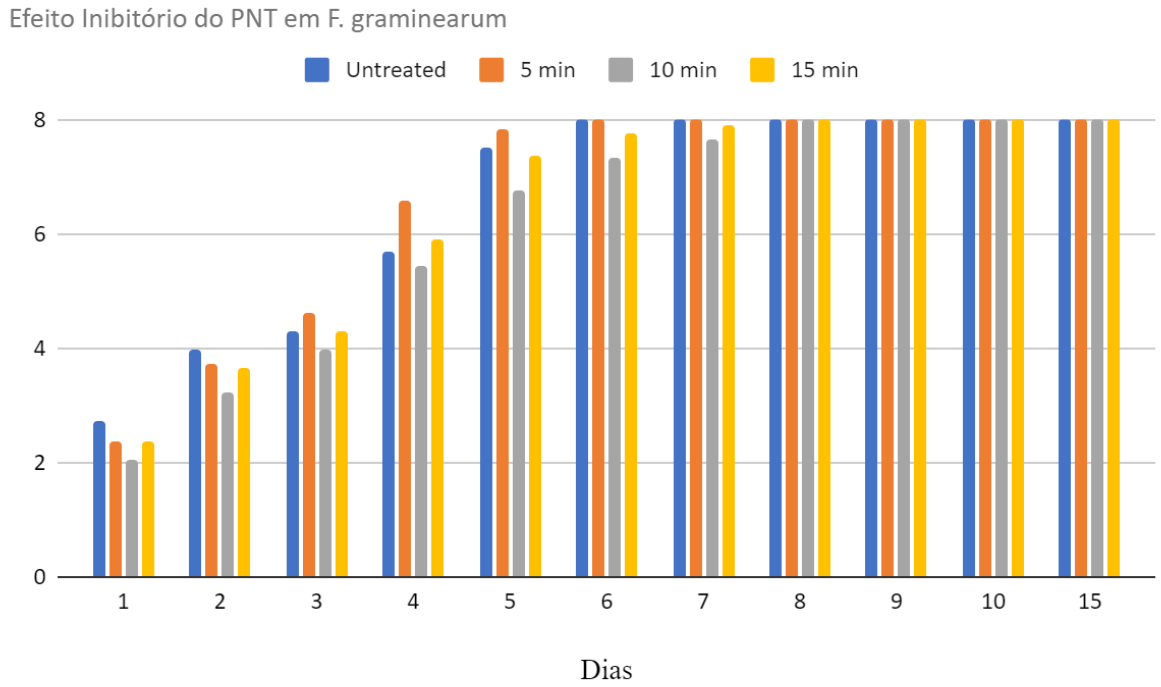


**Figura 14.** Efeito do PNT no crescimento radial médio de *F. graminearum*, após o tratamento por 5, 10 e 15 minutos.

Fonte: elaboração da autora.

Estudos anteriores relataram resultados semelhantes aos obtidos, ressaltando o de Go et al, 2019, que obteve uma inibição de 100% de *F. oxysporum*, após exposição ao plasma frio por 90 segundos.

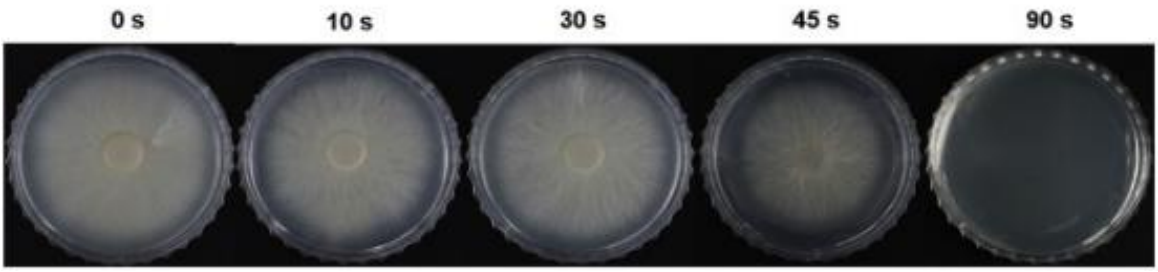


**Figura 15**. Tratamento de plasma em *F. oxysporum.*

Fonte**:** Go et al., 2019.

Jo et al., 2014, relataram o efeito inibitório após o tratamento com plasma sob o fungo *Fusarium fujikuroi*, causador da doença bakanae em arroz e obtiveram resultados efetivos, pela observação da inibição de mais de 92% do crescimento fúngico após a exposição por 120 segundos.

De uma maneira geral, esses resultados demostram a eficácia do tratamento com plasma na inibição do crescimento fúngico, podendo ser uma alternativa para o controle da deterioração de frutas, vegetais e cereais após a colheita.

### 5.2 Avaliação do efeito do PNT na viabilidade celular das espécies *F. meridionale* e *F. graminearum*

Fungos podem sofrer apoptose, exibindo características como condensação nuclear, translocação de fosfatidilserina do lado citoplasmático para o lado extracelular da membrana plasmática, fragmentação de DNA e o aumento de níveis de ROS (espécies reativas de oxigênio). Vários métodos podem ser utilizados para analisar células apoptóticas, e a microscopia confocal é considerado um deles (Semighini & Harris, 2010).

Por meio da microscopia confocal, verificou-se o efeito do tratamento do PNT na viabilidade celular de *F. meridionale* e *F. graminearum* no tempo de 15 minutos, com os indicadores de viabilidade celular laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), sendo o primeiro responsável por penetrar células viáveis e não viáveis e, o segundo, apenas células não viáveis. *F. meridionale* demonstrou-se mais susceptível ao tratamento com PNT, conforme já observado pelo crescimento radial do fungo. Na análise utilizando-se os corantes de viabilidade celular, observou-se morte das hifas, conforme demonstrado pela total coloração com PI após o tratamento de 15 min (**Figura 16**). *F. graminearum*, que apresentou uma resistência ao tempo tratado, exibindo menos fluorescência PI comparado com a fluorescência TO em verde (**Figura 17**). As imagens 16 e 17, demonstram os resultados obtidos.

