



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA–REDE BIONORTE**

JHONATHA BARROS CABRAL

**USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO SEGURAS
(GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS PRODUZIDAS POR
Aspergillus parasiticus NO MILHO (*Zea Mays*)**

**Palmas-TO
2024**

JHONATHA BARROS CABRAL

**USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO SEGURAS
(GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS PRODUZIDAS POR
Aspergillus parasiticus NO MILHO (*Zea Mays*)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta

**Palmas-TO
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

C117u Cabral, Jhonatha Barros.
USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO
SEGURAS (GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS PRODUZIDAS
POR *Aspergillus parasiticus* NO MILHO (*Zea Mays*). / Jhonatha Barros
Cabral. – Palmas, TO, 2024.
78 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
Biodiversidade e Biotecnologia, 2024.
Orientador: Raphael Sanzio Pimenta

1. Micotoxinas. 2. Atmosfera modificada. 3. Ácidos orgânicos. 4.
Commodity agrícola. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

JHONATHA BARROS CABRAL

**USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO
SEGURAS (GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS
PRODUZIDAS POR *Aspergillus parasiticus* NO MILHO (*Zea mays*)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia - Rede
BIONORTE, na Universidade Federal do
Tocantins, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 21/10/2024

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 RAPHAEL SANZIO PIMENTA
Data: 06/12/2024 12:09:29-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta (Orientador)
UFT

Documento assinado digitalmente
 ALBERT LENNON LIMA MARTINS
Data: 09/12/2024 11:58:42-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. Albert Lennon Lima Martins
UNITINS

Documento assinado digitalmente
 ALOISIO FREITAS CHAGAS JUNIOR
Data: 09/12/2024 13:37:34-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior
UFT

Documento assinado digitalmente
 EDUARDO ANDREA LEMUS ERASMO
Data: 09/12/2024 15:57:24-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Andrea Lemus Erasmo

Documento assinado digitalmente
 JULIANA FONSECA MOREIRA DA SILVA
Data: 09/12/2024 19:54:01-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Profª. Dra. Juliana Fonseca Moreira da Silva
UFT

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Jhonatha Barros Cabral, autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “USO DE SUBSTÂNCIAS GERALMENTE RECONHECIDAS COMO SEGURAS (GRAS) PARA O CONTROLE DE AFLATOXINAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus parasiticus* NO MILHO (*Zea mays*)” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: Palmas, 21 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 JHONATHA BARROS CABRAL
Data: 09/10/2025 14:33:05-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Jhonatha Barros Cabral

CPF: 725.633.971-20

RG: 432.402 SSP/TO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elvecino e Welda.

As minhas filhas, Vitória, Júlia e Mariana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas bênçãos concedidas durante toda minha vida, por iluminar meu caminho e estar sempre comigo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Raphael Sanzio Pimenta, pela orientação, confiança, paciência e apoio. Muito obrigado por compartilhar comigo seus preciosos conhecimentos.

Aos meus pais, Elvecino e Welda, pelo amor, incentivo, e apoio incondicional para que eu pudesse chegar até aqui.

As minhas filhas Vitória, Júlia e Mariana, agradeço a compreensão pelos momentos em que estive ausente e a paciência por me esperarem sempre com muito carinho e amor.

A todos os meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado e são muito importantes na minha vida.

À Professora Dr^a Juliana Fonseca Moreira da Silva pelos conhecimentos compartilhados e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Joenes Mucci Peluzio que colaborou significativamente com as análises estatísticas dos dados.

À Dr^a Alessandra Maria Naoe, que também colaborou com as análises estatísticas dos dados.

À Professora Dr^a Claudia Cristina Auler do Amaral Santos, que me apoiou e autorizou o meu afastamento para cursar o doutorado.

À Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, por me possibilitarem a realização deste doutorado.

A todos os docentes do programa de Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de participação e pelo precioso tempo dedicado à leitura desse trabalho, pelas sugestões e correções apontadas.

Agradeço a todos que estiveram diretamente envolvidos e contribuíram com a realização deste trabalho.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.”

Isaac Newton

CABRAL, Jhonatha Barros. **Uso de substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) para o controle de aflatoxinas produzidas por *Aspergillus parasiticus* no milho (*Zea mays*)**. 2024. 78 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia- Rede BIONORTE) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2024.

RESUMO

O milho (*Zea mays*) é um importante alimento utilizado na alimentação humana e animal. É um cereal de grande importância econômica e cultural em todo o mundo. A contaminação por fungos causa danos a essa cultura durante a pré-colheita e pós-colheita, e, além das perdas econômicas, prejuízos à saúde humana e animal, pois alguns fungos produzem as micotoxinas, que são substâncias tóxicas. Dentre as micotoxinas, destacam-se as aflatoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus parasiticus*, produtor de aflatoxinas tipo B1, B2, G1 e G2. A aflatoxina B1 é a mais perigosa, sendo classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como substância cancerígena de classe I. O objetivo deste trabalho foi propor uma estratégia eficaz, segura e economicamente viável para controlar o *Aspergillus parasiticus* e consequentemente reduzir a quantidade de aflatoxinas produzidas. Para isto foram utilizados três ácidos orgânicos (acético, láctico e propiônico), substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS). Os ácidos foram utilizados para produzir uma atmosfera modificada para promover a inibição do crescimento fúngico. Foram realizados testes *in vitro* em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar batata dextrose, discos de 6mm do inóculo e as substâncias GRAS em três concentrações para cada substância. A leitura dos resultados foi realizada com um paquímetro digital, durante 6 dias. Todos os testes foram realizados em quintuplicata. Os resultados dos testes *in vitro* demonstraram que o ácido acético na concentração de 0,15%, bem como o ácido propiônico nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0%, conseguiram inibir totalmente o crescimento do *Aspergillus parasiticus*. Para os testes *in vivo* foram utilizados frascos de vidro com tampa, milho triturado, as substâncias GRAS ácido acético 0,15%, ácido propiônico 0,5% e uma mistura de ácido acético 0,15%/ácido propiônico 0,5% e a suspensão inoculante em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/ml. A quantificação das aflatoxinas totais foi realizada com um kit da Envirologix denominado TotalTox™ Aflatoxin nos tempos de 0, 14 e 28 dias após a inoculação. Os frascos foram preparados em quintuplicata. Quando comparados o resultado do controle no dia 0 com o do 14º dia, observou-se um aumento significativo na concentração das aflatoxinas, que aumentou em 3.110%. Já comparando-se com os resultados dos tratamentos, essa redução na concentração das aflatoxinas foi de 99.6% para o tratamento com ácido acético, 100% para o ácido propiônico e 100% para o tratamento realizado com a mistura de ácido acético/ácido propiônico. Resultados da quantificação realizada no 28º dia mostrou que comparando o controle desse período com o controle no 14º dia houve um aumento de apenas 3,6% na concentração de aflatoxinas. Já este controle comparado com os resultados dos tratamentos mostrou que o ácido acético reduziu a produção de aflatoxinas em 98,72%, o ácido propiônico reduziu em 100% e a mistura de ácido acético/ácido propiônico reduziu em 100% a concentração das aflatoxinas. De acordo com os resultados obtidos no teste *in vivo* os tratamentos aplicados podem ser propostos como tratamento de escolha para o controle do fungo e consequente redução das aflatoxinas.

Palavras-chave: Atmosfera modificada; Micotoxinas; Ácidos orgânicos; *Commodity* agrícola.

CABRAL, Jhonatha Barros. **Use of substances generally recognized as safe (GRAS) for the control of aflatoxins produced by *Aspergillus parasiticus* in corn (*Zea mays*)**. 2024. 78 p. Thesis (PhD in Biodiversity and Biotechnology - BIONORTE Network) - Federal University of Tocantins, Palmas, 2024.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays*) is an important food source used for both human and animal consumption. It is a cereal of great economic and cultural significance worldwide. Fungal contamination causes damage to this crop during pre-harvest and post-harvest stages and, beyond economic losses, poses risks to human and animal health, as some fungi produce mycotoxins, which are toxic substances. Among these mycotoxins, aflatoxins stand out, produced by the fungus *Aspergillus parasiticus*, which generates aflatoxins of types B1, B2, G1, and G2. Aflatoxin B1 is the most dangerous and is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a Group 1 carcinogen. The aim of this study was to propose an effective, safe, and economically viable strategy to control *Aspergillus parasiticus* and consequently reduce the amount of aflatoxins produced. To achieve this, three organic acids (acetic, lactic, and propionic) were used, substances generally recognized as safe (GRAS). The acids were employed to create a modified atmosphere to inhibit fungal growth. *In vitro* tests were conducted on Petri dishes containing potato dextrose agar culture medium, 6mm inoculum discs, and the GRAS substances at three concentrations for each acid. Results were measured using a digital caliper over a period of six days. All tests were performed in quintuplicate. The *in vitro* results demonstrated that acetic acid at a concentration of 0.15%, as well as propionic acid at concentrations of 0.5%, 0.75%, and 1.0%, completely inhibited the growth of *Aspergillus parasiticus*. For *in vivo* tests, glass jars with lids, crushed corn, GRAS substances (acetic acid 0.15%, propionic acid 0.5%, and a mixture of acetic acid 0.15%/propionic acid 0.5%), and an inoculum suspension at a concentration of 1.0×10^6 conidia/mL were used. Total aflatoxin quantification was performed using an Envirologix kit named TotalTox™ Aflatoxin at 0, 14, and 28 days post-inoculation. The jars were prepared in quintuplicate. When comparing the control results on day 0 with those on day 14, a significant increase in aflatoxin concentration was observed, rising by 3,110%. However, when compared to the treatment results, reductions in aflatoxin concentrations of 99.6% were achieved with acetic acid treatment, 100% with propionic acid, and 100% with the acetic/propionic acid mixture. Results from quantifications performed on day 28 showed that when comparing the control from this period with the control on day 14, there was an increase of only 3.6% in aflatoxin concentration. Comparing this control with the treatment results showed that acetic acid reduced aflatoxin production by 98.72%, while propionic acid and the acetic/propionic acid mixture reduced aflatoxin concentrations by 100%. According to the *in vivo* test results, the applied treatments can be proposed as the treatments of choice for controlling the fungus and consequently reducing aflatoxins.

Keywords: Modified atmosphere; Mycotoxins; Organic acids; Agricultural commodity.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Métodos de prevenção e descontaminação de aflatoxinas na cadeia produtiva de alimentos e rações.....	25
Figura 2 - <i>Aspergillus parasiticus</i> em placa de Petri.....	38
Figura 3 - Crescimento radial (CR) do <i>Aspergillus parasiticus</i> em função do tempo para o ácido acético e ácido láctico.....	47
Figura 4 – Crescimento radial (CR) em função do tempo para as diferentes concentrações utilizadas das substâncias GRAS no controle de <i>Aspergillus parasiticus</i>	48
Figura 5 - Resultado do crescimento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> aos 6 dias após incubação. (A) Controle; (B1) Ácido acético 0,05%; (B2) – Ácido acético 0,10%; (B3) Ácido acético 0,15%; (C1) Ácido láctico 0,5%; (C2) Ácido láctico 0,75%; (C3) Ácido láctico 1,0%; (D1) Ácido propiônico 0,5%; (D2) Ácido propiônico 0,75%; (D3) Ácido propiônico 1,0%.	49
Figura 6 - Fluorescência das aflatoxinas produzidas por <i>Aspergillus parasiticus</i> em ágar coco. (A) 24h após a inoculação; (B) 72h após a inoculação; (C) 144h após a inoculação.	51
Figura 7 - Tempo de permanência viável do <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Tratamento com 14 dias; (B) Controle com 14 dias; (C) Tratamento com 28 dias; (D) Controle com 28 dias.....	53
Figura 8 - Frascos contendo milho com 14 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.	57
Figura 9 - Figura 9 - Vista aproximada dos frascos contendo milho com 14 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.	58
Figura 10- Frascos contendo milho com 28 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.	59
Figura 11 - Vista aproximada dos frascos contendo milho com 28 dias após a inoculação de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético/ Ácido propiônico.....	60
Quadro 1 - Microrganismos e substratos utilizados para a produção de ácido propiônico.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características das substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) utilizadas no experimento.....	39
Tabela 2 - Substâncias GRAS e respectivas concentrações testadas <i>in vitro</i> de acordo com os limites máximos permitidos pela legislação vigente no Brasil.	39
Tabela 3 - Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) e respectivas concentrações testadas <i>in vivo</i>	41
Tabela 4 - Análise de variância conjunta do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> na presença de três ácidos distintos (ácido acético, ácido lático e ácido propiônico) e sete tempos de incubação.	43
Tabela 5 - Médias de crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i> na presença de três diferentes tipos de ácido em três concentrações e sete tempos de incubação.	44
Tabela 6 - Viabilidade celular do <i>Aspergillus parasiticus</i> com 14 e 28 dias de incubação do teste <i>in vivo</i>	52
Tabela 7 - Médias de concentrações de aflatoxinas em amostras de milho contaminadas com <i>Aspergillus parasiticus</i> (0, 14 e 28 dias), após tratamento com as substâncias GRAS.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivo geral.....	17
1.2 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Micotoxinas	18
2.2 <i>Aspergillus parasiticus</i>	19
2.2.1 Aflatoxinas	20
2.2.2 Formas de Controle	24
2.3 Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS).....	26
2.3.1 Ácido acético	28
2.3.2 Ácido lático	31
2.3.3 Ácido propiônico	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Testes <i>in vitro</i>	38
3.1.1 Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS)	38
3.1.2 Inibição de crescimento do <i>Aspergillus parasiticus</i>	39
3.1.3 Detecção das aflatoxinas em ágar coco	40
3.2 Teste <i>in vivo</i>	40
3.2.1 Inoculação do <i>Aspergillus parasiticus</i> no milho	40
3.2.2 Tempo de permanência viável.....	41
3.2.3 Quantificação das aflatoxinas.....	41
3.3 Análise estatística.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Testes <i>in vitro</i>	43
4.1.1 Inibição do crescimento de <i>Aspergillus parasiticus</i>	43
4.2 Testes <i>in vivo</i>	51
4.2.1 Tempo de permanência viável.....	51
4.2.2 Quantificação das aflatoxinas.....	53
5 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

A contaminação provocada por fungos e suas micotoxinas é um grave problema na agricultura e na indústria de alimentos e tem o potencial de gerar grande impacto sobre a saúde humana e a economia global. Na produção agrícola o milho (*Zea mays*) é uma importante *commodity* para diversos países produtores e é uma das principais culturas afetadas por doenças pós-colheita. A história do milho moderno começa no início da agricultura humana, onde hoje é o México, com a prática da reprodução seletiva por antigos agricultores (GSLC, 2017).

Trata-se do cereal mais produzido (GÓMEZ-SALAZAR *et al.*, 2021) e é muito importante na dieta humana onde é consumido cozido ou em forma de produtos processados, além de ser amplamente utilizado na composição da fabricação de rações para animais devido às suas qualidades nutricionais, pois ele possui alto teor de fibras, carboidratos e proteínas, e é importante também por ser um alimento de baixo custo, o que o torna bastante acessível (SULTANA *et al.*, 2015).

O Brasil é o segundo maior exportador mundial de milho, exportou na safra 2021/2022 cerca de 44 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos Estados Unidos que exportou 62 milhões de toneladas. Nesta mesma safra a produção mundial de milho foi de 1.21 bilhões de toneladas, tendo os Estados Unidos como o país líder em produção com cerca de 383 milhões de toneladas produzidas, seguido pela China em segundo lugar com a produção de 272 milhões de toneladas e em terceiro lugar o Brasil com 116 milhões de toneladas (USDA, 2022). Estes números evidenciam a importância econômica desta *commodity* para o Brasil.

De acordo com o décimo levantamento do acompanhamento da safra de grãos 2021/2022 feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) o Brasil teve acréscimos, em relação à safra 2020/2021, de 8,6% em área plantada, de 22% em produtividade, e de 32,8% em produção (CONAB, 2022).

Ao longo dos anos o milho tem sido aprimorado através de melhoramento genético e técnicas de seleção que resultam em variedades mais produtivas e mais resistentes a doenças, contudo as doenças pós-colheita provocadas por fungos ainda são um grande desafio para a produção e o armazenamento do grão. O milho e produtos derivados dele são suscetíveis a contaminação fúngica (KORTEI *et al.*, 2021) e essa contaminação causa a deterioração (KOUCHESFAHANI *et al.*, 2015; YOGENDRARAJAH *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016; REBONATTO *et al.*, 2018).

As contaminações fúngicas ocorrem principalmente nos cereais, como o milho, mas também ocorrem em frutas, hortaliças e derivados (MATEO *et al.*, 2017). Tais contaminações

são responsáveis por perdas econômicas significativas em todo o mundo (PIZZOLITTO *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2017) e ocorrem nas diversas etapas que envolvem a produção: desde o campo, transporte, armazenamento até o processamento (REBONATTO *et al.*, 2018). Estima-se que os fungos patogênicos sejam responsáveis por 20% das perdas ocasionadas na produção de alimentos em todo o mundo, o que totaliza aproximadamente 125 milhões de toneladas de produtos anualmente, quantidade suficiente para alimentar mais de 600 milhões de indivíduos por ano (BANGAR *et al.*, 2021).