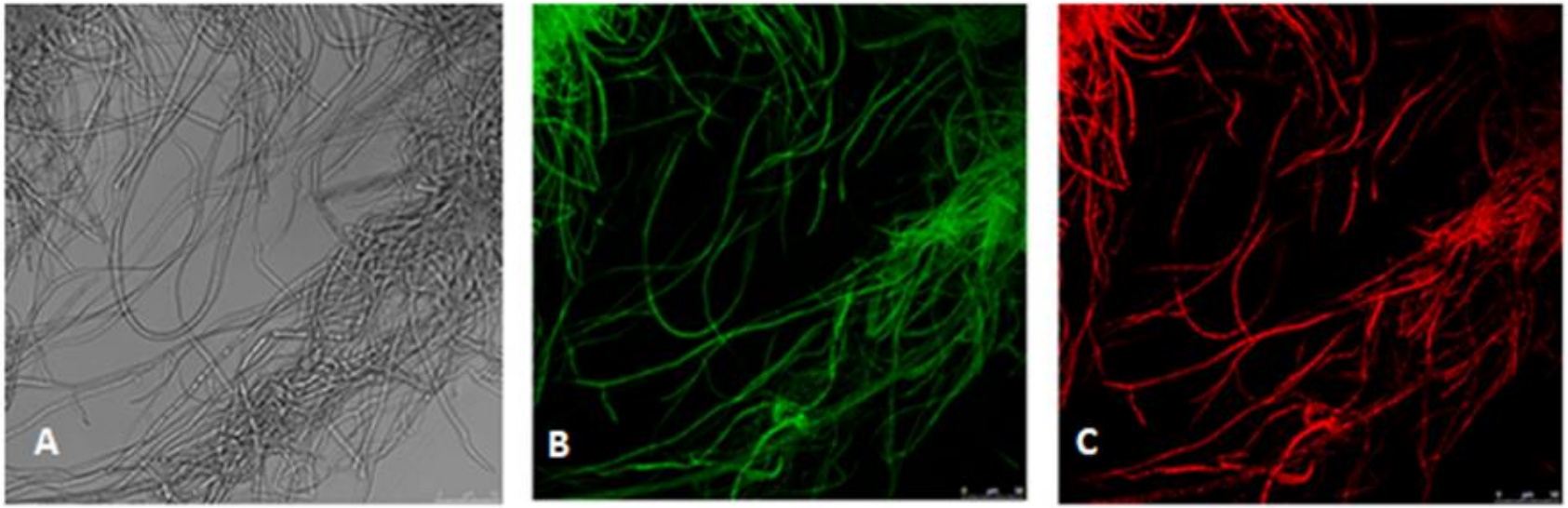


**Figura 16.** Efeito do PNT na viabilidade celular de *F. meridionale.* Verde: laranja de tiazol (TO), Vermelho: iodeto de propídeo (PI). a) visualização no microscópio ótico (aumento de 40x), b) visualização no canal para TO (aumento de 40x), demonstrando células viáveis e não viáveis; c) visualização no canal para PI (aumento de 40x), demonstrando apenas as células não viáveis.

Fonte: Elaboração da autora.

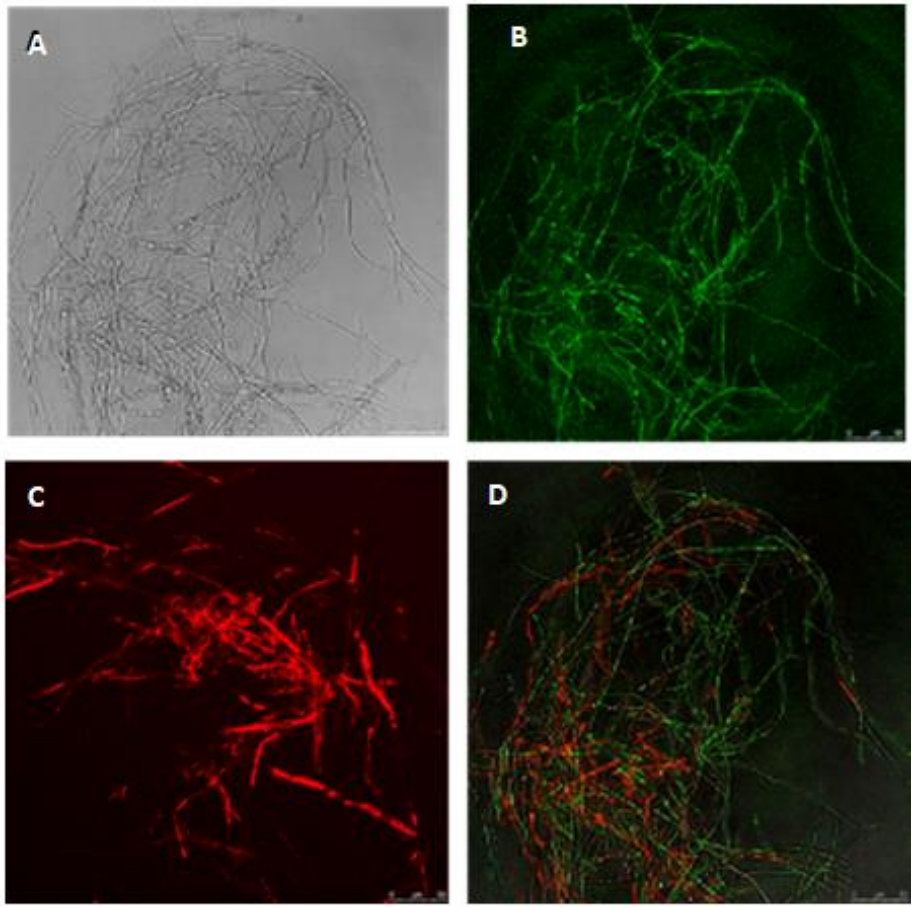


**Figura 17.** Efeito do PNT na viabilidade celular de F. graminearum. Verde: laranja de tiazol (TO), Vermelho: iodeto de propídeo (PI). a) visualização no microscópio ótico (aumento de 40x), b) visualização no canal para TO (aumento de 40x), demonstrando células viáveis e não viáveis; c) visualização no canal para PI (aumento de 40x), demonstrando apenas as células não viáveis; d) visualização nos canais para TO e PI, demonstrando as diferentes marcações entre as células viáveis e não viáveis.

Fonte: Elaboração da autora.

Estudos anteriores relataram o efeito do PNT na viabilidade celular de algumas espécies fúngicas. Nesse contexto, Panngom et al., 2014 aplicou o plasma de argônio para controlar *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici,* causador de doença em tomate. Após a exposição, obtiveram redução das taxas de germinação de esporos, indicando morte ou estase. Para confirmar tal efeito, os esporos foram corados com PI e observados por microscopia de fluorescência, demonstrando morte celular após o tratamento nos tempos de 5 e 10 minutos de exposição ao plasma.

Os resultados obtidos, podem estar associados com as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) formadas pelo plasma, pois em fungos, ROS em alto nível pode afetar o desenvolvimento de hifas e diferenciação de conídios e corpos de frutificação. Já o óxido nítrico (NO), age como uma importante molécula sinalizadora nas células vivas, regulando a apoptose, esporulação, resistência a doenças, desenvolvimento sexual e metabolismo secundário. Com uma diversidade funcional, as espécies reativas podem ser usadas para alterar diversas situações biológicas (Panngom et al., 2014).

### 5.3. Efeito do PNT na micobiota dos grãos de cevada, com enfoque no CEFG

As amostras de grãos de cevada submetidas ao tratamento por PNT, foram expostas a três tempos: 10, 20 e 30 minutos sob movimento de rotação contínuo. Estes tempos de exposição foram selecionados, baseando-se nos resultados obtidos para o crescimento radial e viabilidade celular.

Nas amostras não tratadas com PNT, observou-se elevada contaminação fúngica, em ordem decrescente: leveduras, CEFG, *Alternaria* e *Aspergillus* (Tabela 6). Observou-se uma leve redução das contagens após o tratamento de 10 minutos, porém sem diferença estatística ($p > 0,05$). Foi detectada uma redução de aproximadamente 1log UFC/g após o tratamento de 20 minutos para a contagem total de fungos, leveduras e CEFG ($p < 0,05$). Observou-se diferença significativa nas contagens entre as amostras controle e o tratamento de 20 minutos, para todos os fungos encontrados ($p < 0,05$). Após o tratamento de 30 minutos, observou-se a redução de 2log UFC/g para a contagem total de fungos, leveduras e *Alternaria* ($p < 0,05$), o restante dos fungos permaneceram com as contagens semelhantes, mas significativamente menores do que as amostras não tratadas ($p < 0,05$) (**Tabela 6**).

Com relação ao CEFG, observou-se que foi o segundo fungo com maior contagem nas amostras antes do tratamento pelo PNT. A ordem de contaminação foi mantida após os tratamentos, com exceção do tempo de 20 minutos, em que se observou contaminação em ordem decrescente por leveduras, *Alternaria,* CEFG e *Aspergillus.*

**Tabela 6**. Micobiota (média do log UFC/g) de grãos de cevada naturalmente contaminadas por fungos filamentosos, após o tratamento com PNT pelos períodos de 10, 20 e 30 min. Letras iguais significa que não houve diferença estatística entre os tratamentos e letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

| | Contagem total (log UFC/g) | Leveduras (log UFC/g) | *Alternaria* spp. (log UFC/g) | CEFG (log UFC/g) | *Aspergillus* spp. (log UFC/g) |
|---|---|---|---|---|---|
| Grãos não tratados | $5,92^{a}$ | $5,90^{d}$ | $3,38^{g}$ | $2,85^{j}$ | $1,08^{l}$ |
| 10 min. | $5,62^{a}$ | $5,61^{d}$ | $2,32^{h}$ | $2,85^{j}$ | $0,54^{m}$ |
| 20 min. | $4,73^{b}$ | $4,73^{e}$ | $1,88^{i}$ | $1,67^{k}$ | $0,62^{m}$ |
| 30 min. | $3,42^{c}$ | $3,26^{f}$ | $1,53^{i}$ | $1,75^{k}$ | $0,52^{m}$ |

Fonte: Elaboração da autora.

Os grãos de cevada estavam colonizados naturalmente por outras espécies de fungos filamentosos e leveduras, além do CEFG. Vale destacar, que o tratamento pelo período de 20 minutos foi suficiente para reduzir pelo menos 1log UFC/g para quase todos os fungos isolados, exceto para *Aspergillus spp*, pois antes do tratamento já havia pouco contaminação por esse gênero. Com relação ao CEFG, observou-se diferença significativa na média das contagens após o tratamento de 20 minutos, sendo que houve um leve aumento da contagem entre os tratamentos de 20 e 30 minutos ($p > 0,05$). Baseando-se nos resultados obtidos, apesar da maior redução da contaminação por leveduras no período de 30 minutos, resultando em maior redução para a contagem total de fungos, observou-se praticamente a mesma contagem para os fungos filamentosos entre os tratamentos de 20 e 30 minutos. Sendo que, nas condições testadas, o tempo de 20 minutos foi considerado o mais adequado para o controle de fungos filamentosos, incluindo o CEFG.

Estudos anteriores, demonstraram o efeito do plasma frio na microbiota de diversos grãos. Zahoranová et al. (2018) observaram redução da contaminação por bactérias e fungos (*Aspergillus flavus, Alternaria alternata* e *Fusarium culmorum*) em milho após tratamento com plasma de ar ambiente de pressão atmosférica frio gerado por Descarga Coplanar de Barreira de Superfície Difusa (DCSBD), resultando em inativação de bactérias no tempo de exposição ao plasma de 60 segundos e 180 segundos para fungos filamentosos.

Kordas et al. (2015) relataram também uma redução de células fúngicas viáveis após o tratamento com plasma frio. Selcuk et al. (2008), também relataram inibição significativa da contaminação por *Aspergillus* spp. e *Penicillum* spp em grãos de trigo usando PNT. O efeito antimicrobiano desta fonte de plasma usando $SF_6$ e ar nos fungos filamentosos das amostras estudadas, foi contínuo durante 20 minutos, resultando em reduções microbianas adequadas por um fator de $10^4$ do valor inicial. Após isso, o efeito inibitório permaneceu estável.

O plasma de ar comprimido equivale a muitos componentes, incluindo radicais livres e partículas carregadas, sendo uma ótima fonte de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS, RNS), como O, $O_2$ *, $O_3$, OH*, NO, $NO_2$, assim como a radiação UV (Zahoranová et al. 2018) Como já mencionado anteriormente, as espécies reativas desempenham uma interação plasma-superfície muito importante, promovendo os efeitos antimicrobianos. No caso das sementes/grãos, há uma necessidade de mais estudos sobre o potencial efeito protetor da matriz alimentar na sobrevivência dos

bolores e leveduras, bem como das propriedades da superfície da semente/grão (por exemplo, resistência e dureza), não dependendo apenas da configuração da fonte de plasma, das propriedades do plasma e das condições de geração do plasma.