Além das perdas econômicas significativas que são geradas e da instabilidade provocada na segurança alimentar em todo o mundo, alguns fungos oferecem também riscos para a saúde animal e humana, pois tem o potencial de produzir micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, principalmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* (ZAHHA *et al.*, 2023) e contaminam predominantemente cereais tanto no período pré-colheita quanto no pós-colheita (SILVA *et al.*, 2015; ZEIDAN *et al.*, 2018; GIZACHEW *et al.*, 2019).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) 25% da produção de cereais do mundo é drasticamente contaminada por micotoxinas (PRIESTERJAHN *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2022). As micotoxinas tem limite máximo tolerado em alimentos estabelecido por legislações específicas em países de todo o mundo e a sua durabilidade é um grande problema de segurança especialmente em países pobres (FARAJI *et al.*, 2022).

Dentre todas as micotoxinas, as aflatoxinas são as que causam maior preocupação em termos de incidência em alimentos e rações por conta de sua toxicidade para humanos e animais (MATEO *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2020). Estima-se que cerca de 5 bilhões de pessoas em todo o mundo são afetadas pela contaminação por aflatoxinas pelo consumo de alimentos contaminados (WEE *et al.*, 2016). As aflatoxinas são produzidas principalmente por três espécies de fungos: *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus nomius* (SILVA *et al.*, 2015; POK *et al.*, 2020).

Mais de 20 tipos de aflatoxinas são conhecidas, sendo as mais comuns e importantes a B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2), e sua prevalência em alimentos, como o milho, e seu potencial carcinogênico, mutagênico, hepatotóxico, imunossupressor e teratogênico que as fazem mais importantes do que os outros tipos (HACKBART *et al.*, 2014; SULTANA *et al.*, 2015; POK *et al.*, 2020; SHABEER *et al.*, 2022). Essas aflatoxinas são denominadas assim devido a sua fluorescência sobre luz ultravioleta, onde se apresentam na

cor azul as AFB1 e AFB2 e na cor verde as AFG1 e AFG2 (DEVI *et al.*, 2017; ACHUGBU *et al.*, 2022).

A AFB1 é a mais perigosa, pois é um agente altamente cancerígeno, e foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como substância cancerígena Classe I (IARC, 2012), enquanto as AFB2, AFG1 e AFG2 são classificadas como possíveis substâncias cancerígenas e podem potencializar o efeito da AFB1 (HACKBART *et al.*, 2014). O nível de toxicidade das aflatoxinas segue a seguinte ordem: AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 (ZAHUJA *et al.*, 2023).

Devido ao grande potencial tóxico, diversos países vêm implementando legislações restritas para prevenir a contaminação por aflatoxinas em alimentos e rações. Em países que compõem a União Europeia a legislação estabelece o limite máximo de 2µg/kg de AFB1 e 4µg/kg de aflatoxinas totais em cereais e produtos derivados de cereais (AGHAMOHSENI *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2022). Já nos Estados Unidos o limite máximo estabelecido é de 20µg/kg de aflatoxinas em cereais e derivados (KUMAR *et al.*, 2021; SHABEER *et al.*, 2022).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Instrução Normativa de Nº160 de 2022, estabelece os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Nesta instrução ficou estabelecido que para o milho, milho em grão inteiro, partido, amassado ou moído, farinhas ou sêmolos de milho o limite máximo tolerado é de 20µg/kg (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) (ANVISA, 2022).

Além dos riscos à saúde humana e animal a ocorrência de aflatoxinas em alimentos e rações traz perdas econômicas, principalmente para países exportadores (FARGHL *et al.*, 2023), a contaminação por aflatoxinas provoca deterioração qualitativa e quantitativa nos alimentos que consequentemente levam a desvalorização do alimento no mercado nacional e internacional, a redução da aceitação pelos consumidores, a diminuição da quantidade disponível para consumo e a necessidade de métodos de intervenção no período pré-colheita e pós-colheita (GÓMEZ-SALAZAR *et al.*, 2021; TIWARI *et al.*, 2022).

As aflatoxinas são a razão principal de rejeição de vários alimentos importados pela União Europeia (DÖVÉNYI-NAGY *et al.*, 2020). Somente nos Estados Unidos as aflatoxinas causam anualmente uma perda econômica de U\$923 milhões na indústria dos grãos (HASSAN *et al.*, 2020).

As aflatoxinas são estruturas complexas com alta estabilidade química e térmica, o que aumenta o risco de exposição, visto que elas não podem ser eliminadas durante o processamento dos alimentos na indústria, no cozimento ou durante a pasteurização (HASSAN *et al.*, 2020; BULUT *et al.*, 2020; FARAJI *et al.*, 2022; ASGHAR *et al.*, 2022). Isto evidencia o problema

causado e diante deste se faz necessário o emprego de novos métodos e ferramentas que não tragam efeitos indesejados, como a alteração das características físicas, químicas e nutricionais dos alimentos expostos ao tratamento.

O controle da produção das aflatoxinas é um desafio complexo que envolve abordagens desde o cultivo através da implementação de boas práticas agrícolas até métodos de controle de doenças pós-colheita com a prática da secagem e armazenamento adequados dos grãos. Entre os diversos caminhos para o controle das aflatoxinas na cadeia de produção de alimentos e ração estão inseridas duas categorias principais que são: a prevenção da contaminação e do crescimento fúngico e a desintoxicação dos produtos contaminados (FARGHL *et al.*, 2023).

Os tratamentos desenvolvidos para inibição do crescimento fúngico e diminuição da produção de micotoxinas incluem métodos físicos, tratamentos químicos e agentes de controle biológico (DEVI *et al.*, 2017; FOUAD *et al.*, 2019). Porém o uso de fungicidas sintéticos ainda é o principal meio de controle, o que não é o ideal, por causa dos efeitos colaterais sobre a saúde humana e animal, a poluição ambiental e o desenvolvimento de cepas resistentes (MANYES *et al.*, 2015; FARGHL *et al.*, 2023).

Diante deste contexto pode-se acrescentar também o aumento do interesse em alimentos que sejam seguros para o consumo humano e animal. E para que isso aconteça é necessário identificar e estabelecer métodos seguros para controlar e minimizar a contaminação dos alimentos por fungos produtores de aflatoxinas, substituindo o uso total ou parcial dos defensivos agrícolas. Neste sentido desponta o uso das substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), que são substâncias amplamente utilizadas na indústria de alimentos por serem reconhecidas cientificamente como seguras para o consumo e que podem atuar na manutenção da qualidade dos alimentos, como agentes de controle de contaminação por fungos e consequentemente reduzir a produção de aflatoxinas produzidas.

De acordo com REBONATTO *et al.* (2018), dentre as diversas classes de substâncias GRAS temos os ácidos orgânicos que atuam como conservantes e são amplamente utilizados no setor industrial devido a eficiência e baixo custo, sendo capazes de garantir a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos alimentos, dos quais podemos citar o ácido acético, ácido láctico e o ácido propiônico.

As três substâncias GRAS foram utilizadas no presente estudo com o intuito de prolongar a vida de prateleira do milho pela inibição de crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus* durante o período de pós-colheita e consequentemente reduzir a concentração de aflatoxina, evitando as perdas econômicas e reduzindo a possibilidade dos danos provocados à

saúde, de humanos e animais, pelo consumo de milho e seus derivados contaminados por aflatoxinas.

1.1 Objetivo geral

Propor um método para o controle de doença pós-colheita provocada pelo fungo *Aspergillus parasiticus* com consequente redução na concentração de aflatoxinas que seja eficaz, seguro e economicamente viável, utilizando substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS).

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro*, em ambiente com atmosfera modificada, a capacidade inibitória das substâncias GRAS ácido acético, ácido lático e ácido propiônico frente ao fungo *Aspergillus parasiticus*;
- Visualizar a produção de micotoxinas pelo *Aspergillus parasiticus* em ágar coco;
- Determinar quais concentrações das substâncias GRAS testadas apresentaram melhor efeito inibitório sobre o crescimento *in vitro* do *Aspergillus parasiticus*;
- Avaliar *in vivo* a eficácia das substâncias GRAS ácido acético, ácido propiônico e a mistura de ácido acético com ácido propiônico na redução da concentração de aflatoxinas produzidas pelo *Aspergillus parasiticus*;
- Propor um método para a inibição de crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus* que seja alternativo ao uso de fungicidas sintéticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micotoxinas

A preocupação com a produção de alimentos seguros e saudáveis aumentou em todo o mundo durante as últimas décadas, assim como tem aumentado o percentual de detecção de alimentos contaminados por microrganismos que colocam a saúde dos consumidores em risco (DEVI *et al.*, 2017). E dentre os alimentos contaminados temos os que entram no grupo das *commodities*, que são de grande importância econômica e amplamente utilizadas como alimento para consumo humano e animal. A falta de condições adequadas de pré-colheita, armazenamento e pós-colheita podem predispor estes grãos à contaminação por fungos produtores de micotoxinas (BOCATE *et al.*, 2019). Além das *commodities*, diferentes micotoxinas são comumente encontradas em frutas, nozes, legumes, café e especiarias (BANGAR *et al.*, 2021).

A palavra micotoxina deriva do grego “*mykes*”, que significa fungo, e do latim “*toxicum*”, que significa tóxico ou veneno (AGRIOPOULOU *et al.*, 2020). As micotoxinas são compostos químicos sintetizados como metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular produzidos por fungos que podem contaminar alimentos e rações (PANKAJ *et al.*, 2018; GIZACHEW *et al.*, 2019; CONTE *et al.*, 2020; LORÁN *et al.*, 2022).

Sua biossíntese depende da espécie de fungo envolvido e da interação de alguns fatores entre si, tais fatores são: composição do substrato, da fonte de carbono e nitrogênio disponíveis, da temperatura e atividade da água, pH, umidade, agentes bioativos e do tempo de incubação ou armazenamento (LEITE *et al.*, 2021; ZAHHA *et al.*, 2023). Elas não podem ser detectadas a olho nu, sendo vistas sob luz ultravioleta (UV) e não possuem odor característico nem provocam alterações no sabor dos alimentos. (AGRIOPOULOU *et al.*, 2020).

Das mais de 300 micotoxinas conhecidas, as de maior relevância na agricultura são as aflatoxinas produzidas por *Aspergillus* spp., ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., fumonisinas e tricotecenos tipo A (HT-2 (HT-2) e toxina T-2 (T-2)) e tricotecenos tipo B produzidas por *Fusarium* spp., além de patulina por *P. expansum*. (CONTE *et al.*, 2020; ALKUWARI *et al.*, 2022). E abordando mais especificamente o milho, as principais micotoxinas encontradas são as aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FUM), tricotecenos tipo A e tipo B zearalenona (ZEA), zearalenol, moniliformina, beauvericina e fusaproliferinas (TARAZONA *et al.*, 2020).

Essas toxinas transitam pelos diferentes níveis da pirâmide alimentar, tem efeito *carry-over*, e estão presentes em todas as etapas da cadeia agroalimentar onde seus efeitos negativos

são mais graves nas culturas agrícolas e explorações leiteiras devido às perdas na safra, na perda de rentabilidade da produção, na sanidade animal e na segurança dos produtos (LEITE *et al.*, 2021). Além disso elas causam grandes preocupações, pois representam perigo para a saúde humana e animal (LORÁN *et al.*, 2022; FARGHL *et al.*, 2023), e nas últimas décadas os casos de micotoxicose aumentaram consideravelmente devido ao consumo de alimentos contaminados com um tipo ou mais de micotoxinas, e isso acaba afetando também a sustentabilidade do agronegócio (KUMAR *et al.*, 2022).

Está provado que algumas micotoxinas têm efeito carcinogênico, mutagênico, teratogênico e imunossupressor (PANKAJ *et al.*, 2018; HANVI *et al.*, 2019; MØLLER *et al.*, 2021). As principais vias de exposição incluem a respiratória, cutânea e oral e a severidade da micotoxicose depende de fatores como o grau de exposição, toxicidade da micotoxina, estado nutricional e da idade do indivíduo, bem como de possíveis efeitos sinérgicos com outras substâncias químicas às quais possam estar expostos (LORÁN *et al.*, 2022).

A micotoxicose é a doença resultante da exposição às micotoxinas, e é classificada como aguda ou crônica, e o maior risco para humanos e animais é em consequência da exposição alimentar crônica. Esta doença tem efeitos colaterais nos diferentes órgãos e os sintomas clínicos incluem vômito, diarreia, hemorragia, dor no peito, dificuldade respiratória, bolhas, fadiga, dor de cabeça e podem levar até a morte (CONTE *et al.*, 2020; AGRIOPOULOU *et al.*, 2020).

2.2 *Aspergillus parasiticus*

Os fungos são parte natural e encontram-se amplamente dispersos no meio ambiente. Podem ser isolados do solo, de resíduos vegetais ou do ar (HOPPANOVÁ *et al.*, 2022). Eles têm capacidade de se adaptar e colonizar diversos substratos e representam um grande desafio para a segurança alimentar, pois atuam na deterioração de alimentos e podem trazer risco a saúde e impactos na economia (ZAHHA *et al.*, 2023).

O gênero *Aspergillus* contém quatro subgêneros e 339 espécies (SHABEER *et al.*, 2022), pertence à família Aspergillaceae, à classe Ascomycetes e à subclasse Euascomycetae (HOUBRAKEN *et al.*, 2011). Considerando os atuais sistemas de classificação morfológica e filogenética, o gênero *Aspergillus* inclui seis espécies de interesse econômico que são divididas em 2 grupos. O primeiro grupo inclui o *Aspergillus parasiticus*, o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus nomius*, espécies estas produtoras de micotoxinas chamadas aflatoxinas, que são consideradas um grande problema para saúde humana e animal quando consumidas.

No segundo grupo estão incluídas as espécies domesticadas *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus tamarii*, que são utilizadas no processo de fermentação de alimentos (HEDAYATI *et al.*, 2007; Godet e Munat, 2010). O *Aspergillus parasiticus*, pertencente ao primeiro grupo de interesse, é responsável pela produção de aflatoxinas em produtos alimentícios tais como o amendoim, o milho e outros cereais (MEHMOOD *et al.*, 2021).

Sua reprodução é assexuada e caracteriza-se pela produção de fiálides e conídios em cadeia. Seus conídios são esféricos com paredes grossas e ásperas e a sua cor varia entre o amarelo-esverdeado, verde-oliva ou verde escuro (ALKUWARI *et al.*, 2022). A fácil dispersão dos conídios é uma forte característica dessa espécie e as estruturas reprodutivas produzem grandes quantidades de conídios que são leves e podem se adaptar a diferentes ambientes, mesmo com poucos recursos como água, luz e nutrientes.

Outra estrutura características desta espécie de fungo é o conidióforo, que é simples e termina numa vesícula onde ficam inseridas as fiálides. Algumas espécies do gênero também podem produzir células Hülle ou esclerócios, que são estruturas responsáveis pela sua sobrevivência em condições adversas (GEBRIE, 2016).

O *Aspergillus parasiticus* cresce em uma faixa de temperatura que varia entre 10°C e 43°C, com um pH ideal entre 3,5 e 8 e com a atividade da água (aw) em torno de 0,80 e 0,84. Enquanto as condições ideais para a produção de suas AFs são de uma temperatura que varia entre 12°C e 40°C, com pH ótimo próximo a 6 e com valores de atividade de água entre 0,82 e 0,87 (LEITE *et al.*, 2021). Porém estudos relatam que eles também podem crescer em uma faixa de temperatura ainda mais ampla, entre 6°C e 55°C e essa capacidade adaptativa é muito importante para a sobrevivência e dispersão do fungo demonstra vantagem sobre outros organismos em qualquer nicho ecológico (MCCORMICK *et al.*, 2010).

Existem mais de 20 aflatoxinas descritas na literatura, e cepas toxigênicas de *Aspergillus parasiticus* são responsáveis pela produção de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. Sendo essas as mais importantes devido aos seus efeitos mutagênicos, carcinogênicos, hepatotóxicos, teratogênicos e imunossupressores (IARC, 2012) e entre os fungos produtores de aflatoxinas, o *Aspergillus parasiticus* é considerado o mais disseminado e de difícil controle e verificação (PILDAIN *et al.*, 2008; LORÁN *et al.*, 2022).

2.2.1 Aflatoxinas

Entre todas as micotoxinas as aflatoxinas são as mais estudadas por pesquisadores (BUI TIMEA-CANTÚA *et al.*, 2020) e sua história começa em 1960 em Londres, na Inglaterra,

onde foram isoladas após a morte de perus que ingeriram ração contaminada, em um episódio conhecido como a “Doença X do Peru” (LUO *et al.*, 2021; MEHMOOD *et al.*, 2021; HOPPANOVÁ *et al.*, 2022). Desde então diversos estudos foram conduzidos com a finalidade de elucidar a biologia dos fungos envolvidos, entender os efeitos provocados na saúde humana e animal e de desenvolver métodos de prevenção e controle da produção das aflatoxinas.

As aflatoxinas são amplamente encontradas nas Américas, Ásia, Europa e África, mas ocorrem principalmente nas regiões subtropicais, tropicais e em regiões temperadas onde as condições de temperatura e umidade são mais favoráveis ao desenvolvimento dos fungos e a produção dessas toxinas (GROOPMAN *et al.*, 2018; DÖVÉNYI-NAGY *et al.*, 2020; GÓMEZ-SALAZAR *et al.*, 2021; FARAJI *et al.*, 2022), e segundo Asghar *et al.* (2022) nessas regiões elas se tornam uma séria ameaça à segurança alimentar.

A produção de aflatoxinas é influenciada diretamente pelo estágio de desenvolvimento do alimento contaminado, por danos causados nos alimentos seja por insetos ou por processamento, por más práticas adotadas durante a colheita, por disponibilidade de nutrientes e além destes, fatores como os elencados por Kumar *et al.* (2022), que são as mudanças climáticas, o solo e as condições de armazenamento, também exercem influência sobre o crescimento dos fungos e consequente produção de aflatoxina.