## 5.4. Perfil de contaminação por DON e D3G nos grãos de cevada tratados com PNT

A **Tabela *7*** demonstra o perfil de contaminação por DON e D3G em 20 amostras de cevada naturalmente contaminadas que foram posteriormente tratadas com o plasma frio pelo período de 20 minutos. Essas 20 amostras foram selecionadas, pois continham níveis elevados de DON (Iwase et al., 2020) e algumas amostras continham níveis detectáveis de D3G (Tabela 7) e, o tratamento de 20 minutos com plasma frio foi selecionado devido ao melhor resultado para o controle do CEFG.

**Tabela 7.** Níveis de DON e D3G em amostras de cevada naturalmente contaminadas e após o tratamento por PNT (20 minutos). LOQ: limite de quantificação; ND: não detectado.

| Amostras | Amostras naturalmente contaminadas | | Amostras tratadas com PNT (20 min) | | Redução (%) | Aumento (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | DON | D3G | DON | D3G | DON | DON |
| 1 | 828,38 | 35,000 | 258 | 930 | 69 | ND |
| 2 | 554,835 | 20,000 | 599 | 1050 | ND | 8 |
| 3 | 261,1 | 15,000 | 332 | 800 | ND | 27 |
| 4 | 1292,63 | 15,000 | 373 | 460 | 71 | ND |
| 5 | 1836,205 | <LOQ | 409 | 1090 | 78 | ND |
| 6 | 2131,13 | <LOQ | 404 | 1090 | 81 | ND |
| 7 | 897,765 | <LOQ | 400 | 2450 | 55 | ND |
| 8 | 1174,58 | <LOQ | 450 | 570 | 62 | ND |
| 9 | 873,245 | 15,000 | 292 | 510 | 67 | ND |
| 10 | 2074,41 | <LOQ | 230 | 1980 | 89 | ND |
| 11 | 1732,66 | <LOQ | 460 | 930 | 73 | ND |
| 12 | 1572,01 | 39 | 380 | 840 | 76 | ND |
| 13 | 880,305 | 22 | 870 | 420 | 1 | ND |
| 14 | 674,455 | 21 | 690 | 400 | ND | 2 |
| 15 | 1062,855 | 32,1 | 520 | 300 | 51 | ND |
| 16 | 1945,175 | <LOQ | 660 | 1110 | 66 | ND |
| 17 | 1896,99 | 84,1 | 464 | 300 | 76 | ND |
| 18 | 554 | 15 | 740 | 350 | ND | 34 |
| 19 | 871,145 | 15 | 595 | 810 | 32 | ND |
| 20 | 1240,615 | <LOQ | 222 | 850 | 82 | ND |

Fonte: Elaboração da autora.

Nossos resultados demonstraram redução da contaminação por DON entre 1,2% e 89%, sendo que 14 amostras (70%) apresentaram redução da contaminação acima de 50%. Em quatro amostras, observou-se um aumento nos níveis de DON, entre 2% e 33% (**Tabela *7***). Este aumento pode ser parcialmente explicado pela conversão de D3G a DON, uma vez que estas quatro amostras apresentaram contaminação natural por D3G em níveis detectáveis.

A redução dos níveis de DON na maioria das amostras, como demonstrado na tabela 7, indica que a aplicação do PNT pode ser eficiente para a mitigação de DON, no entanto, estudos posteriores, relacionando a redução de DON com os compostos formados após o tratamento com PNT são necessários. Em contrapartida, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de D3G nas amostras tratadas pelo PNT, indicando que uma das moléculas potencialmente formadas corresponde ao D3G.

É importante ressaltar que, D3G pode se reconvertido a DON pelas enzimas digestivas, o que pode ocasionar um aumento da exposição total ao DON pelos indivíduos que consomem o alimento contaminado por D3G (Freire & Sant´Ana, 2018). Estudos anteriores demonstraram a contaminação por DON e D3G em cevada (Lancova et al., 2008; Maul et al., 2012), sendo observada uma correlação entre a redução de DON e formação de D3G em plantas hospedeiras e durante o processamento dos alimentos (Maul et al., 2012). Ademais, um único estudo demonstrou que amostras de cevada contaminadas por DON e D3G sofreram redução significativa nos níveis de ambas as micotoxinas, após o tratamento com PNT (Havelka et al., 2019).

Kříž et al., (2015) tiveram resultados eficazes na redução de concentração de DON e D3G em sementes de cevada para malte usando dois tipos de plasma: plasma gerado por micro-ondas de baixa pressão e plasma de pressão atmosférica de descarga de arco deslizante. As cevadas foram expostas ao tratamento de ambos os plasmas por 4 min e resultaram em cerca de 80% e 50% de reduções para as concentrações de DON, respectivamente. O tratamento também foi eficaz para D3G e a toxina T2, mas a taxa de desativação da toxina dependeu do tipo de toxina e do equipamento de plasma.

## 6. Conclusão

Com base nos resultados encontrados neste estudo, o plasma não térmico de arco deslizante demonstrou o potencial de reduzir a carga fúngica nos grãos de cevada naturalmente contaminados por fungos e micotoxinas, com redução de 1log UFC/g dos representantes do CEFG. Ademais, houve redução dos níveis de DON nas amostras, podendo ser considerado uma estratégia para o controle de DON em grãos. No entanto, observou-se um aumento de D3G nas amostras, indicando a potencial conversão de DON para D3G. Estudos posteriores serão necessários para identificação das micotoxinas modificadas formadas após o tratamento com PNT em cevada, bem como outras matrizes alimentares, a fim de determinar o uso desta técnica para a mitigação de micotoxinas na indústria de alimentos.

## 7. Referências Bibliográficas

Alexandre, A. P. S., *et.al*. Ozone treatment to reduce deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) contamination in wheat bran and its impact on nutritional quality. **Food Additives & Contaminants**: Part A, 35(6), 1189–1199, 2018.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/> Acesso em 16 ago de 2020.

Aguirre, D. B. Advances in cold plasma applications for food safety and preservation. Estados Unidos: **Elsevier**, 2020.

Amini, M.; Ghoranneviss, M. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (Juglans regia L.) cultivars during storage. **LWT**, v. 73, p. 178–184, 2016.

Andrade, P. D. **Micotoxinas em cereais e seus produtos: Desenvolvimento de método analítico e avaliação do risco da exposição na dieta.** Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2016.

Andretta et al. Alimentação de leitoas pré-púberes com dietas contendo zearalenona. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1227-1233, 2008.

Arraché, E. R.; Fontes, M. R.V.; Buffon, J. G.; Badiale-Furlong, E.. Trichothecenes in wheat: Methodology, occurrence, and human exposure risk. **Journal of Cereal Science,** 82(129-137), 2018. doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.015.

Ashtiania, et al. Impact of gliding arc plasma pretreatment on drying efficiency and physicochemical properties of grape, v. 63, 2020**. Innovative Food Science & Emerging Technologies**

Barbosa,C. B. **Micoflora e ocorrência de micotoxinas em grãos de trigo recém colhidos e armazenados**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2014**.**

Basaran, P.; Basaran-Akgul, N.; Oksuz, L. Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. **Food Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 626–632, 2008.

Bastos, D. C. **Estudo da redução da hidrofilicidade de filmes biodegradáveis de amido de milho termoplástico com e sem reforço de fibra de bananeira através do tratamento por plasma de SF6**. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 97, 2010

Braghini, R., et.al. Effects of gamma radiation on the growth of Alternaria alternata and on the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in sunflower seeds. **Food Microbiology**, 26(8), 927–931, 2009.

Braschi, G; Patrignani, F.; Siroli, L.; Lanciotti, R.; Schlueter, O.; Froehling, A. Flow Cytometric Assessment of the Morphological and Physiological Changes of Listeria monocytogenes and Escherichia coli in Response to Natural Antimicrobial Exposure. **Frontiers in Microbiology**, 2018. DOI10.3389/fmicb.2018.02783

Bernardi, A. O.; Stefanello, A.; Garcia, M. V.; Parussolo, G.; Stefanello, R. F.; Moro, C. B.; Copetti, M. V. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. **LWT**, v. 97, p. 25 – 30, 2018.

Bettiol, W. Controle de Doenças de Plantas com Agentes de Controle Biológico e outras Tecnologias Alternativas. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds) **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. p. 191 -279. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003.

Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perpectivas. Cap 1 **Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil**, p. 7-14. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

Bettiol W. & Morandi, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perpectivas. In Lopes, R. B. Cap 2 **A Indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microorganismos no Brasil**, p. 15-28 Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perpectivas. In Zuchhi, T. D. & Melo, I. S. Cap 5 **Controle Biológico de Fungos Aflatoxigêncios**, p. 68-84 Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

Brennan, C.S; et. al.; Cultivar differences in modification patterns of protein and carbohydrate reserves during malting of barley. **Journal of Cereal Science**, v. 26, p. 83-93. 1997.

Cast,2003. Mycotoxins:Risks in plant, animal and human systems. Report No.139.**Council of Agricultural Science and Technology**,Ames,Iowa,USA

Chiappim et al. Antimicrobial Effect of Plasma-Activated Tap Water on Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Candida albicans. **Water,** v. 13, ed. 11, 2021.

Choudhari AK, Kumari P (2010) Management of mycotoxin contamination in preharvest and postharvest crops: present status and future prospects. **J Phytology** 2:37–52

Conab, Companhia Nacional de Abastecmento. Disponível em <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em 16 fev. 2021.

Cordain, L. Simopoulos Ap (ed): **Evolutionary Aspects of Nutrition and Health. Diet, Exercise, Genetics and Chronic Disease**. World Rev Nutr Diet. Basel, Karger, v. 84, p. 19-73,1999.

Critzer, F. J.; KELLY-WINTENBERG, K.; SOUTH, S. L.; GOLDEN, D. A. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2290 – 2296, 2007.

Dasan, B. G., Boyaci, I. H., & Mutlu, M. Inactivation of aflatoxigenic fungi (Aspergillus spp.) on granular food model, maize, in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system. **Food Control**, 70, 1–8, 2016.

Desjardins, A..**Fusarium mycotoxins: Chemistry, genetics and biology**. American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA. p. 268, 2006.

Doria, A. C. O. C; Figueira, F. R.; Lima, J. S. B.; Figueira, J. A. N.; Castro, A. H. R.; Sismanoglu, B. N.; Petraconi, G.; Maciel, H. S.; KhourI, S.; Pessoa, R. S. Inactivation of *Candida albicans* biofilms by atmospheric gliding arc plasma jet: effect of gas chemistry/flow and plasma pulsing. **Plasma Research Express**, v. 1, 2019.

Dührkop, K.; Fleischauer, M.; Ludwig, M.; Aksenov, A. A.; Melnik, A. V.; Meusel, M.; Dorrestein, P. C.; Rousu, J.; Böcker, S. Sirius 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, v. 16, p. 299 – 302, 2019.

Ekezie, F.-G C., et.al. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, 69, 46–58, 2017.

EMBRAPA. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Árvore do conhecimento: Cevada. Euclydes Minella. Brasília, DF, 2022.

Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cevada brasileira: situação e perspectiva. **Circular Técnica 23**, ISSN 1517- 4964. Passo Fundo – RS, dezembro, 1999.

Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Doenças na Cultura do Milho. **Circular Técnica 83**, ISSN 1679-1150. Sete Lagoas – MG, dezembro, 2006.

Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1595001/cevada-verde> Multimídia: Banco de Imagens, 2014.

Esibyan, E. Plasma-arcequipment. Moscow: **Mir Publishers**, p. 151, 1978.

European Commission. Regulation n° 1881/2006 of 19 December. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off J Eur U L 364:5 2006.

Fontanelli, R. S., Rendimento e valor nutirtivo de cereais de inverno de duplo propósito: forragem verde e silagem ou grãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2116-2120, 2009.

Freire, L. & Sant'Ana, A.S. Micotoxinas modificadas: uma revisão atualizada sobre sua formação, detecção, ocorrência e efeitos tóxicos. **Food and Chemical Toxicology**, v.111, p. 189-205, 2018.

Freire et al., Da uva ao vinho: Destino da ocratoxina A durante o processo de vinificação dos vinhos tinto, rosé e branco e a presença de derivados de ocratoxina nos produtos finais. **Food Control**, v.113, 2020.

Gavahian, M.; Cullen, P. J. Cold plasma as an emerging technique for mycotoxin-free food: efficacy, mechanisms, and trends. **Food Reviews International**, v. 36, n. 2, p. 193 - 214, 2020.