As aflatoxinas pertencem a uma classe de compostos orgânicos de natureza policíclica que tem a estrutura química similar, cuja família de compostos é chamada difuranocumarinas, onde todos tem um anel difurano e um anel cumarina (WU *et al.*, 2021), elas dividem-se em duas importantes séries de estrutura química, os difurocumarociclopentenona (AFB1 e AFB2) e os difurocumarolactona (AFG1 e AFG2) (BBOSA *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2020).

Há mais de 20 tipos de aflatoxinas descritas na literatura (LIAO *et al.*, 2020; HASSAN *et al.*, 2020) e elas são produzidas por diversas espécies de fungos incluindo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* (KUMAR *et al.*, 2021), porém os dois principais fungos produtores são o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus* (RAO *et al.*, 2019; MEKAWEY *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021; ZAHHA *et al.*, 2023). O *Aspergillus nomius* também figura como um importante produtor de aflatoxina (GIZACHEW *et al.*, 2019; POK *et al.*, 2020; KORTEI *et al.*, 2021; ASGHAR *et al.*, 2022; TIWARI *et al.*, 2022). Ainda da seção *Flavi* podem ser listados como espécies produtoras de aflatoxina o *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus parvisclerotigenus*, e o *Aspergillus bombycis*, da seção *Ochraceorosei* o *Aspergillus ochraceoroseus* e *Aspergillus rambellii* e da seção *Nidulatans* o *Emericella astellata* e o *Emericella venezuelensis* (SHABEER *et al.*, 2022). Estes fungos produtores são amplamente

distribuídos na natureza e podem ser encontrados no solo, nas plantas, em substratos orgânicos e nas sementes.

Dentre todas as espécies produtoras de aflatoxinas o *Aspergillus parasiticus* chama a atenção por ser amplamente disperso e encontrado em inúmeras culturas. (HERNANDEZ *et al.*, 2021). Ele produz AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (DEVI *et al.*, 2017; PRIESTERJAHN *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2021) e entre as 5 piores micotoxinas estas aflatoxinas são classificadas como as mais tóxicas (PANKAJ *et al.*, 2018). Os termos “B” e “G” utilizados na identificação dos grupos referem-se às cores azul e verde produzidas por aflatoxinas sob luz UV, enquanto os números “1” e “2” indicam compostos maiores e menores, respectivamente (AMAKE e KELLER, 2011; UDOMKUN *et al.*, 2017).

As AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, entre todas as aflatoxinas conhecidas, são as principais contaminantes de uma ampla variedade de alimentos e de ração animal (TIWARI *et al.*, 2022). Podem ser encontradas em: cereais (PRIESTERJAHN *et al.*, 2020; LIAO *et al.* 2020; LUO *et al.*, 2021), especiarias (GÓMEZ-SALAZAR *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021; AGHAMOHSENI *et al.*, 2022), oleaginosas (HASSAN *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2021; TIWARI *et al.*, 2022) frutas (BUTIMEA-CANTÚA *et al.*, 2020; DÖVÉNYI-NAGY *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021), leite (FARAJI *et al.*, 2022, TIWARI *et al.*, 2022; AGHAMOHSENI *et al.*, 2022), além de serem encontradas em diversos produtos derivados destes alimentos. Segundo Mehmood *et al.* (2021) os cereais e os produtos à base de cereais são os principais alimentos para o consumo humano em todo o mundo e entre os cereais a cultura do milho é umas das mais contaminadas durante a pré-colheita e a pós-colheita. Em processos que envolvem desde a produção, colheita, transporte, armazenamento até o processamento do alimento (YILMA *et al.*, 2019; KORTEI *et al.*, 2021).

As aflatoxinas geram um impacto econômico significativo em várias áreas, pois afetam a produção agrícola com consequente diminuição da quantidade de alimento disponível para o comércio, afetam o comércio nacional e internacional visto que provocam a redução do valor dos produtos no mercado, afetam a indústria de alimentos que fica sujeita a rejeição regulatória dos produtos contaminados, além de afetarem de forma direta a saúde pública pois podem provocar doenças que resultam em custos para os sistemas de saúde (ZHANG *et al.*, 2021; GÓMEZ-SALAZAR *et al.*, 2021).

De todas as micotoxinas, as aflatoxinas são consideradas as mais tóxicas e o seu consumo é associado a casos de hepatotoxicidade, teratogenicidade, imunossupressão, câncer e mutagênese em humanos e animais (CACERES *et al.*, 2020; SEGURA-PALACIOS *et al.*,

2021; FARAJI *et al.*, 2022; HOPPANOVÁ *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2022; SHABEER *et al.*, 2022).

Das aflatoxinas secretadas por *Aspergillus parasiticus*, a AFB1 é a de maior preocupação, pois é classificada como cancerígena para humanos (IARC, 2012) e é seguida em grau de importância toxicológica pelas AFG1 > AFB2 > AFG2. (VERMA, 2004; KUMAR *et al.*, 2022). Sua principal rota patogênica é a indução de carcinoma hepatocelular, um tipo de câncer com alta taxa de mortalidade. A AFB1 também é classificada como agente imunotóxico e tem sido intimamente relacionada ao crescimento prejudicado em crianças, incluindo o nanismo (ISMAIL *et al.*, 2018).

As aflatoxinas têm um mecanismo tóxico de atuação bastante complexo e quando ingerida a sua absorção acontece no trato gastrointestinal, sendo, por conseguinte, biotransformadas por enzimas hepáticas com funções oxidases. A forma ativada de AFB1 é altamente eletrofílica e as ligações ocorridas com nucleotídeos e proteínas conduz a formação de adutos de DNA, que provocam lesão bioquímica na célula (FATEMI *et al.*, 2006). Diversos tipos de carcinomas são resultados da ligação entre AFB1 e as guaninas da molécula de DNA, devido à modificação estrutural que compromete a atividade biológica deste nucleotídeo (LIN *et al.*, 2006; BULUT *et al.*, 2020). Porém os efeitos tóxicos das aflatoxinas dependem de alguns fatores como a quantidade ingerida, o tempo de exposição, a via de exposição e a susceptibilidade que cada indivíduo pode apresentar frente ao agente.

Os limites máximos tolerados para aflatoxinas em alimentos variam de acordo com normativas e regulamentos estabelecidos por cada país. Esses limites são estabelecidos para que seja garantida a segurança alimentar, bem como a proteção da saúde dos consumidores. No Brasil a regulamentação em relação à concentração de aflatoxinas permitida nos alimentos acompanha os valores estabelecidos pelo United States Food and Drug Administration (FDA), órgão regulamentador dos Estados Unidos da América.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Instrução Normativa de Nº160 de 2022, dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos, incluindo as aflatoxinas em milho e seus derivados. Nesta legislação, ficou estabelecido para as aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 o limite máximo tolerado de 20 µg/kg em alimentos como amendoim, castanhas e cereais como o milho. Em outras categorias de alimentos esse limite pode ser inferior, como é o caso de cereais para alimentação infantil, que apresentam um limite máximo tolerado de apenas 1 µg/kg (ANVISA, 2022).

2.2.2 Formas de Controle

Embora seja impossível prevenir completamente a infecção fúngica e o acúmulo de micotoxinas nos cereais, é essencial utilizar métodos que inibam a propagação de fungos e minimizem as toxinas nos alimentos (ALKUWARI *et al.*, 2022).

Atualmente, o principal método para inibição do crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus* e controle da produção de aflatoxinas é baseado no uso de fungicidas sintéticos. Esses produtos comerciais são sintetizados a partir de constituintes químicos como carbendazim, tridemorfo, triadimenol, difenoconazol, miconazol, dentre outros e têm o potencial de inibir o crescimento, a germinação de conídios e a produção de aflatoxinas (SARITA *et al.*, 2014). Contudo, o uso desses fungicidas tem sido constantemente questionado devido aos riscos associados a saúde e ao meio ambiente (VARGAS-ORTIZ *et al.*, 2020).

Além desses riscos alguns fungicidas induzem mutações em patógenos que levam ao surgimento de espécies com maior agressividade e adaptabilidade às condições adversas (PATYKA *et al.*, 2016). Além disso outro inconveniente ao uso de fungicidas refere-se à germinação e vigor das sementes tratadas, por isso, as pesquisas tentam intensificar a busca por métodos alternativos de controle (BOXSTAEL *et al.*, 2013).

Métodos de processamento como cozinhar, assar, ferver, pasteurizar e fritar não eliminam a maioria das micotoxinas, que permanecem termicamente e quimicamente estáveis. Em casos de contaminação, os alimentos geralmente são descartados porque a maioria dos métodos alternativos ou são de alto custo ou são de difícil aplicação e inviabilizam o processo de descontaminação causando perdas econômicas substanciais. Diante deste problema diversos métodos de controle vêm sendo desenvolvidos, sejam eles para inibir o crescimento do fungo e a produção de aflatoxinas ou sejam para realizar a descontaminação de alimentos e rações (RAO *et al.*, 2019; AGRIPOULOU *et al.*, 2020).

Os diversos métodos podem ser aplicados de acordo com cada etapa de produção dos alimentos, seja no período pré-colheita ou no pós-colheita (Figura 1). Contudo, os métodos que visam a prevenção têm mostrado ser mais eficientes para a redução ou eliminação da presença de aflatoxinas em cereais (SHEHATA *et al.*, 2019).

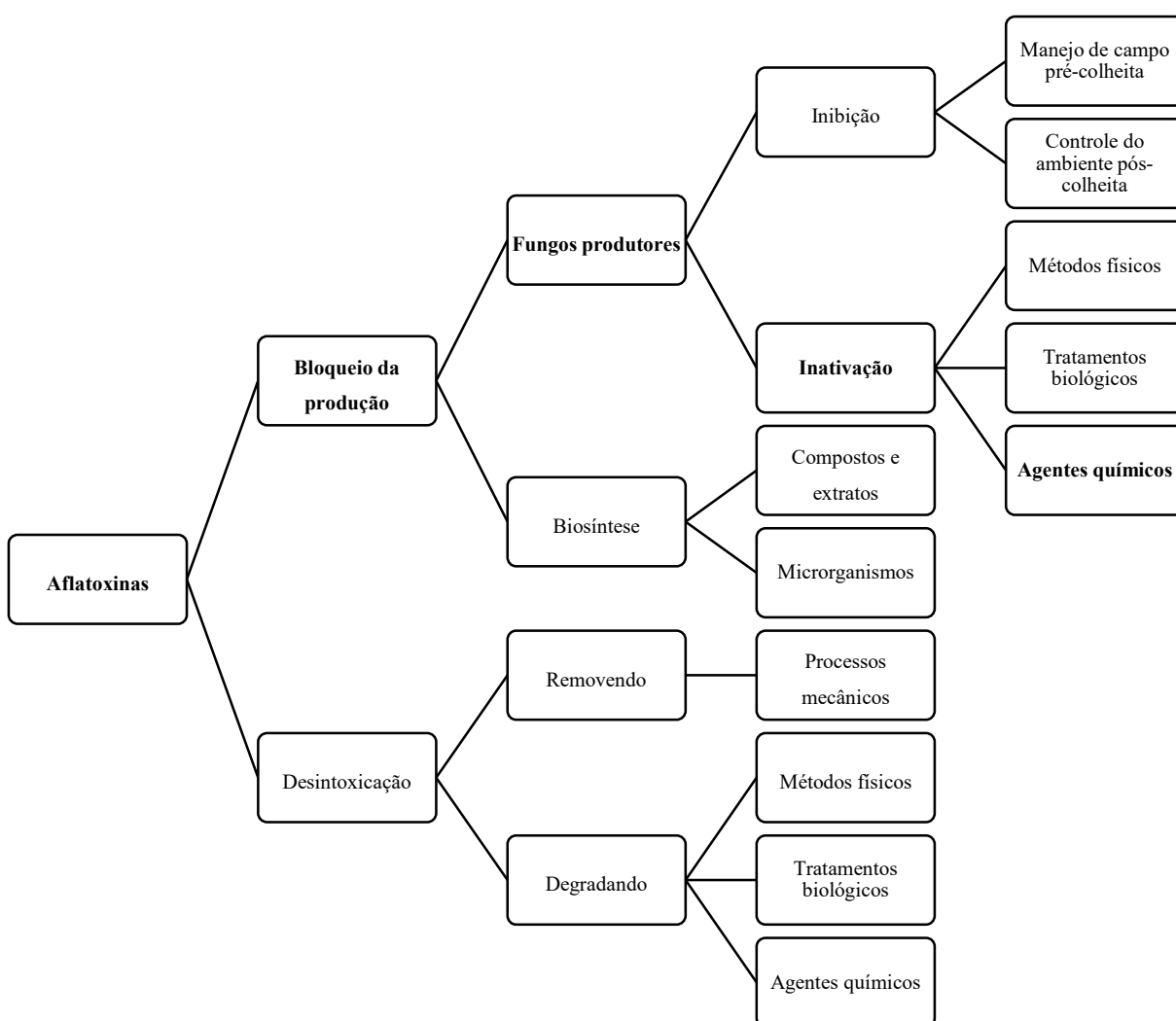
Durante o desenvolvimento destes novos métodos pontos importantes devem ser observados, eles devem ser seguros à saúde humana e animal, eficazes, economicamente viáveis e de fácil aplicação.

Além disso, e de acordo com os critérios listados pela FAO/UNEP/OMS, os métodos de controle de micotoxinas devem: (a) destruir ou inativar a toxina, (b) o produto final não pode ser tóxico ou cancerígeno, (c) destruir os micélios e esporos fúngicos, impossibilitando sua

proliferação, (d) manter o valor nutritivo do produto, (e) manter as propriedades importantes do produto de forma significativa (HASSAN *et al.*, 2020).

Os métodos mais estudados, tanto para a inativação dos fungos quanto para a degradação das aflatoxinas, são os físicos, biológicos e químicos, contudo alguns desses métodos trazem algumas desvantagens como a baixa efetividade, preocupações com a segurança, alto custo, e deterioração da qualidade nutricional de alimentos (SHEHATA *et al.*, 2019; TIWARI *et al.*, 2022).

Figura 1 - Métodos de prevenção e descontaminação de aflatoxinas na cadeia produtiva de alimentos e rações.



Fonte: O autor (2023).

Métodos físicos podem ser usados para controlar a contaminação em diferentes tipos de alimentos. Esses métodos podem incluir triagem mecânica, inativação por calor, irradiação, segregação de densidade, lavagem, cozimento, torrefação, micro-ondas (YIN *et al.*, 2008;

MILICEVIC *et al.*, 2010; MEKAWEY *et al.*, 2019; AGRIOPOULOU *et al.*, 2020; KONLAMBIGUE *et al.*, 2020).

Os métodos de controle biológicos envolvem o uso de bactéria, leveduras e fungos (AGHAMOHSENI *et al.*, 2022). Um exemplo é o uso do próprio *Aspergillus*, mas de uma cepa não toxigênica. Espécies de *Trichoderma* e *Penicillium* também têm sido investigados como potenciais agentes de controle biológico contra cepas aflatoxigênicas (WU *et al.*, 2009). Estudos com levedura demonstram efeitos drásticos na produção de aflatoxinas, bem como no crescimento de *Aspergillus* spp. toxigênico (REN *et al.*, 2020). Entre as bactérias espécies de *Bacillus* são os mais amplamente estudados para o controle de cepas aflatoxigênicas (KONG *et al.*, 2014).

Agentes químicos que usam substâncias diferentes dos tradicionais fungicidas são amplamente estudados. Os métodos baseados no uso de agentes químicos são os mais simples e econômicos para inativar e controlar patógenos contaminantes de alimentos (MIR *et al.*, 2022). Dentre os métodos que usam agentes químicos podemos citar os tratamentos por cloração, oxidação, hidrólise, bases, quitosana, gases e ácidos (MEKAWEY *et al.*, 2019; AGRIOPOULOU *et al.*, 2020; CONTE *et al.*, 2020).

E dentre esses métodos destaca-se o uso dos ácidos orgânicos. Estudos utilizando o ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido propiônico e ácido clorídrico, têm mostrado bons resultados para o controle das aflatoxinas (SHABEER *et al.*, 2022). O efeito inibitório dos ácidos orgânicos deve-se à sua difusão através da membrana celular de forma hidrofóbica e não dissociável, que provoca o estresse ácido responsável pelo cessar das atividades metabólicas dos fungos, e por isso ocorre o efeito fungistático e fungicida (HOUSSNI *et al.*, 2023).

A principal vantagem desse tipo de controle é que estes ácidos são inertes, e já são amplamente difundidos e utilizados na indústria de alimentos e tem ganhado cada vez mais espaço no mercado. Estas substâncias são denominadas substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), ou seja, seu consumo não oferece riscos para a saúde humana e animal e produzem danos mínimos ao meio ambiente.

2.3 Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS)

Os aditivos alimentares são quaisquer ingredientes que possam ser adicionados intencionalmente nos alimentos sem o propósito de nutrição e servem para modificar características químicas, físicas, biológicas e sensoriais. Eles podem ser adicionados durante a fabricação, preparação, tratamento, embalagem, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento.

A principal preocupação quanto ao uso dos aditivos alimentares na produção de alimentos é a controvérsia entre a necessidade e a segurança do uso. Mesmo que o uso traga benefícios, existe a preocupação quanto aos riscos toxicológicos em virtude da ingestão diária dessas substâncias em alimentos processados. Em virtude dessa preocupação, ao longo dos anos, foi constituída uma lista onde muitos aditivos alimentares foram classificados como substâncias GRAS após passarem por avaliações técnicas e por pesquisas científicas que conferem a segurança necessária para liberação de uso destas substâncias.

As substâncias GRAS têm inúmeras aplicações na indústria alimentícia, são utilizadas como corantes, conservantes, aromatizantes, antimicrobianos, veículos, entre outras funções. Algumas delas podem ser utilizadas como uma alternativa segura para o controle de fitopatógenos, pois podem ter efeito bactericida, bacteriostático, fungistático e fungicida (FERREIRA *et al.*, 2015).

No Brasil, a portaria do Ministério da Saúde de Nº 540 de 27 de outubro de 1997, aprovou o Regulamento Técnico que versa sobre as substâncias GRAS. Nele fica estabelecido que o país utilizará como referência as normativas estabelecidas no Codex Alimentarius, da União Européia, do Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos, além de outros órgãos reconhecidos internacionalmente.

Dentre as substâncias de natureza química consideradas como GRAS, destacam-se os ácidos orgânicos. Estes estão presentes na regulamentação da *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos (FDA, 2023a; FDA, 2023b, OJO e DE SMIDT, 2023) e da *European Food Safety Authority* na União Europeia (EFSA, 2011; EFSA, 2012; EFSA, 2019; EFSA, 2022) e incluem os ácidos acético, láctico e propiônico, entre outros aprovados para vários fins técnicos na indústria de alimentos. Os ácidos orgânicos de cadeia curta (C1-C7) estão associados à atividade antimicrobiana devido à redução do pH e pela capacidade de dissociação. Eles têm a capacidade de passar através da parede celular dos microrganismos e se dissociar no citoplasma, acidificando o pH interno impedindo sua multiplicação, levando a danos e morte. O uso crescente de conservantes baseados em ácidos orgânicos se deve à simplicidade, rapidez, eficiência e baixo custo. Eles são capazes de garantir a qualidade e a vida de prateleira e impedir, por exemplo, o crescimento de fungos responsáveis pela produção de aflatoxinas (STANOJEVIC-NIKOLIC *et al.*, 2015).

A eficiência dos ácidos orgânicos como agentes microbianos depende de fatores como constante de dissociação, atividade de água, pH e temperatura de armazenamento. Além disso, é possível obter melhores efeitos pela sinergia desses fatores (HUANG *et al.*, 2010).

2.3.1 Ácido acético

O ácido acético, também denominado ácido etanoico, é um composto químico amplamente empregado tanto na indústria quanto no dia a dia e é encontrado naturalmente no vinagre, que é uma solução diluída de ácido acético em água (DESHMUKH e MANYAR, 2020). Ele é um ácido fraco, monocarboxílico com a fórmula química CH_3COOH , incolor, altamente solúvel em água, com odor característico e é considerado um produto seguro para consumo (LOPEZ *et al.*, 2012; KUMBHAR *et al.*, 2019).

O ácido acético é conhecido desde a antiguidade, pois o vinagre tem sido utilizado há milênios na conservação de alimentos. Foi descoberto acidentalmente de forma empírica na Babilônia, quando um suco de uva ficou mal armazenado e “vinagrou” (aproximadamente 5000 a.C.) (DESHMUKH e MANYAR, 2020).

Relatos históricos dão conta que na medicina o ácido acético foi utilizado desde 420 a.C. quando Hipócrates II, um médico Grego, utilizava esta solução para higienização de feridas. Já no século XIII d.C, um cientista de medicina forense chamado Sung Tz'u (Song Ci) propôs a utilização do ácido acético com enxofre para evitar contaminação microbiológica durante a execução de autópsias. Há também relatos de que por volta de 200 a.C. Aníbal de Cartago utilizou ácido acético como solvente para dissolução de rochas que atrapalhavam a passagem de suas tropas militares. Assim como também há relatos de uso em 50 a.C. por Cleópatra que teria dissolvido pedras preciosas para o preparo de sua poção do amor (JOHNSTON e GASS, 2006).

Por volta de 700 d.C. o ácido acético foi produzido pela primeira vez através da oxidação do etanol do vinho de uva por um alquimista muçulmano chamado Jabir Hayyan, entretanto quem popularizou e industrializou o processo de produção foi o químico Alemão Adolph Wilhelm Hermann Kolbe em 1845, através de um processo de destilação industrial (BUDAK *et al.*, 2014).

De acordo com relatório do grupo Mordor Intelligence, em 2023 o mercado do ácido acético foi de aproximadamente 17.88 milhões de toneladas. Prevê-se que até 2028, a demanda aumente para cerca de 22.44 milhões de toneladas, mostrando um crescimento constante ao longo dos anos, com uma taxa de crescimento anual estimada em 4,65%. Atualmente, o maior mercado de ácido acético está na Ásia-Pacífico, com empresas como Celanese Corporation, INEOS Group, Jiangsu Sopo Chemical Co., Ltd., Eastman Chemical Company e Yankuang Group como os principais *players* desse mercado (MORDOR INTELLIGENCE, 2024a).

O ácido acético é amplamente utilizado em diversas áreas como indústria têxtil, química, alimentos, tinturas, bebidas e polímeros, sendo a aplicação mais comum a produção

de vinagre (DESHMUKH e MANYAR, 2020), na fabricação de variados ésteres de acetato, compostos orgânicos fungicidas, solventes orgânicos e na preparação de produtos farmacêuticos (KUMBHAR *et al.*, 2019).

Em sua forma ultrapura é conhecido como ácido acético glacial (>99,98% de pureza) (KUMBHAR *et al.*, 2019) e pode ser produzido em grande escala pela oxidação de álcoois, especialmente do etanol, ou pela fermentação acética de matérias-primas ricas em carboidratos, como melão, cereais ou frutas (GONZALEZ, 2017). Existem basicamente quatro mecanismos principais de produção: fermentação anaeróbica, oxidação direta do N-Butano, oxidação do acetaldeído e carbonilação do metanol (KUMBHAR *et al.*, 2019), sendo a carbonilação do metanol a rota mais utilizada mundialmente, representando cerca de 60% do total produzido (BAIÃO, 2015).

Além de servir como componente principal do vinagre, o ácido acético é empregado como conservante em alimentos e como aditivo alimentar para conferir sabor e acidez. Também é aplicado na fabricação de condimentos, molhos, marinadas e emulsificantes (MÖLLER *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2014). Silva *et al.* (2015), citam o acetato de isoamila e o acetato de etila, que são ésteres derivados do ácido acético, utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica como flavorizantes e aromatizantes.

Na indústria de alimentos o ácido acético é empregado de diferentes formas, variando principalmente a concentração de uso, é utilizado por exemplo na acetificação, como agente antimicrobiano, precursor de compostos para produção de embalagens alimentícias, acidulante, conservante e realçador de sabor (DESHMUKH e MANYAR, 2020). Na acetificação as bactérias do ácido acético convertem açúcares em ácidos orgânicos em condições aeróbicas, o que garante a produção de vários alimentos fermentados, como o vinagre e algumas cervejas do tipo *Lambic* (DE ROOS e DE VUYST, 2018; BRANDÃO *et al.*, 2023).

O ácido acético é utilizado na produção de queijos brancos como a ricota e o requeijão cremosos, devido seu potencial coagulante, regulador de acidez e flavorizantes (LIMA, 2019; ALBUQUERQUE *et al.*, 2022). Deshmukh e Manyar (2020) relatam que na concentração de 3% é possível utilizar o ácido acético como agente antisséptico. Resultado semelhante foi observado por Soares e Prado (2019) que na concentração de 1% conseguiram observar uma redução de parasitas e microrganismos em alface.

O ácido acético pode ainda fazer parte de uma mistura de peróxido de hidrogênio, ácido acético e água (na forma de ácido peracético), para controle de microrganismos na indústria de alimentos de origem animal, na lavagem de ovos, carcaças, partes dos animais, pescados e

crustáceos, conforme aprovado pela ANVISA através da RDC Nº 2, de 8 de janeiro de 2004 (BRASIL, 2004).

A vantagem de utilização do ácido peracético na indústria de alimentos é sua rápida eficiência contra bactérias e fungos (≈ 5 minutos) e vírus (≈ 30 minutos), bem como, a capacidade de ser menos afetado na presença de matéria orgânica do que alguns outros desinfetantes. Isso significa que sua eficácia não é significativamente reduzida na presença de sujeira, sangue ou outros resíduos orgânicos, tornando-o uma opção confiável em ambientes onde a limpeza completa pode ser desafiadora (TORTORA *et al.*, 2017; MONTEIRO e TIECHER, 2022).

Neumann e Rosa (2018) avaliaram diversos ácidos orgânicos, como o ácido acético (125-500 ppm) e ácido peracético (100 ppm), e conseguiram observar uma eficaz higienização de frutas e hortaliças (FLV's) em um tempo de 15 minutos de tratamento. Fuzawa *et al.* (2020), obtiveram resultados semelhantes contra rotavírus, ao utilizar ácido peracético para sanitizar FLV's variando a concentração entre 1 a 10 ppm pelos tempos de 3 a 60 minutos.

Saraiva *et al.* (2019), avaliaram a eficiência de fermentados acéticos em saladas de alface e observaram que houve uma redução significativa na contagem de aeróbios mesófilos, coliformes totais e termotolerantes nas alfaces tratadas. Já Chang e Fang (2007) observaram uma redução de *E. coli* O157:H7 em alface, com uso de ácido acético na concentração de 5% por um período de 5 minutos.

Gonzalez (2017) cita diversas importâncias do ácido acético na indústria de alimentos através da produção de embalagens para bebidas, como é o caso do ácido tereftálico, que na sua forma pura é utilizado para sintetizar o politereftalato de etileno (PET), mas que também pode ser destinado para a indústria têxtil onde o PET é utilizado na confecção de TNT (tecido não tecido), carpetes e outros tipos de fios a base de plástico. Relata também que ácido acético é conhecido também como um solvente versátil e desempenha um papel crucial como produto químico industrial, na produção de ésteres de acetato, como o acetato de vinila, que representa a principal matéria-prima para a fabricação de polímeros como o etileno de acetato de vinila (EVA) e o poli (acetato de vinila) (PVA), utilizados em uma ampla gama de produtos, incluindo plásticos, adesivos e tintas.

Já Baião (2015) destaca o emprego do ácido acético na agricultura, especialmente na fabricação de fertilizantes e herbicidas. De acordo com Cheung *et al.* (2002), o ácido acético é o precursor do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e do Agente Laranja (mistura de 2,4-D com 2,4,5-triclorofenoxiacético), amplamente utilizado durante a Guerra do Vietnã para desfolhar florestas.

De acordo com regulamento do FDA o ácido acético é utilizado na indústria de alimentos com agente de cura e de conserva, intensificador de sabor, agente aromatizante e adjuvante, agente de controle de pH, solvente, veículo e também como um aditivo de água de caldeira. Ainda de acordo com o mesmo regulamento o ácido acético pode ser utilizados em gêneros alimentícios desde que não exceda as boas práticas de fabricação e regulamenta os níveis máximos permitidos para alguns alimentos, dos quais podemos citar 0,25% para produtos de panificação, 0,8% para queijos e produtos lácteos, 0,5% para goma de mascar, 9,0% para condimentos e aperitivos, 0,5% para gorduras e óleos, 3,0% para molhos, 0,5% para produtos à base de carne e 0,15% para todas as outras categorias de alimentos (FDA 21CFR184.1005, 2023).

2.3.2 Ácido láctico

O ácido láctico, também chamado ácido 2-hidroxipropanóico, é um composto orgânico que tem função essencial em diversos processos biológicos. Quimicamente, é um ácido carboxílico com a fórmula $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ (OJO e DE SMIDT, 2023). Este ácido possui quiralidade, ou seja, estrutura tridimensional espelhada, formando duas variantes enantioméricas: L-láctico e D-láctico. Podem aparecer nas formas puras ou opticamente ativas (L(+) ou D(-)) ou na forma de uma mistura racêmica (L(+) e D(-), 1:1). Na indústria alimentícia e farmacêutica, é vital determinar a forma específica ou a mistura racêmica, pois isso afeta diretamente características como sabor, aroma e atividade biológica (SINGHVI *et al.*, 2019).

A descoberta do ácido láctico em 1780 é creditada ao químico e farmacêutico Sueco, Carl Wilhelm Scheele. Ele isolou o ácido a partir do leite azedo, que é rico nesse composto (KIM *et al.*, 2022). Essa descoberta foi um marco na história da química, pois foi uma das primeiras vezes que um ácido orgânico foi isolado de uma fonte natural.

Em 1839, Pasteur testou a fermentação láctica a partir de amido, leite, dextrina e outros carboidratos, o que serviu de base para descrever em 1857 que o ácido láctico é um produto oriundo da fermentação realizada por microrganismos em condições anaeróbias e não componente intrínseco do leite, como se acreditava anteriormente (GHAFAR *et al.*, 2014).

De acordo com relatório do grupo Mordor Intelligence, em 2023 o mercado do ácido láctico foi de aproximadamente US\$ 491,03 milhões. Prevê-se que até 2028 haja um crescimento constante ao longo dos anos, com uma taxa anual estimada em 4,09%. Atualmente, o maior mercado de ácido láctico está na América do Norte, com empresas como Corbion N. V., Henan Jindan Lactic Acid Technology Co., Ltd., Cargill, DuPont de Nemours, Inc., Vigon International, Inc. como os principais *players* desse mercado (MORDOR INTELLIGENCE,

2024b). Na América do Sul, o Brasil é o maior consumidor deste ácido, seguido pela Colômbia (MORDOR INTELLIGENCE, 2024c).

O ácido láctico tem sido estudado por seu potencial uso em produtos farmacêuticos, na produção de polímeros e na indústria alimentícia, onde é usado como acidulante, conservante e flavorizante (ABEDI e HASHEMI, 2020). Cerca de 85% de todo ácido láctico produzido é destinado para a indústria alimentícia, seja de transformação, desenvolvimento de produtos ou embalagens, e toda a cadeia em torno do segmento alimentício (KIM *et al.*, 2022).

A crescente demanda por produtos biodegradáveis levaram a um aumento no interesse pela utilização do ácido láctico polimerizado para a produção de embalagens de poliláctico (PLA) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2021), ele tem a vantagem de ser biodegradável e compostável, sendo decomposto na natureza em CO₂ e água, o que o torna um bioplástico cobiçado (INGRAO *et al.*, 2015; MASMOUDI *et al.*, 2016; SINTIM *et al.*, 2019). O PLA é um polímero utilizado também na agricultura, como carreador de defensivos agrícolas para solo, de forma que permite a liberação controlada, sendo benéfico principalmente em locais com alta infestação de patógenos e ervas-daninhas (ZHAO e WILKINS, 2005; JAMSHIDIAN *et al.*, 2010).

O ácido láctico ocorre de forma natural em seres vivos como plantas, animais e microrganismos, e pode ser gerado através da fermentação de açúcares ou por meio de síntese química a partir de fontes como carvão, subprodutos petrolíferos e até mesmo o gás natural (KOMESU *et al.*, 2017).

Na forma química, a produção geralmente segue rotas de degradação com bases catalisadas por açúcares, como hidrólise do ácido cloropropiônico ou oxidação de propilenoglicol, porém essas rotas necessitam do subproduto de outras aplicações, bem como a dependência de combustíveis fósseis, o que encarece a produção. A via de produção mais comum é a da lactonitrila, porém o método gera misturas racêmicas (L(+) e D(-), 1:1), o que não é ideal a depender da aplicação (KOMESU *et al.*, 2017).

Na síntese biológica, além de lançar mão de fontes renováveis, o que diminui custos e respeita o meio ambiente, é possível obter o ácido láctico em sua forma pura (L(+) ou D(-)), através da fermentação de açúcares oriundos de resíduos agroindustriais (TANG *et al.* 2016; YIN *et al.* 2016). Os principais microrganismos produtores de ácido láctico, podem ser divididos em três grupos, sendo os fungos filamentosos como o *Rhizopus oryzae*, bactérias amilolíticas como os *Lactobacillus*, e os fermentadores que seguem a via da glicólise, como *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (PLEISSNER *et al.*, 2017; ABEDI e HASHEMI, 2020).

O ácido láctico pode ocorrer de forma natural nos alimentos e atuar como conservante, regulador de pH e aromatizante, além disso, pode ser adicionado aos alimentos, até mesmo como antioxidante e crioprotetor, sua natureza ácida e sua capacidade de reagir com outros compostos tornam o ácido láctico uma substância versátil com uma variedade de aplicações em diferentes áreas (ABEDI e HASHEMI, 2020). De acordo com a norma do FDA ele pode ser utilizado em diversos gêneros alimentícios sem qualquer limitação de concentração. A ressalva que ele não pode ser utilizado na composição de alimentos ou fórmulas para lactentes (FDA 21CFR184.1061, 2023).

Como acidulante e regulador de pH, o ácido láctico é aplicado principalmente em confeitaria, por possuir uma acidez persistente em boca, porém suave, realçando o sabor, sem o impacto da acidez como ocorre com o ácido cítrico, além de reduzir a formação de açúcares invertidos em processos que exijam calor, a produção de doces menos turvos e prevenir a deterioração microbiana (WEE *et al.* 2006; KIM *et al.*, 2022). Pelos mesmos motivos, é bastante utilizado na indústria do leite, refrigerantes, sucos, vinhos, cervejas e na produção de conserva de legumes (KRISHNA *et al.*, 2018).

Na indústria da panificação, seus derivados, o estearoil-2-lactilato de sódio e o estearoil-2-lactil lactato de cálcio são utilizados como emulsificantes para melhorar a qualidade da mistura dos ingredientes no processo de sova da massa, bem como diminuir o tempo de cozimento dos pães, podendo serem empregados em manteiga para substituir a albumina de ovo como emulsificante (KIM *et al.*, 2022).