Gertner et al. **Influência da fumonisina sobre a respostaimunológica de aves: revisão bibliográfica.** Revista Acadêmica Ciência Animal, v. 6, n. 3, p. 401-411, jul./set. 2008.

Go et al. Antifungal effect of non-thermal atmospheric plasma and its application for control of postharvest *Fusarium oxysporum* decay of paprika. **Food Control,** v. 98, pages 245-252, 2019**.**

Guzel-Seydim, Z. B.; Greene, A. K.; Seydim, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453 – 460, 2004.

Havelka, Z., Běláková, S., Bohatá, A., Hartman, I., Kábelová, H., Kříž, P., Benešová, K., Dienstbier, M., Bartoš, P., & Špatenka, P. (2019). The effect of low-temperature plasma discharge on mycotoxin content in barley and malt. **KVASNY PRUMYSL**, 65(5), 158–165. https://doi.org/10.18832/kp2019.65.158

Iwase, C. H. T.; Piacentini, K. C.; Giomo, P. P.; Čumová, M.; Wawroszová, S.; Běláková, S.; Minella, E.; Rocha, L. O. Characterization of the *Fusarium sambucinum* species complex and detection of multiple mycotoxins in Brazilian barley samples. **Food Research International**, v. 136, 2020

Jans D., Pedrosa K., Schatzmayr D., Bertin G, Grenier B.; **Mycotoxin reduction in animal diets.** In: Leslie JF, Logrieco AF (eds) Mycotoxin reduction in grain chains. Wiley, Oxford, 101–110, 2014.

Jo et al. A Non-thermal Plasma Seed Treatment Method for Management of a Seedborne Fungal Pathogen on Rice Seed. **Crop Science**, v. 54, p. 796-803, 2014.

Junior et al. Ação de *Trichoderma spp*. no controle de *Fusarium sp., Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii.* **Revista Agri-Environmental Sciences**, Palmas-TO, v. 4, n. 2, 2018.

Junior et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Fitotecnia - Ciencia Rural**, v. 43, 2013.

Kabak et al. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr** 46:593–619, 2006.

Katz, S. E. **A arte da fermentação:explore os conceitos e processos essenciais da fermentação praticados ao redor do mundo**. Tradução Cristina Yamagami, ed. 1, editora Sesi-SP, 1964.

Kaushik, G. Effect of processing on mycotoxin content in grains. **Crit Rev Food Sci Nutr,** v. 55, p.1672–1683, 2015.

Khani et al. Studying the performance of dielectric barrier discharge and gliding arc plasma reactors in tomato peroxidase inactivation. **Journal of Food Engineering,** v. 197, p. 107-112**,** 2017.

Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F. *et al.* Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination**. Mycotoxin Res 32,** 179–205, 2016.

Kříž et al. Influence of Plasma Treatment in Open Air on Mycotoxin Content and Grain Nutriments. **Plasma Medicine**, vol. 5, Ed. 2-4, p. 145-158, 2015.

Kruklis, K. L.; **Cevada: Importância da utilização na alimentação humana e a aplicabilidade na gastronomia.** Monografia apresentada ao Pós graduação Lato sensu em Gastronomia Aplicada à Nutrição da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Ijuí, 2019.

Kim, J. E.; Lee, D. -U.; Min, S. C. Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. **Food Microbiology**, v. 38, p. 128 – 136, 2014

Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C., & Pandiella, S. S. Distribution of microbial contamination within cereal grains. **Journal of Food Engineering**, 72(4), (2006).

Lancova,K.; Hajslova, J.; Poustka, J.; Krplova, A.; Zachariasova, M.; Dostalek, P.; Sachambula, L. Transfer of Fusarium mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer, **Food Additives and Contaminants,** 25:6, 732-744, DOI: 10.1080/02652030701779625. 2008

Leal, P da C.; Cantanhede, K de L.; Silva, L.M.; Bezerra, G.F de B.; Viana, G.M de C.; Nascimento, M do D. S. B. Micotoxinas do Fusarium e seu Potencial Carcinogênico. **NewsLab** - edição 70.2005.

Lee, K.; Paek, K. H.; Ju, W. T.; Lee, Y. Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 269 – 275, 2006.

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ames. IA: Blackwell Publishing. 2006.

Li, et al., T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. **Journal Agricuture Food Chemistral**, v. 59, p. 3441–3453, 2011.

Liu, Z., Gao, J., & Yu, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, 42(4), 468–479, 2006.

Los, A., Ziuzina, D., & Bourke, P. Current and Future Technologies for Microbiological Decontamination of Cereal Grains. **Journal of Food Science**, 83(6), 2018.

Los, A et al., Improving microbiological safety and quality characteristics of wheat and barley by high voltage atmospheric cold plasma closed processing. **Food Research International v.1**06, p. 509-521, 2018.

Kordas et al. The Effect of Low-Temperature Plasma on Fungus Colonization of Winter Wheat Grain and Seed Quality. **Polish Journal of Environment. Studies** v. 24, No. 1, p. 433-438, 2015.

Mandal, R., et.al**..Recent developments in cold plasma decontamination technology in the food industry**. Trends in Food Science & Technology, 80, 93–103, 2018.

Maul, R.; Müller, C.; Rieß, S.; Koch, M.; Methner, F.; Irene, N.. Germination induces the glucosylation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various grains. **Food Chemistry.** 131:1(274-279). 2012.

Milani J, Maleki G (2014) Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. **J Food Sci and Agric** 94:2372–2375

Milase, P.M. **Caracterização, toxidade e patogenicidade de Fusarium ssp em genótipos de soja em sistema de plantio direto**. Dissertação. (Mestrado em Agronomia) p.91. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2009.

Mir, S. A.; SHAH, M. A.; MIR, M. M. Understanding the role of plasma technology in food industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 5, p. 734–750, 2016.

Misra, N. N.; Keener, K. M.; Bourke, P.; Mosnier, J. P.; CULLEN, P. J. In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 118, n. 2, p. 177–182, 2014.

Misra, N. N., et. at, Cold Plasma for Effective Fungal and Mycotoxin Control in Foods: Mechanisms, Inactivation Effects, and Applications**.** Comprehensive Reviews in **Food Science and FoodSafety**. Vol.18, 2019.

Misra, N. N.; TIWARI, B. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; CULLEN, P. J. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 3 - 4, p. 159 – 170, 2011.

Montie, T. C.; Kelly-wintenberg, K.; Roth, J. R. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 28, n. 1, p. 41 – 50, 2000.