Em conjunto com ácido acético, é possível observar um aumento no potencial bactericida, na indústria da carne. A adição do ácido láctico reduz a atividade de água das peças o que dificulta a sobrevivência de *Clostridium botulinum*, aumentando o prazo de validade, ele é utilizado na forma de lactato de sódio ou lactato de potássio e é um poderoso conservante em carne bovina, peixe e de aves (KRISHNA *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2022). Para atividade antifúngica é necessário que o ácido esteja predominantemente na sua forma não ionizada e sua eficiência requer concentrações mais elevadas (PELÁEZ *et al.*, 2012).

Martínez-Téllez *et al.* (2009), avaliaram a eficiência do ácido láctico na proteção contra patógenos na concentração de 2% de 40 a 90 segundos em aspargos e cebolinha, onde observaram um efeito sanitizante com redução de 3 log UFC/g de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar *Typhimurium*. Resultado semelhante (ácido láctico a 2%) foi observado por Amrutha *et al.* (2017), na inativação de *E. coli* e *Salmonella* spp. em frutas e vegetais frescos.

Zhang e Farber (1996) observaram que a utilização de ácido láctico a 1% por 10 minutos para sanitização de alface e repolho foi suficiente para reduzir em 5 log UFC/g de *L.*

monocytogenes. José *et al.* (2018), observou a efetividade deste ácido contra bolores e leveduras, quando avaliado a sanitização em tomate cereja, com eficiência comparada a utilização de cloro. Esta mesma autora cita ainda a eficiência do ácido láctico contra *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. coli* (JOSÉ, 2017).

Já na indústria farmacêutica pode ser aplicado como clareador e rejuvenescedor de pele, hidratante, produção de comprimidos, fabricação de produtos de higiene, solução de diálise, dentre outros (ABEDI e HASHEMI, 2020). Alsaheb *et al.* (2015), citam a importância do ácido láctico na produção de soluções intravenosas, na forma de eletrólito, para garantir uma complementação dos fluidos corporais e reidratação, atuando ainda como regulador do pH e sequestrador de metais.

Na indústria química pode-se observar a aplicação como regulador de pH, precursor de polímeros para produção de embalagens biodegradáveis, descalcificante e até mesmo repelente de mosquito (ABEDI e HASHEMI, 2020). Como agente de limpeza, é eficaz e ecológico, utilizado em produtos domésticos para desinfecção, remoção de calcário e limpeza de banheiros (KRISHNA *et al.*, 2018). Martinez *et al.* (2013), relatam este ácido como componente na fabricação de produtos destinados à higiene bucal.

Por se tratar de uma molécula altamente ativa (possui um grupo hidroxila e um carboxila) e oxidada, além de possuir alta reatividade, o ácido láctico pode ser utilizado como poderoso solvente, removedor de resinas e polímeros (WEE *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2022). Bem como pode ser aplicado na produção de plastificantes, lactato de etila, ácido acrílico, propilenoglicol, 2-3 pentanodiona, além de emulsificantes, ácido propiônico e ácido pirúvico (WASEWAR *et al.*, 2005).

2.3.3 Ácido propiônico

Com a fórmula química $C_3H_6O_2$, o ácido propiônico foi isolado pela primeira vez por Johann Gottlieb em 1844. Derivado de suas características, seu nome combina "protos" (simples/primeiro) e "pion" (graxo/gordura) (AMMAR e PHILIPPIDIS, 2021). É um líquido corrosivo, incolor e orgânico, com odor pungente, apresentando propriedades físicas intermediárias entre ácidos carboxílicos leves e ácidos graxos de cadeia longa. Apesar de solúvel em água, precipita na presença de sal, e reage com álcoois, ésteres, bases e sais orgânicos (AHMADI *et al.*, 2017).

O ácido propiônico é amplamente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e agropecuária, devido às suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, flavorizante, anti-inflamatórias e herbicidas (LIU *et al.*, 2012; RANAEI *et al.*, 2020; AMMAR e PHILIPPIDIS,

2021), bem como é utilizado na indústria têxtil na precursão de acetato de celulose propionato, que é um plástico derivado da celulose (YANG *et al.*, 2018). Na indústria de alimentos ou rações ele é amplamente utilizado como agente antimicrobiano e agente aromatizante e não há qualquer limitação de uso para além das boas práticas de fabricação (FDA 21CFR184.1081, 2023).

De acordo com relatório do grupo Statista, em 2022 o mercado do ácido propiônico era de aproximadamente 463 mil toneladas, gerando cerca de US\$ 1,89 bilhão. Prevê-se que até 2030, a demanda aumente para cerca de 603 mil toneladas, mostrando um crescimento constante ao longo dos anos, com uma taxa de crescimento anual estimada em 3,35% (STATISTA RESEARCH DEPARTMENT, 2023). Atualmente, o maior mercado de ácido propiônico está na Europa, seguido pela Ásia-Pacífico e América do Norte, com empresas como BASF SE, Dow Inc., Eastman Chemical Company, Merck KGaA e Perstorp Holding AB como os principais *players* desse mercado (INDUSTRY ARC, 2022).

Embora seja amplamente sintetizado a partir do petróleo, há uma crescente demanda pela diversificação da matriz produtiva do ácido propiônico. Isso se deve à necessidade de reduzir as emissões de gases do efeito estufa, diminuir a dependência de matéria-prima fóssil e lidar com a volatilidade dos preços do petróleo. Nesse contexto, o ácido propiônico também é comercialmente produzido por processos biológicos, utilizando microrganismos, como apresentado no Quadro 1. Esses microrganismos demonstram uma notável capacidade de converter açúcares em ácido propiônico por meio da rota fermentativa do ácido dicarboxílico (AMMAR e PHILIPPIDIS, 2021).

Quadro 1 - Microrganismos e substratos utilizados para a produção de ácido propiônico.

Microrganismo	Substratos	Referências
<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>	Glicerol, lactose, soro de leite, resíduo de milho, hemicelulose	Yang <i>et al.</i> 1994; Dishisha <i>et al.</i> 2012; Liu <i>et al.</i> , 2012; Jiang <i>et al.</i> 2015; Wang <i>et al.</i> , 2017
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Melaço de cana, glicerol, glicose, resíduo de sorgo	Feng <i>et al.</i> , 2011; Ammar <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2014; Ammar <i>et al.</i> , 2020
<i>Propionibacterium jensenii</i>	Glicerol, lactato	Coral, 2008; Liu <i>et al.</i> , 2015, Liu <i>et al.</i> , 2016
<i>Clostridium propionicum</i>	Lactato, glicerol	Johns, 1952; Barbirato <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus coagulans</i>	Glicose	Selder <i>et al.</i> , 2020
<i>Veillonella criceti</i>	Glicose	Dietz <i>et al.</i> , 2013; Selder <i>et al.</i> , 2020

Fonte: O autor (2023).

A utilização de microrganismos na produção de ácido propiônico apresenta uma significativa vantagem devido à sua certificação GRAS, especialmente no caso das propionibactérias, o que confere segurança ao emprego desse ácido na indústria de alimentos. No entanto, uma desvantagem é que o rendimento alcançado por meio desse processo não é tão eficiente quanto o obtido a partir do petróleo (GU *et al.*, 1998). Durante o processo de fermentação, esses microrganismos podem gerar compostos secundários, além do próprio ácido propiônico, que inibe a atividade do microrganismo e reduz a produtividade da operação (AMMAR e PHILIPPIDIS, 2021).

Uma das principais utilizações do ácido propiônico é como conservante alimentar (DEL NOBILE *et al.*, 2015). É frequentemente adicionado a produtos assados, como pães e bolos, para prevenir o crescimento de fungos filamentosos e prolongar a vida útil (PAGE *et al.*, 2014). Também é utilizado em queijos e outros laticínios para inibir o crescimento de bactérias indesejadas e deterioração do alimento (RANAEI *et al.*, 2020). Estes autores relatam ainda a importância do ácido propiônico como aditivo alimentar na conservação dos alimentos, especialmente através do uso dos seus sais propionato de cálcio, propionato de potássio e propionato de sódio.

O ácido propiônico inibe o crescimento de fungos e bactérias, através do potencial de permear pela membrana dos microrganismos, até atingir o citoplasma, onde altera o pH intracelular e a função celular, que desencadeia na má eficiência de absorção e transporte de nutrientes, tornando-se uma escolha popular para evitar o crescimento de patógenos em produtos alimentícios (ZHANG e YANG 2009; VOULGARI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2020).

Na agropecuária, o ácido propiônico é usado como conservante de silagem, ajudando a prevenir a deterioração microbiana durante o armazenamento de alimentos para animais (RANAEI *et al.*, 2020). Este ácido é normalmente adicionado à ração de aves pela sua comprovada eficiência em mitigar a contaminação por *Salmonella* spp. e fungos filamentosos (MANI-LOPEZ *et al.*, 2012).

Já na agricultura um grande problema na produção de grãos é a contaminação pós-colheita causada por fungos filamentosos, que podem resultar em problemas alimentares devido à produção de micotoxinas e em prejuízos econômicos pela deterioração do grão. Nesse contexto, o ácido propiônico poderia ser considerado um aliado para conter essa perda no armazenamento de trigo (KAGLIWAL *et al.*, 2013). Holmquist *et al.* (1983) relataram o potencial inibitório do crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, fungos micotoxigênicos em grãos destinados à alimentação animal. E como agente químico de controle

o ácido propiônico mostra bons resultados no controle de aflatoxinas (SHABEER *et al.*, 2022; TIWARI *et al.*, 2022b). Ademais, a adição de ácido propiônico à ração animal tem se mostrado eficaz na melhoria da digestão no rúmen (CHEN *et al.*, 2020) e na redução da emissão de gás metano (BØRSTING *et al.*, 2020).

Rangel e Villela (2004), observaram que a adição de 2 L/t⁻¹ de um produto a base de ácido propiônico, melhorou a eficiência na conservação e armazenamento de soja seca. Resultado semelhante, foi observado por Elias *et al.* (2008), avaliando a mistura de ácido propiônico e ácido acético na preservação de grãos de sorgo, mantendo características qualiquantitativas por até 180 dias.

Eş *et al.*, (2017) relataram a importância do ácido propiônico como herbicida ambientalmente correto, pois diferente dos demais disponíveis no mercado, é um composto facilmente degradado de forma natural, sendo convertido em outros ácidos orgânicos e posteriormente CO₂ e água, além de possuir um amplo espectro contra monocotiledôneas e dicotiledôneas, atua no pré e pós emergência. Ademais, sabe-se que em doses corretas e com uso de EPI básico para trabalhos com herbicidas, o ácido propiônico não representa nenhum risco à saúde humana (RANAEI *et al.*, 2020).

O ácido propiônico tem sido estudado também como agente anti-inflamatório por conta da demanda por compostos livres de nitrogênio e que possuem origem não esteroideal (GONZÁLEZ-PONCE *et al.*, 2018). Pedroso e Batista (2017) relataram que medicamentos como a Aspirina[®] podem induzir úlceras devido à sua acumulação na mucosa gástrica. Por essa razão, os derivados de ácido propiônico, como o Ibuprofeno, podem desempenhar um papel na redução dos problemas gástricos causados pela superdosagem de anti-inflamatórios.

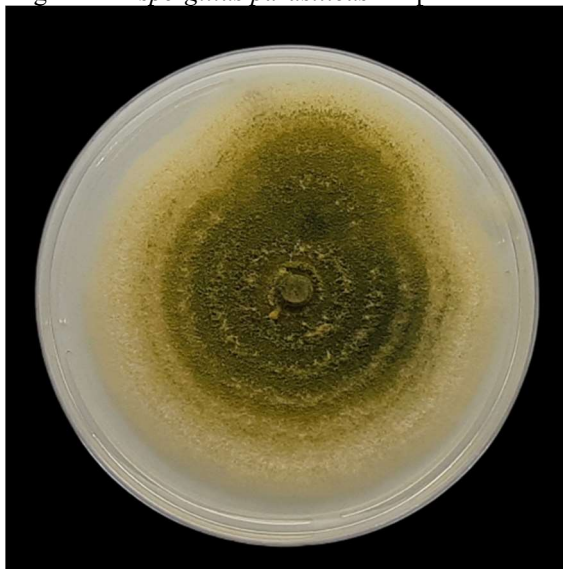
3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas no laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins. Primeiramente, foram realizados os testes *in vitro* e, posteriormente, os testes *in vivo*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3x7+1, representado por três substâncias GRAS (ácido acético, ácido lático e ácido propiônico) em três concentrações diferentes (maior, intermediária e menor) e sete tempos de incubação (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias), com uma testemunha adicional (controle). As concentrações das substâncias GRAS foram testadas respeitando os limites máximos de uso permitidos pela legislação vigente no Brasil.

3.1 Testes *in vitro*

O *Aspergillus parasiticus* IMI 242695 utilizado no estudo, Figura 2, é proveniente do International Mycological Institute, Inglaterra, e produtor das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. O fungo encontra-se depositado na coleção de culturas de fungos do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins.

Figura 2 - *Aspergillus parasiticus* em placa de Petri.



Fonte: O autor (2022).

3.1.1 Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS)

As substâncias GRAS foram adquiridas de um distribuidor de produtos químicos e laboratoriais localizado na cidade de Palmas – Tocantins, Brasil. As características das substâncias GRAS testadas estão discriminadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais características das substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) utilizadas no experimento.

Substâncias GRAS	Fórmula	Peso	Concentração	Fabricante
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	60,05g/mol	99,8%	NEON
Ácido láctico	C ₃ H ₆ O ₃	90,08g/mol	85%	ÊXODO
Ácido propiônico	C ₃ H ₆ O ₂	74,08g/mol	99,5%	ÊXODO

Fonte: O autor (2023).

3.1.2 Inibição de crescimento do *Aspergillus parasiticus*

Para realização do experimento foram preparadas novas culturas puras do *Aspergillus parasiticus* utilizando placas de Petri descartáveis (90mm de diâmetro), cada uma delas contendo 15mL do meio de cultura ágar batata dextrose (BDA). As placas inoculadas com o *Aspergillus parasiticus* foram incubadas em incubadora BOD (*Biological Oxygen Demand*) a 25°C, por sete dias.

Após os sete dias de incubação foram retirados com o auxílio de um canudo, discos de 6mm de diâmetro do *Aspergillus parasiticus* e inoculados no centro de novas placas de Petri contendo 15ml do meio de cultura BDA. As novas placas inoculadas foram incubadas a 25°C em incubadora BOD por 24 horas.

Após 24 horas as placas inoculadas foram invertidas, ficando o *Aspergillus parasiticus* na parte superior. Na tampa de cada placa foi então colocado um pedaço quadrado (1,5 x 1,5cm) de papel filtro que recebeu as substâncias GRAS. As placas foram colocadas em sacos de polietileno, medindo 10 x 15cm, vedadas em seladora e incubadas em incubadora BOD a 25°C.

No papel filtro foram adicionadas diferentes concentrações das substâncias GRAS, em porcentagem sobre o peso da amostra. As concentrações utilizadas respeitaram o limite máximo atribuído pela legislação vigente para adição em alimentos, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Substâncias GRAS e respectivas concentrações testadas *in vitro* de acordo com os limites máximos permitidos pela legislação vigente no Brasil.

Substâncias GRAS	Concentrações testadas*		
	Maior	Intermediária	Menor
Ácido acético	0,15%	0,10%	0,05%
Ácido láctico	1,0%	0,75%	0,5%
Ácido propiônico	1,0%	0,75%	0,5%

* As concentrações foram calculadas em porcentagem sobre peso final da amostra.

Fonte: O autor (2023).

Os resultados do crescimento dos micélios foram determinados individualmente com o auxílio de um paquímetro digital e calculada a média diária de dois diâmetros perpendiculares

do crescimento. Os valores das médias de crescimento da colônia nos tratamentos foram comparados com as das placas controle. Este experimento foi realizado com cinco repetições para cada uma das três concentrações das três substâncias GRAS testadas contra o *Aspergillus parasiticus*, como também as placas do controle, totalizando 50 placas.

3.1.3 Detecção das aflatoxinas em ágar coco

O meio de cultura ágar coco (LIN e DIANESE, 1976) utilizado foi preparado através da diluição de 84ml de extrato hidrossolúvel de coco (leite de coco) comercial em 250ml de água destilada, mais 5g de ágar puro. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C e posteriormente foi distribuído 15ml do meio de cultura por placa de Petri descartável.

As placas foram inoculadas com discos de 6mm do *Aspergillus parasiticus* e incubadas em incubadora BOD a 25°C. Os resultados foram observados a olho nu sob luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 365 nanômetros (nm), e as leituras foram realizadas em 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a inoculação.

3.2 Teste *in vivo*

Para realização dos testes *in vivo* o *Aspergillus parasiticus* foi inoculado em novas placas de Petri com meio de cultura BDA e as placas foram incubadas em incubadora BOD a 25°C por trinta dias. E o milho utilizado no experimento foi adquirido no comércio local, na cidade de Palmas, Tocantins, o mesmo foi comprado já triturado.

3.2.1 Inoculação do *Aspergillus parasiticus* no milho

A inoculação do *Aspergillus parasiticus* no milho foi realizada com uma suspensão de conídios retirados de placas inoculadas com trinta dias de crescimento. Foi utilizada uma solução composta de água destilada estéril e 0,1% de Tween 80 (v/v) para lavagem das placas. Ao todo foram preparados 500ml dessa suspensão de conídios a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml, o valor foi ajustado por contagem com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Após o preparo da suspensão de conídios, alíquotas de 100g do milho foram pesadas e acondicionadas em frascos de vidro com tampa rosqueável, com volume de 1,3 litros. Então 10ml da suspensão de conídios foram inoculadas em cada um dos frascos com o milho triturado, em seguida foram tampados e homogeneizados.