Moreau, M.; Feuilloley, M. G. J.; Orange, N.; Brisset, J.-L. Lethal effect of the gliding arc discharges on Erwinia spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1039 – 1046, 2005.

Müller HM (1983) Entgiftung von Mykotoxinen: II. Chemische Verfahren und Reaktion mit Inhaltsstoffen von Futtermitteln. **Übers Tierernährg** 11:47–80.

Munakata, N.; Saito, M.; Hieda, K. Inactivation action spectra of *Bacillus subtilis* spores in extended ultraviolet wavelengths (50 – 300nm) obtained with synchrotron radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 761 – 768, 1991.

Muranyi, P.; Wunderlich, J.; Heise, M. Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1535 – 1544, 2007.

O'Donnell, et.al. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, 52, 20–31,2013.

O'Donnell, Colm, *et. al*. **Ozone in Food Processing**. Wiley-Blackwell p. 312, 2012.
O'DONNELL et al., Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes support formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 6, p. 600-623, 2004.

Ouf SA, Basher AH, Mohamed AA (2015) Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of Aspergillus niger contaminating date palm fruits. **J Sci Food Agric** 95:3204–3210.

Panngom, et al., Non-thermal plasma treatment diminishes fungal viability and up-regulates resistance genes in a plant host. **Plos one**, v. 9, n. 6, p. 99300, 2014.

PARK et al. Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 9-11, p. 5733 – 5737, 2007.

Patriarca, A.; Vaamonde, G.; Pinto, V. F.; Comerio, R. Influence of water activity and temperature on the growth of *Wallemia sebi*: application of a predictive model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1 – 2, p. 61 – 67, 2001.

Patriarca & Pinto. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. **Food Science**, v. 14, p. 50–60, 2017.

Park, B. J.; Takatori, K.; Sugita-Konishi, Y.; Kim, I. -H.; Lee, M. -H.; Han, D. -W.; Chung, K. H.; Hyun, S. O.; Park, J. -C. Degradation of mycotoxins using microwave-induced

argon plasma at atmospheric pressure. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, n. 9-11, p. 5733 – 5737, 2007.

Phan, K. T. K.; Phan, H. T.; Brennan, C. S.; Regenstein, J. M.; Jantanasakulwong, K.; Boonyawan, D.; Phimolsiripol, Y. Gliding arc discharge non-thermal plasma for retardation of mango anthracnose. **LWT - Food Science and Technology**, v. 105, p. 142 – 148, 2019.

PITT, J. I. Fungal ecology and the occurrence of mycotoxins. In: NJAPAU, H.; TRUJILLO, S. (Eds.). **Mycotoxins and Phycotoxins: Advances in Determination, Toxicology and Exposure Management**. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. p. 33– 41. 2006.

Pitt, J.I. & Hocking, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3ª ed. Springer. 2009.

Piacentini, K. C. **Fungos e Micotoxinas em Grãos de Cevada *(Hordeum vulgare* L.*)* Cervejeira, Descontaminação pelo Gás Ozônio e Segurança de Cervejas Artesanais**. Florianópolis, SC, 2015.

Piacentini, K.C.; Savi, G.D.; Pereira, M.E.V.; et al*.*. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (Hordeum vulgare L.). **Food Chemistry** 187: 204–209, 2015.

Piacentini, K.C.; Rocha, L.O.; Savi, G.D.; et al*.* Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in brewing barley grains from Brazil. **Mycotoxin Research** 34: 173-178*,* 2018.

Pinheiro et al. Survey of Freshly Harvested Oat Grains from Southern Brazil Reveals High Incidence of Type B Trichothecenes and Associated Fusarium Species. **Toxins**, n.13, 2021.

Pinto, et al. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathol**, v. 33, n. 3, p. 304-306, 2007.

Rebesquini, R., et. al; **Uso de grãos de cereais de inverno na suplementação de ruminantes em sistemas de integração lavoura-pecuária (ILP).** Disponível em < www.plantiodireto.com.br/edicoes>. Edição 174, p 18 – 24, 2020.

Ribeiro, R.P, **Desenvolvimento e modelagem de uma fonte de plasma intermediário tipo arco deslizante com campo magnético e cátodo cilíndrico entalhado.** Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Físicas, com ênfase na área de Física da Matéria Condensada, 2020.

Rybecky, A. I., Chulze, S. N., & Chiotta, M. L.. Effect of water activity and temperature on growth and trichothecene production by Fusarium meridionale**. International Journal of Food Microbiology,** *285, 69–73*, 2018.

Rocha et al., Sistema de armazenamento e incidência dos principais fungos produtores de micotoxinas em grãos. **Brazilian Journal of Development,** v. 6, núm 7, 2020.

Rocha LO, Tralamazza SM, Reis GM, Rabinovitch L, Barbosa CB, et al. Multi-Method Approach for Characterizing the Interaction between Fusarium verticillioides and Bacillus thuringiensis Subsp. Kurstaki. **PLOS ONE** 16,2014. doi.org/10.1371/journal.pone.0092189

Roth, J. R. **Industrial plasma engineering**: principles. Filadélfia: Instituto de Física de Bristol,v. 1, p. 339, 1995.

Roth, S.; Feichtinger, J.; Hertel, C. Characterization of *Bacillus subtilis* spore inactivation in low-pressure, low-temperature gas plasma sterilization processes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 521 – 531, 2010.

Santos Alexandre, A. P., Vela-Paredes, R. S., Santos, A. S., Costa, N. S., Canniatti-Brazaca, S. G., Calori-Domingues, M. A., & Augusto, P. E. D.. Ozone treatment to reduce deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) contamination in wheat bran and its impact on nutritional quality. **Food Additives & Contaminants:** Part A, 35(6), 1189–1199, 2018.

Santos, J. F. **Ocorrência de desoxinivalenol em amostras de trigo e derivados de trigo.** Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização – Vigilância Laboratorial em Saúde Pública) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

Sarangapani, C., Patange, A., Bourke, P., Keener, K., & Cullen, P. J. Recent Advances in the Application of Cold Plasma Technology in Foods. **Annual Review of Food Science and Technology,** 9(1), 609–629, 2018.

Savi Bortolotto, G. D. **Estratégias de Controle e Descontaminação do Trigo em Grãos (*triticum aestivum* l.) com Relação a Fungos, Micotoxinas e Agrotóxicos utilizando Compostos Químicos e Ozônio Gasoso**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, 2014.