Nos frascos do controle positivo apenas a suspensão de conídios foi adicionada, já nos frascos dos tratamentos as substâncias GRAS foram adicionadas conforme Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 - Substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) e respectivas concentrações testadas *in vivo*.

Concentrações testadas*		
Ácido acético	0,15%	-
Ácido propiônico	-	0,5%
Ácido acético / Ácido propiônico	0,15%	0,5%

* As concentrações foram calculadas em porcentagem sobre peso final da amostra.

Fonte: O autor (2023).

Foram preparados ao todo quarenta e cinco frascos, sendo quinze frascos do controle positivo, dez frascos do tratamento com ácido acético 0,15%, dez frascos do tratamento com ácido propiônico 0,5% e dez frascos do tratamento com a mistura dos ácidos acético 0,15% e ácido propiônico 0,5%.

3.2.2 Tempo de permanência viável

O tempo de permanência viável foi realizado nas amostras dos testes *in vivo* antes da autoclavagem dos frascos, com 14 e 28 dias de inoculação. Os testes foram realizados em triplicata, totalizando 120 placas.

Para realização do teste 1g de cada amostra foi pesada em tubos tipo Falcon e posteriormente foi adicionado em cada tubo 9ml de água de torneira estéril, diluição 10^{-1} . A amostra foi então agitada em agitador vórtex por 30 segundos e logo após a agitação foi realizada uma segunda diluição da amostra, para 10^{-2} . A inoculação da diluição foi realizada no aparelho Eddy Jet Spiral Plater (IUL Instruments) em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. As placas inoculadas foram incubadas em incubadora BOD a 25°C por 48 horas.

Para leitura dos resultados foi utilizado o Colony Counting & Zone Reading (IUL Instruments) ligado a um computador que através do software Flash And Go, e após configurações de parâmetros como volume inoculado (50µl) e diluição inicial (10^{-2}), fez a contagem automática das colônias na placa de Petri e mostrou os resultados em unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml).

3.2.3 Quantificação das aflatoxinas

Para quantificação das aflatoxinas produzidas foi utilizado um kit da Envirologix denominado TotalTox™ Aflatoxin, este método usa dispositivos de teste de fluxo lateral (LFDs) onde membranas de nitrocelulose são revestidas de anticorpos específicos que se ligam as aflatoxinas. Para que isso aconteça a amostra é adicionada a uma extremidade da tira e à medida que flui através da membrana por capilaridade, esta é exposta a zonas de anticorpos

reativos a aflatoxinas. O teste garante precisão nos resultados encontrados entre o nível mínimo de $2,7\mu\text{g/kg}$ e nível máximo de $300\mu\text{g/kg}$ para a matriz milho.

Para realização do teste foram pesadas 25g de amostra de cada frasco em um copo plástico com tampa rosqueável. Em seguida, por amostra, foi adicionado um envelope do reagente EB17 juntamente com 75ml de água destilada. Durante dez segundos a amostra foi agitada vigorosamente até ser totalmente misturada e em seguida foi realizada a agitação manual constante por dois minutos. Após o processo de mistura a amostra foi filtrada em filtro de papel e em seguida com auxílio de uma pipeta foram adicionados a um tubo de reação, $100\mu\text{l}$ do tampão DB5 e $100\mu\text{l}$ do extrato clarificado recém coado.

O tubo foi então colocado no My BlockTM mini dry bath (Benchmark), que é um bloco estabilizador de temperatura, para estabilizar a temperatura da amostra em 22°C por dois minutos. Após os dois minutos, colocou-se a tira reagente e deixou-a reagir por quatro minutos. Passado este tempo, a tira foi retirada do tubo, cortada na área demarcada sendo depositada no escâner QuickScan que ligado a um computador e através do software de mesmo nome realizou a leitura do resultado.

Para resultados iniciais maiores que $30\mu\text{g/kg}$ foi necessário a realizar diluição extra do extrato clarificado em uma solução de diluição preparada com um envelope do reagente EB17 com 150mL de água destilada. Os próximos passos após a diluição extra do extrato clarificado seguiram conforme procedimento anterior, com adição de tampão DB5, climatização, tira e leitura no escâner QuickScan.

3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados inicialmente por análise de variância individual e, posteriormente, em análise conjunta. Nos ensaios *in vitro*, as médias dos tratamentos foram comparadas com o controle utilizando o teste de Dunnett ($p < 0,05$) e entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A taxa de crescimento ao longo do tempo foi avaliada por meio de regressão polinomial, com ajustes de primeiro e segundo grau. Para os testes *in vivo*, os dados passaram por análise descritiva e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os programas estatísticos utilizados foram o AGROESTAT (BARBOSA, 2011), GENES (CRUZ, 2006a, 2006b) e SISVAR versão 5.0 (FERREIRA, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes *in vitro*

4.1.1 Inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus*

O resumo da análise de variância (ANOVA) conjunta para o crescimento de *Aspergillus parasiticus* revela significância a 1% de probabilidade para todas as fontes de variação (FV) analisadas, incluindo ácidos (A), concentração (C) tempo (T) e uma testemunha adicional, estão apresentados na Tabela 4. Foram analisados os efeitos isolados dos ácidos (A), das concentrações (C) e dos tempos de incubação (T) e além disso todas as interações entre esses fatores (AxC, AxT, CxT, AxCxT) também são altamente significativas. Esses resultados indicam que tanto os fatores individuais quanto suas interações têm um impacto significativo no crescimento de *Aspergillus parasiticus*. A interação tripla (AxCxT) demonstra sua importância nos tratamentos, como já observado em estudos realizados por Udomkun *et al.* (2017).

Tabela 4 - Análise de variância conjunta do crescimento de *Aspergillus parasiticus* na presença de três ácidos distintos (ácido acético, ácido láctico e ácido propiônico) e sete tempos de incubação.

FV	GL	QM
		CR
A	2	177368431,97**
C	2	7850670,72**
T	6	14934753,47**
AxC	4	2361019,23**
AxT	12	8219142,10**
CxT	12	1489931,80**
AxCxT	24	589288,78**
Fatorial	62	9679719,69**
Adic vs fat	1	153945078,95**
Entre fat	6	24483409,78**
Trat	69	13057799,39**
Resi	280	105250,80
Total	349	
CV%		13,86

**Significativo a 1% de probabilidade; FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio; CR: crescimento radial de *Aspergillus parasiticus*; A: ácidos; C: concentração; T: tempo.

Fonte: O autor (2023).

As interações também demonstram uma influência significativa no crescimento fúngico, sugerindo que a resposta de *Aspergillus parasiticus* não é apenas dependente de um único fator, mas da combinação de ácidos, suas concentrações e o tempo de tratamento.

Segundo classificação proposta por Pimentel - Gomes (2009) o coeficiente de variação (CV) de 13,86% obtido nesta análise indica uma boa precisão na condução dos experimentos, embora um CV alto sugira uma considerável variação nos dados, que pode ser inerente à natureza do crescimento fúngico.

As médias de crescimento radial do *Aspergillus parasiticus* oriundas do desdobramento da interação tripla, AxCxT, são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Médias de crescimento de *Aspergillus parasiticus* na presença de três diferentes tipos de ácido em três concentrações e sete tempos de incubação.

GRAS	C	Crescimento radial (mm)						
		Tempo (dias)						
		0	1	2	3	4	5	6
Ácido acético	C1	11,64Aa1	11,64Aa1	11,64Aa1	11,64Aa1	11,64Aa1	11,64Aa1	11,64Aa1
	C2	12,66Aa1	12,65Aa1	12,65Aa1	12,65Aa1	12,65Aa1	13,96Aa1	20,04Bb2
	C3	11,97Aa1	12,27Aa1	12,27Aa1	12,27Aa1	23,62Bb2	33,68Bb3	41,46Cb3
TA	-	11,44 ^{ns}	22,96*	33,94*	44,04*	53,52*	64,15*	72,99*
Ácido láctico	C1	11,21Aa1	23,82Ab2	33,99Ab3	38,05Ab3	39,04Ab3	40,15Ab3	40,15Ab3
	C2	12,24Aa1	24,82Ab2	35,07Ab3	41,83Ab4	45,92Ab4	48,66Ab4	49,17Bc4
	C3	12,06Aa1	23,59Ab2	34,85Ab3	43,74Ab4	49,57Ac4	53,54Bc4	55,46Cc4
TA	-	11,44 ^{ns}	22,96 ^{ns}	33,94 ^{ns}	44,04 ^{ns}	53,52*	64,15*	72,99*
Ácido propiônico	C1	11,77Aa1	11,77Aa1	11,77Aa1	11,77Aa1	11,77Aa1	11,77Aa1	11,77Aa1
	C2	12,07Aa1	12,06Aa1	12,06Aa1	12,06Aa1	12,06Aa1	12,06Aa1	12,06Aa1
	C3	12,02Aa1	12,05Aa1	12,05Aa1	12,05Aa1	12,05Aa1	12,05Aa1	12,05Aa1
TA	-	11,44 ^{ns}	22,96*	33,94*	44,04*	53,52*	64,15*	72,99*

1- Médias de concentração, dentro do mesmo ácido e do mesmo tempo, seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não deferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2- Médias de ácido, dentro da mesma concentração e do mesmo tempo, seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não deferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3- Médias de tempo, dentro do mesmo ácido e da mesma concentração, seguidas de mesmo número na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4- *Médias de ácidos diferem do controle pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

C1- Maior concentração (Ácido acético: 0,15- Ácido láctico: 1,00-Ácido propiônico: 1,00).

C2- Concentração intermediária (Ácido acético: 0,10- Ácido láctico: 0,75-Ácido propiônico: 0,75).

C3- Menor concentração (Ácido acético: 0,05- Ácido láctico: 0,50-Ácido propiônico: 0,50).

TA- Testemunha adicional.

Fonte: O autor (2023).

Nos testes realizados com o ácido acético e ácido propiônico, o crescimento radial médio em todas as concentrações e tempos de incubação diferiram significativamente da testemunha adicional pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$), indicando uma inibição do crescimento radial do *Aspergillus parasiticus*. Já nos testes realizados com o ácido láctico, embora todas as

concentrações utilizadas para inibição do crescimento radial tenham interferido a partir do quarto dia, elas não demonstraram diferença significativa com a testemunha nos quatro primeiros dias de avaliação, indicando que o uso do mesmo não resulta em um controle tão efetivo quanto o desejado.

Comparando-se as três substâncias testadas, a partir do primeiro dia, observou-se diferença estatística entre as médias de crescimento radial no tratamento realizado com o ácido láctico, onde as médias foram maiores que as apresentadas pelos demais ácidos. Esse comportamento se manteve ao longo dos dias, indicando que o tratamento com o ácido láctico, em comparação com os outros tratamentos realizados com o ácido acético e ácido propiônico, não foi capaz de inibir efetivamente o crescimento do *Aspergillus parasiticus*.

Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Rebonatto *et al.* (2018), que também observaram a efetividade do ácido acético e do ácido propiônico na inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*, com concentrações inibitórias mínimas de 0,5% e 0,2%, respectivamente, e também relataram uma ineficácia do ácido láctico mesmo quando utilizado em concentrações mais elevadas.

A inibição do crescimento de *Aspergillus parasiticus* também foi relatada por Møller *et al.* (2021), que observaram uma redução no crescimento fúngico em meio contendo ácido láctico derivado de lactobacilos. No entanto, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que, quando utilizado de forma isolada, o ácido láctico não possui a mesma eficácia, corroborando os achados de Houssni *et al.* (2023), que sugerem que a ação inibitória é potencializada pela presença de compostos antagonistas produzidos durante a fermentação.

Tahuer *et al.* (2019) também encontraram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde o ácido láctico não foi capaz de inibir totalmente o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus carbonarius* em testes *in vitro*.

A literatura também aponta para a variabilidade da eficácia de diferentes compostos naturais. Zeidan *et al.* (2018) relataram que compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por leveduras conseguiram inibir parcialmente o crescimento de *Aspergillus parasiticus*. Mas a sua eficácia foi reduzindo ao longo do tempo, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de resistência do fungo. Esse fenômeno de adaptação também pode explicar a menor efetividade do ácido láctico observada em nosso estudo.

Rao *et al.* (2019) relataram que o uso do sobrenadante livre de células de *Lactobacillus plantarum* demonstrou uma atividade antifúngica e conseguiu controlar o crescimento de *Aspergillus parasiticus* com eficiência comparável à da nistatina, que é um antifúngico padrão.

Já Silva *et al.* (2015) investigaram o efeito da quitosana sobre o crescimento de *Aspergillus parasiticus* e observaram uma redução significativa no diâmetro médio das colônias em meios suplementados com quitosana nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0%. Uma redução progressiva no diâmetro das colônias à medida que a concentração de quitosana aumentou, indicando uma relação direta entre a concentração do composto e sua eficácia antifúngica.

Farghl *et al.* (2023) destacaram em seu trabalho o uso promissor de extratos de algas e benzoato de sódio no controle de fungos aflatoxigênicos. Esses tratamentos naturais, assim como o ácido acético e o ácido propiônico, mostraram eficácia significativa, o que pode indicar alternativas viáveis ao controle convencional de fungos.

Considerando o desdobramento das concentrações, dentro de cada ácido e tempos de incubação, o ácido acético na sua maior concentração (C1) apresentou inibição efetiva do crescimento radial durante todo o período analisado. Na concentração intermediária (C2), houve um aumento do crescimento radial no sexto dia e na concentração baixa (C3) o crescimento teve início a partir do quinto dia de medição.

Nos testes realizados com o ácido láctico houve o aumento das médias do crescimento do *Aspergillus parasiticus* em todas as concentrações utilizadas logo no segundo dia de experimento. Enquanto não houve aumento das médias do crescimento radial em todas as concentrações testadas quando o tratamento foi realizado com o ácido propiônico.

Sun *et al.* (2016) destacaram em seus estudos o potencial do cinamaldeído (CIN) como agente antifúngico, ele inibiu completamente o crescimento de *Aspergillus flavus* e embora esse composto não tenha sido testado em nosso estudo, a relação entre a concentração do composto testado e a eficácia na inibição do crescimento fúngico se alinha aos resultados observados para o ácido acético, que demonstrou um efeito dose-dependente.

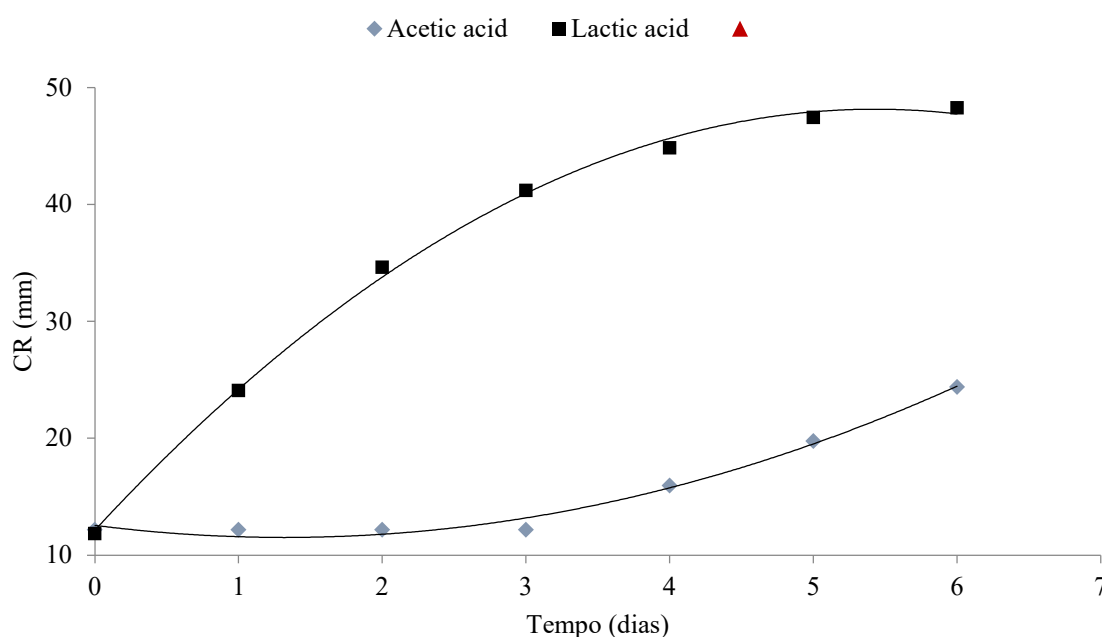
Moon *et al.* (2018) relataram em seus estudos que o ácido propiônico em concentrações de 0,1% e 0,5% inibiram totalmente o crescimento de *Aspergillus flavus*. No entanto, no caso do ácido acético, a eficácia antifúngica diminuiu em concentrações mais baixas, o que está em concordância com os resultados encontrados no presente estudo.

Foi realizada a verificação da relação funcional entre os ácidos e tempo de incubação (AxT) na taxa de crescimento do *Aspergillus parasiticus*, e esta mostrou que houve um ajuste polinomial quadrático somente para os ácidos acético e láctico. No caso do ácido acético, a equação indicou que o ponto crítico ocorreu no dia 1,32, demonstrando uma mudança de comportamento logo no primeiro dia, com um leve crescimento até o quarto dia, alcançando um crescimento médio de 24,38 mm no sexto dia. Já para o ácido láctico, o crescimento foi

rápido e contínuo, com o ponto crítico situado no dia 5,43, atingindo um crescimento de 48,26 mm no último dia de observação (Figura 3).