Schabo et. al., Mycotoxins in artisanal beers: An overview of relevant aspects of the raw material, manufacturing steps and regulatory issues involved. **Food Research International**, v. 141, 2021,

Schmale III, D.G, Bergstrom G.C. **Giberela ou Fusariose da espiga do trigo.** 2003.Disponível em <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/FusariumPort.aspx> Acesso em 27 mai 2020.

Schlüter O, Ehlbeck J, Hertel C, Habermeyer M, Roth A, Engel KH, Holzhauser T, Knorr D, Eisenbrand G) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. **Mol Nutr Food Res** 57: 920–927, 2013.

Scussel VM, Beber M, Tonon KM. (2011). **Efeitos da infecção por Fusarium/Giberella na qualidade e segurança de grãos, farinhas e produtos derivados**. In: Reis EM editor. Seminário sobre Giberella em cereais de inverno. 1st ed. Passo Fundo: Berthier; p. 131–175.

Selcuk et al., Decontamination of grains and legumes infected with Aspergillus spp. and Penicillum spp. by cold plasma treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5104–5109, 2008.

Semighini, C. P.; Harris, S. D. Methods to detect apoptotic-like cell death in filamentous fungi. **Methods in Molecular Biology**, v. 638, p. 269 – 279, 2010.

Scheidt et al., Determination of the most susceptible phenological stage of rice panicles to infection by species of *Fusarium graminearum*. **Summa Phytopathol**, v. 45, n. 3, p. 243-246, 2019.

Short, D. P. G., O'Donnell, K., Zhang, N., Juba, J. H., & Geiser, D. M. Widespread Occurrence of Diverse Human Pathogenic Types of the Fungus Fusarium Detected in Plumbing Drains. **Journal of Clinical Microbiology**, 49(12), 2011.

Sigma Aldrich. Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/32911>. Acesso em 01/03/2022.

Sindag – Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Workshop Mercado Brasileiro de Fitossanitários: Avaliação da exposição de misturadores, abastecedores e aplicadores de agrotóxicos. **Anais**. Brasília. 2009.

Sindag – Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. **Dados de produção e consumo de agrotóxicos**. 2011. Disponível em:< <www.sindag.com.br&gt>. Acesso em: 14/02/2021.

Suhem, K.; Matan, N.; Nisoa, M.; Matan, N. Inhibition of *Aspergillus flavus* on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. International **Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 107–111, 2013.

Tadei N.S., et al.; Micotoxinas de Fusarium na produção de cerveja: Características, toxicidade, incidência, legislação e estratégias de controle**. Scientia Agropecuaria** 11(2): 247 – 256, 2020.

Takeiti,C.Y. **Cevada**. Acesso em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr12ap522l.html > Disponível em 27 mai de 2020.

Tanaka, Y.; Oh, J.; Hashizume, H.; Ohta, T.; Kato, M.; Hori, M.; Ito, M. Atomic oxygen radical-induced intracellular oxidization of mould spore cells. **Plasma Processes and Polymers**. p. 1 – 8, 2020.

Tanino, T.; Arisaka, T.; Iguchi, Y.; Matsui, M.; Ohshima, T. Inactivation of *Aspergillus* sp. spores on whole black peppers by nonthermal plasma and quality evaluation of the treated peppers. **Food Control**, v. 97, p. 94-99, 2019.

Ten Bosch, L.; Pfohl, K.; Avramidis, G.; Wieneke, S.; Viöl, W.; Karlovsky, P. Plasma-Based Degradation of Mycotoxins Produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* Species. **Toxins**, 2017.

Thammaniphit, C.; Suwannarat, S.; Ruangwong, K.; Srisonphan, S. Effect of Cold Plasma on Alternaria Brassicicola Morphology and Seed Germinations. **8th International Electrical Engineering Congress** (iEECON). p. 4, 2020

Thirumdasa, et al., Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture.**Trends in Food Science & Technology**, v. 77, p. 21-31, 2018.

Tibola & Fernandes. Micotoxinas no trigo: estratégias de manejo para minimizar a contaminação. In Tibola & Fernandes. Cap 1 **Contaminação do trigo por micotoxinas**, p. 11-21 – Brasília, DF. Embrapa, 2020.

Tibola & Fernandes. Micotoxinas no trigo: estratégias de manejo para minimizar a contaminação. In Nicolli et al. Cap 2 **Espécies micotoxigênicas e as principais micotoxinas no trigo**, p. 23- 37 – Brasília, DF. Embrapa, 2020.

Tralamazza et al. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, n. 196, p. 445–450, 2016.

Vleugels, M.; Shama, G.; Deng, X. T.; Greenacre, E.; Brocklehurst, T.; Kong, M. G. Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 33, n. 2, p. 824 – 828, 2005.

Wang, Xiaoyuan et al, The degradation of Alternaria mycotoxins by dielectric barrier discharge cold plasma, **Food Control** Vol. 117, 2020.

Wang J, Ogata M, Hirai H, Kawagishi H.; **Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida YK-624***. FEMS Microbiol Lett 314:164–169, 2011.

Wishart, D. S. et al, The human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. D608 – D617, 2018.

Won, M. Y.; Lee, S. J.; Min, S. C. Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v. 39, p. 25 – 32, 2017.

Zahoranová, A.; Hoppanová, L.; Šimončicová, J.; Tučeková, Z.; Medvecká, V.; Hudecová, D.; Kaliňáková, B.; Kováčik, D.; Černák, M. Effect of cold atmospheric pressure plasma on maize seeds: enhancement of seedlings growth and surface

microorganisms' inactivation. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**. v. 38, n. 5, 2018.

Zahoranová, A.; Hoppanová, L.; Šimončicová, J.; Tučeková, Z.; Medvecká, V.; Hudecová, D.; Kaliěáková, B.; Kováčik, D.; Černák, M. Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Maize Seeds: Enhancement of Seedlings Growth and Surface Microorganisms Inactivation. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, v. 38, n. 5, 2018.

Zaragoza, O. **Mycology** (2017) Instituto de Salud Carlos III, Madrid em Reference Module in Life Sciences

Ziuzina, D.; Patil, S.; Cullen, P. J.; Keener, K. M.; Bourke, P. Atmospheric cold plasma inactivation of Escherichia coli, Salmonella enterica serovar Typhimurium and Listeria monocytogenes inoculated on fresh produce. **Food Microbiology**, v. 42, p. 109 - 116, 2014.