Para o ácido propiônico, não foi observado ajustamento, e o valor constante de crescimento de 11,96 mm permaneceu inalterado ao longo do tempo de incubação, indicando controle total do *Aspergillus parasiticus*.

Figura 3 - Crescimento radial (CR) do *Aspergillus parasiticus* em função do tempo para o ácido acético e ácido láctico.



$$\text{Ácido acético: } y = 0,5908x^2 - 1,5611x + 12,55 \quad (R^2 = 0,9875)$$

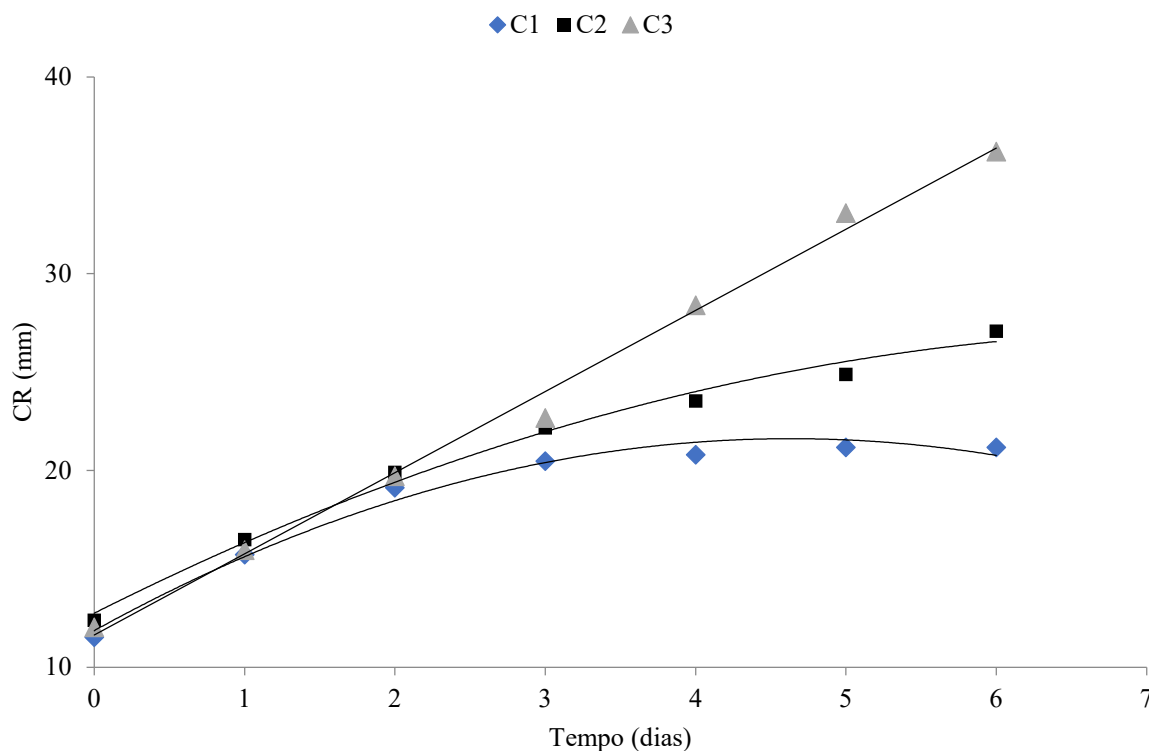
$$\text{Ácido láctico: } y = -1,222x^2 + 13,266x + 12,135 \quad (R^2 = 0,9982)$$

$$\text{Ácido propiônico: } y = 11,96$$

Fonte: O autor (2023).

A Figura 4 ilustra a relação entre a concentração e o tempo de incubação (C x T) no crescimento radial de *Aspergillus parasiticus*, independentemente do ácido utilizado. Nas menores concentrações (C3), o ajuste linear indicou que o crescimento radial aumentava com o tempo de incubação, chegando a um CR de 36,22 mm no sexto dia. Para a concentração intermediária (C2), o ajuste quadrático revelou que o ponto crítico seria alcançado apenas a partir do sexto dia, com um CR de 27,09 mm nesse mesmo período. Nas concentrações mais altas (C1), o ajuste também foi feito por uma equação quadrática, com o ponto crítico no dia 4,63 e crescimento médio de 21,19 mm no sexto dia.

Figura 4 – Crescimento radial (CR) em função do tempo para as diferentes concentrações utilizadas das substâncias GRAS no controle de *Aspergillus parasiticus*.



C1- (maior concentração): $y = -0,4543x^2 + 4,2093x + 11,864 - R^2 = 0,9843$

C2- (concentração intermediária): $y = -0,2571x^2 + 3,8436x + 12,746 - R^2 = 0,9911$

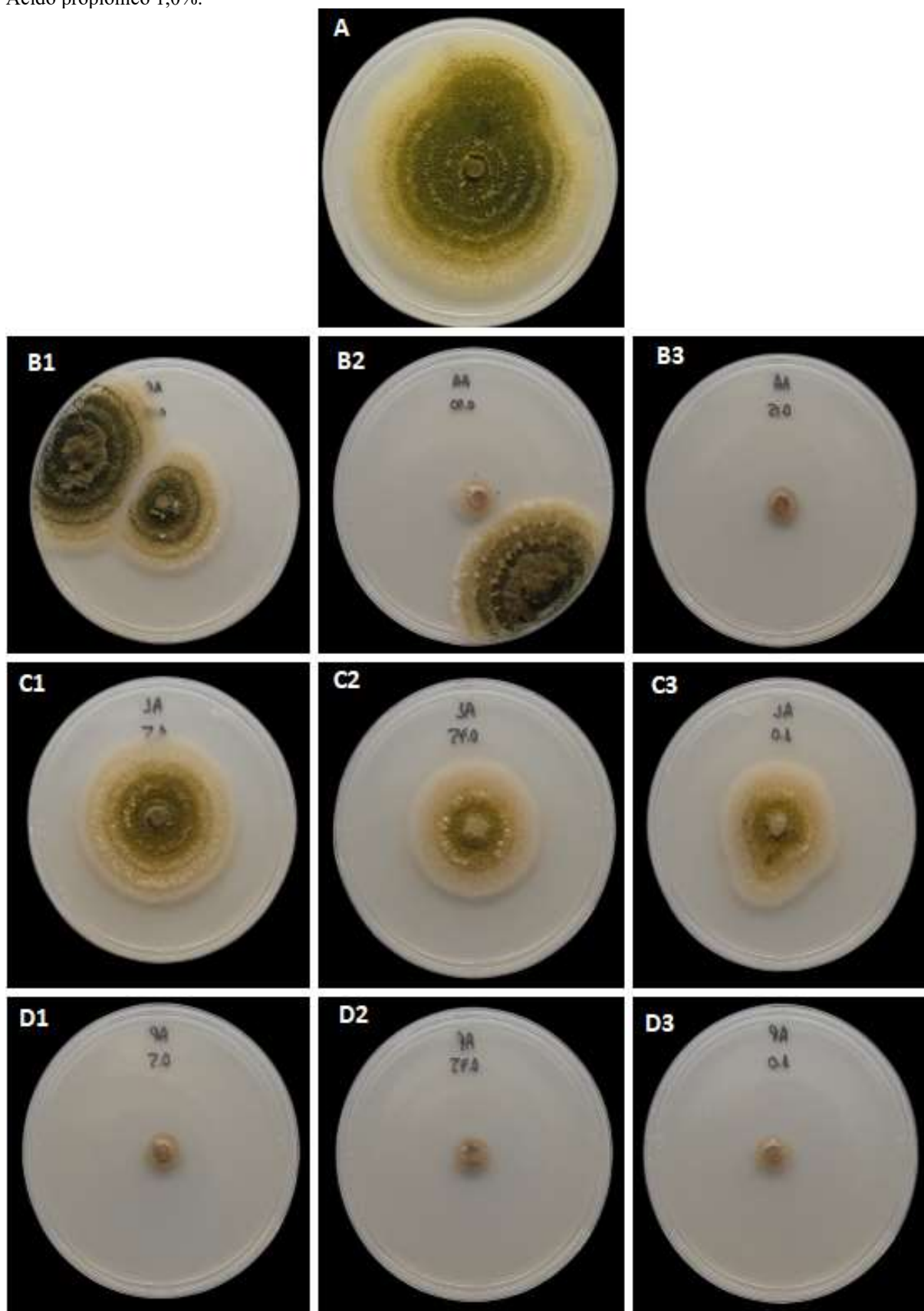
C3- (menor concentração): $y = 4,1229x + 11,651 - R^2 = 0,9941$

Fonte: O autor (2023).

Esse comportamento sugere que a taxa de crescimento do fungo está associada ao aumento das concentrações das substâncias GRAS. De modo geral, as menores concentrações (C3) exibiram um padrão linear de crescimento, indicando que a partir do sexto dia o *Aspergillus parasiticus* continuaria se desenvolvendo. Além disso, nota-se que, na concentração C1, o ponto crítico da equação foi alcançado em um tempo mais curto em comparação à C2, sugerindo um controle mais rápido do crescimento fúngico.

Diante dos resultados obtidos nos testes *in vitro*, podemos concluir que suas concentrações maior e menor conseguiram inibir o crescimento da colônia de *Aspergillus parasiticus* em 100% (Figura 5). E visando a busca por tratamentos eficazes ambos foram selecionados para realização dos testes *in vivo*. Também foi realizado o teste *in vivo* com a mistura das duas substâncias nestas concentrações selecionadas.

Figura 5 - Resultado do crescimento radial de *Aspergillus parasiticus* aos 6 dias após incubação. (A) Controle; (B1) Ácido acético 0,05%; (B2) – Ácido acético 0,10%; (B3) Ácido acético 0,15%; (C1) Ácido láctico 0,5%; (C2) Ácido láctico 0,75%; (C3) Ácido láctico 1,0%; (D1) Ácido propiônico 0,5%; (D2) Ácido propiônico 0,75%; (D3) Ácido propiônico 1,0%.



Fonte: O autor (2022).

4.1.2 Detecção das aflatoxinas em ágar coco

A observação da produção das aflatoxinas através da inoculação de *Aspergillus parasiticus* em meio de cultura ágar coco e posterior exposição da placa inoculada a luz UV com intuito de observar a fluorescência das aflatoxinas é bastante difundida na identificação de uma cepa produtora ou não de aflatoxinas e foi proposta pelos pesquisadores Lin e Dianese (1976). Eles desenvolveram a formulação e propuseram o uso do ágar coco para detecção da produção de aflatoxinas por *Aspergillus* spp, neste meio de cultura as aflatoxinas produzidas mostram uma fluorescência azul ou azul-verde quando expostas a luz ultravioleta.

Anteriormente os pesquisadores de Vogel *et al.* (1965) e Hara *et al.* (1974) também propuseram formulações para detecção de aflatoxinas em meio de cultura, porém o uso de ágar coco mostrou ser um método mais rápido e mais simples em comparação a estes propostos anteriormente.

Bizzetto *et al.* (1997) avaliaram diferentes meios de cultura para mensurar a capacidade de detecção de aflatoxinas e concluíram que o ágar coco foi o melhor meio de cultura utilizado. Ele manifestou fluorescência de alta e média intensidade após 48 horas de incubação, e o crescimento do fungo também mostrou ser maior em comparação aos demais substratos utilizados. Portanto, o uso de ágar coco se destaca por ser um método simples e rápido para detecção de aflatoxinas por cepas produtoras e pode ser utilizado em larga escala.

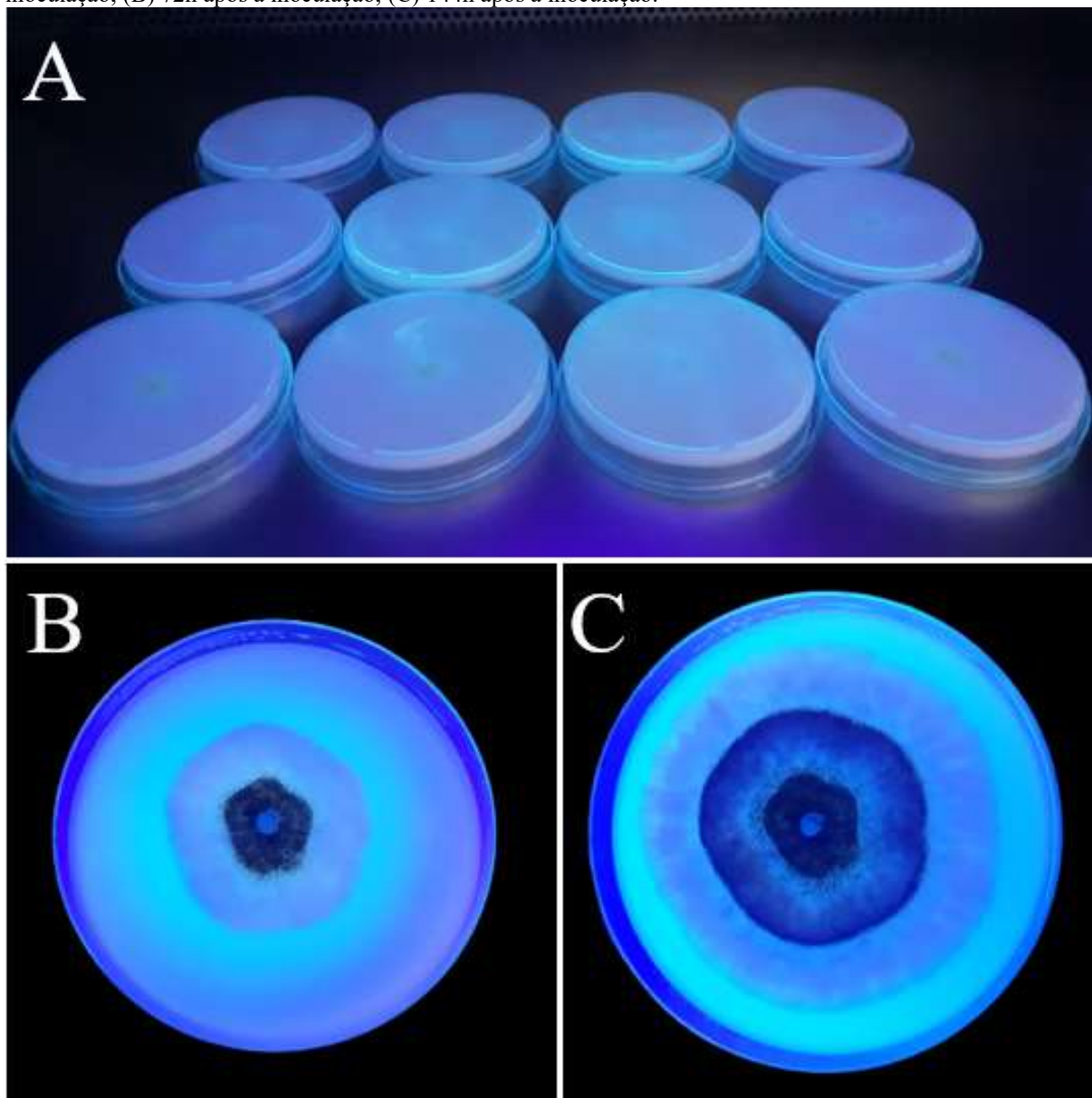
No presente estudo o meio de cultura ágar coco também mostrou ser um excelente meio de cultura para avaliação da produção de aflatoxinas produzidas pelo *Aspergillus parasiticus*. Já na primeira leitura realizada 24h após a inoculação, foi possível observar a produção das aflatoxinas através da fluorescência no meio de cultura, ainda que a fluorescência observada tenha sido de baixa intensidade.

Já nos estudos de Lin e Dianese (1976) a fluorescência começou a aparecer apenas 32 horas após a inoculação do meio e com o passar do tempo de incubação a intensidade da fluorescência foi aumentando, assim como no presente estudo.

As leituras das placas inoculadas foram realizadas por 6 dias consecutivos e, dia após dia, ficou ainda mais evidente o aumento gradual na concentração de aflatoxinas, pelo aumento da intensidade da fluorescência, quando as placas foram colocadas sob a luz UV (Figura 6).

Os resultados obtidos neste teste foram de suma importância, pois mostraram que a cepa de *Aspergillus parasiticus* utilizada na pesquisa era produtora das aflatoxinas, trazendo assim a segurança para realização da etapa seguinte do trabalho que foi a de quantificação das aflatoxinas produzidas nos testes realizados *in vivo*.

Figura 6 - Fluorescência das aflatoxinas produzidas por *Aspergillus parasiticus* em ágar coco. (A) 24h após a inoculação; (B) 72h após a inoculação; (C) 144h após a inoculação.



Fonte: O autor (2022).

4.2 Testes *in vivo*

4.2.1 Tempo de permanência viável

O tempo de permanência viável permitiu avaliar a viabilidade celular do *Aspergillus parasiticus* inoculado nos frascos controle e nos frascos dos tratamentos com substâncias GRAS, nos períodos de 14 e 28 dias de incubação.

Conforme a Tabela 6, podemos observar que nos frascos do controle o fungo permaneceu viável até a realização da segunda quantificação no vigésimo oitavo dia. Já nos

frascos dos tratamentos houve controle do *Aspergillus parasiticus*, ou seja, ele não conseguiu sobreviver a nenhum dos tratamentos realizados em ambos os períodos.

Tabela 6 - Viabilidade celular do *Aspergillus parasiticus* com 14 e 28 dias de incubação do teste *in vivo*.

	Tempo			
	14 Dias		28 Dias	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Controle	3,6x10 ⁶	2,1x10 ⁶	2,38x10 ⁶	2,71x10 ⁵
Ácido acético	-	-	-	-
Ácido propiônico	-	-	-	-
Ác. acético / Ác. propiônico	-	-	-	-

Fonte: O autor (2023).

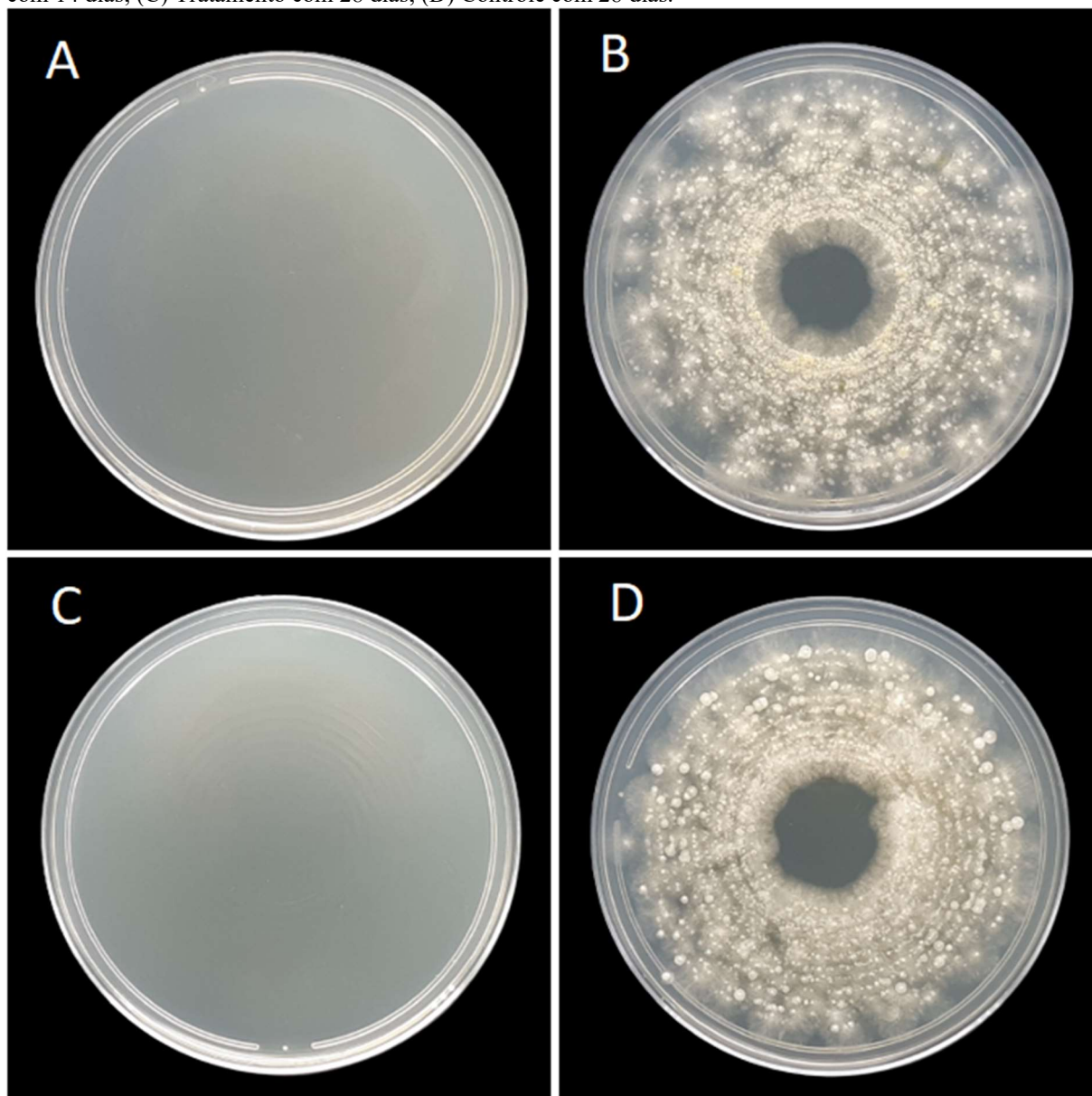
O ácido acético e o ácido propiônico controlaram 100% a viabilidade celular do *Aspergillus parasiticus*. Segundo Stratford *et al.* (2009), os ácidos, acético e propiônico, inibem o crescimento de fungos através da acidificação citoplasmática que por sua vez afetam a membrana fúngica. Esse mecanismo envolve a forma não dissociada dos ácidos que se difundem mais facilmente dentro das células.

Trabalho realizado por Scussel *et al.* (2011) avaliaram o potencial do gás ozônio, substância GRAS, no tratamento de castanha do Brasil associado ao empacotamento a vácuo para controle do *Aspergillus*. E de acordo com os resultados obtidos o tratamento reduziu a concentração de células de 1,8 x 10⁴ UFC/g para nenhum crescimento. Esse resultado corrobora com os resultados encontrado neste estudo, onde a concentração inoculada foi de 1,0x10⁶ UFC/ml e ao realizar o teste de viabilidade celular não foi observado nenhum crescimento do *Aspergillus parasiticus* inoculado nos tratamentos.

Além dos tratamentos isolados o tratamento utilizando a combinação entre os dois ácidos também se mostrou efetiva e inibiu o crescimento do fungo. De acordo com Houssni *et al.* (2023), o efeito inibitório de um ácido pode variar entre diferentes gêneros e até entre espécies de fungos. Por essa razão, a combinação sinérgica entre os ácidos pode frequentemente melhorar os resultados na inibição do crescimento fúngico. Resultado que corrobora com os encontrados por Dagnas *et al.* (2015), que observaram a inibição do crescimento de *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum* e *Eurotium repens* em comparação ao seu uso isolado quando tratados com a combinação de ácido acético, láctico e propiônico. A combinação de substâncias GRAS também tem como objetivo baratear o custo para a indústria alimentícia, visto que a combinação pode baratear consideravelmente o tratamento proposto.

A Figura 2Figura 7 mostra o resultado do controle e dos tratamentos no teste do tempo de permanência viável.

Figura 7 - Tempo de permanência viável do *Aspergillus parasiticus*. (A) Tratamento com 14 dias; (B) Controle com 14 dias; (C) Tratamento com 28 dias; (D) Controle com 28 dias.



Fonte: O autor (2022).

4.2.2 Quantificação das aflatoxinas

Os promissores resultados obtidos no teste de inibição de crescimento de *Aspergillus parasiticus*, demonstram a eficácia do uso de substâncias GRAS no controle da produção de aflatoxinas em milho contaminado ao longo de 28 dias de armazenamento. Os tratamentos foram realizados utilizando a maior concentração de ácido acético (0,15%) e a menor concentração de ácido propiônico (0,5%), e uma combinação de ambas. As amostras foram

avaliadas em três momentos distintos: 0, 14 e 28 dias de armazenamento, com o objetivo de verificar a variação nas concentrações de aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$) ao longo do tempo. Um grupo controle, sem aplicação de tratamentos, também foi incluído para comparação de resultados.

Os resultados obtidos na quantificação das aflatoxinas produzidas pelo *Aspergillus parasiticus* mostraram uma redução significativa na concentração das aflatoxinas no milho quando comparados os resultados dos tratamentos com os resultados dos controles, aos 14 e 28 dias de avaliação (Tabela 7).

Tabela 7 - Médias de concentrações de aflatoxinas em amostras de milho contaminadas com *Aspergillus parasiticus* (0, 14 e 28 dias), após tratamento com as substâncias GRAS.

Tratamentos	Concentração de aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$)		
	Tempo (dias)		
	0	14	28
Ácido acético (0,15%)	8,64 Aa	9,74Aa	12,30 Aa
Ácido propiônico (0,5%)	8,64 Aa	5,00 Aa	5,00 Aa
Ácido acético/ácido propiônico	8,64 Aa	4,14 Aa	4,02 Aa
Controle	8,64 Aa	285,18 Bb	294,00 Bb

*- Médias de concentração de aflatoxinas seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e, minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: O autor (2023).

Pelo preparo do inóculo ter sido realizado por lavagem da placa de Petri para captação dos conídios, esperava-se que toxinas liberadas no meio de cultura, bem como as aderidas as estruturas do *Aspergillus parasiticus*, se fizessem presentes na suspensão preparada. Para confirmar essa hipótese e servir de base para comparação com os resultados subsequentes, foi realizado o teste do controle no tempo 0, do dia da inoculação dos frascos e a média da concentração das aflatoxinas encontrada foi de $8,64\mu\text{g/kg}$. Sendo assim essa concentração inicial serviu como concentração padrão, e esse valor foi descontado de todos os resultados obtidos posteriormente.

A quantificação realizada nas amostras do controle no décimo quarto dia apresentaram um aumento expressivo na concentração de aflatoxinas, foi encontrada uma concentração média de $285,18\mu\text{g/kg}$. Quando comparamos com o resultado obtido no controle do tempo 0, vimos que as médias diferem estatisticamente entre si e que há um aumento significativo da concentração das aflatoxinas, esse aumento na concentração foi de 3.110%. Já a quantificação realizada no vigésimo oitavo dia mostra que a média da concentração foi de $294,00\mu\text{g/kg}$ e esta média não difere estatisticamente do valor da média do controle do décimo quarto dia, esse aumento na concentração foi de apenas 3,6%.

As amostras tratadas com ácido acético apresentaram um aumento gradual na concentração de aflatoxinas, passando de 8,64 µg/kg no início do experimento para 12,30 µg/kg após 28 dias. Embora esse aumento tenha sido evidente, as diferenças entre as médias de concentração de aflatoxinas ao longo do tempo não foram estatisticamente significativas. Esses resultados corroboram com os de Pornpukdeewattana *et al.* (2017), que observaram que o ácido acético foi eficaz tanto na inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* quanto na redução da produção de aflatoxinas em sementes de milho.

Os resultados dos testes realizados com ácido propiônico apresentaram uma redução nas concentrações de aflatoxinas após 14 dias, e essa redução também foi observada na leitura de resultado realizada nos frascos do vigésimo oitavo dia de tratamento. As médias de concentração de aflatoxinas para os tempos de 14 e 28 dias não diferiram significativamente entre si, indicando que o ácido propiônico teve um efeito inibitório duradouro sobre a produção de aflatoxinas.

Estes achados corroboram os de Singh *et al.* (2010), que relataram uma inibição completa da síntese de aflatoxinas AFB1 e AFB2 em amostras de ração contaminadas com *Aspergillus parasiticus* quando o ácido propiônico foi aplicado a uma concentração de 0,25%. A eficácia observada em ambos os estudos confirma o potencial do ácido propiônico como um agente inibidor da biossíntese de aflatoxinas, com possível aplicação em estratégias de preservação de alimentos.

A combinação de ácido acético e ácido propiônico resultou nas menores concentrações de aflatoxinas em todas as avaliações, com uma redução logo após 14 dias (4,14 µg/kg) e uma diminuição adicional, ainda que pequena, após 28 dias (4,02 µg/kg). Embora essa combinação não tenha sido amplamente investigada na literatura, nossos resultados sugerem um efeito sinérgico entre os dois ácidos, resultando em uma redução mais pronunciada das aflatoxinas em comparação com o uso isolado de cada ácido. Essa observação é consistente com o conceito de que combinações de compostos antimicrobianos podem amplificar a eficácia de tratamentos individuais, como também observado por Shehata *et al.* (2019), que relataram que o sobrenadante livre de células de *Lactobacillus* spp. foi capaz de reduzir a produção de aflatoxinas e inibir o crescimento de *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* em grãos de trigo.

Outras estratégias biológicas também tem sido exploradas de acordo com a literatura, como o uso de compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por leveduras. Zeidan *et al.* (2018) relataram uma redução de 82% na produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* quando exposto aos COVs de levedura, sugerindo que compostos voláteis podem ser uma

abordagem promissora para mitigar a contaminação por micotoxinas. Da mesma forma, Aghamohseni *et al.* (2022) demonstraram que a levedura *Candida albicans* foi eficaz na redução da produção de aflatoxinas B1 e totais em grãos de trigo, destacando o potencial do controle biológico como alternativa aos conservantes químicos.

Embora as abordagens biológicas mostrem potencial, os métodos químicos continuam a ser amplamente utilizados devido à sua facilidade de aplicação e eficácia comprovada. Ortiz *et al.* (2020) investigaram o uso de óleo essencial de alho (*Allium sativum* L.) como inibidor da produção de aflatoxinas em milho e a volatilidade do composto ao longo do tempo resultou em uma eficácia limitada na inibição de *Aspergillus parasiticus*. Este fato ressalta a importância de considerar a estabilidade dos compostos ativos ao longo do tempo, especialmente em condições de armazenamento prolongado.

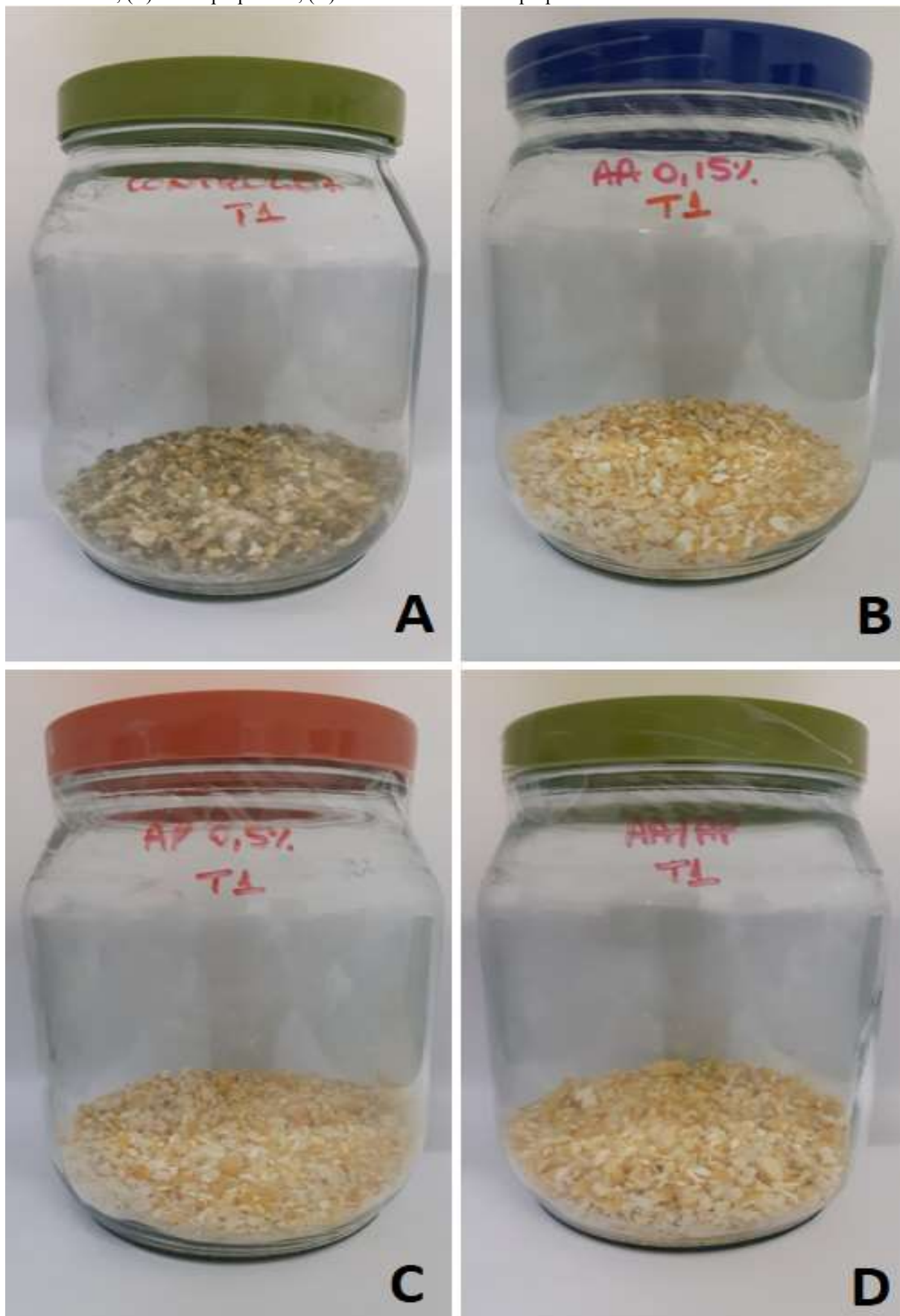
A ozonização também tem sido explorada como uma tecnologia emergente para o controle de micotoxinas. Kouchesfahani *et al.* (2015) relataram que a água ozonizada foi eficaz na eliminação das aflatoxinas AFG1 e AFG2 em amostras de trigo, embora a eficácia na redução de AFB1 tenha sido limitada, especialmente em temperaturas mais elevadas. Este estudo enfatiza a necessidade de ajustes nas concentrações de ozônio ou na combinação com outras estratégias para alcançar uma supressão mais completa das aflatoxinas em grãos.

Além disso, técnicas físicas como o uso de campo elétrico pulsado foram avaliadas por Bulut *et al.* (2020), que demonstraram uma inativação eficaz de patógenos fúngicos em sementes de gergelim, com uma redução significativa nas concentrações de aflatoxinas. Essa abordagem inovadora oferece uma alternativa promissora para o controle de micotoxinas, especialmente em produtos agrícolas.

A utilização de compostos naturais também tem mostrado resultados promissores. Hosseini *et al.* (2020) observaram uma redução significativa na produção de aflatoxinas em grãos tratados com extrato de própolis, destacando seu potencial como agente mitigador de micotoxinas em alimentos contaminados. De maneira semelhante, Nerilo *et al.* (2020) relataram que o óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe foi eficaz na inibição da produção de aflatoxinas em milho, com desempenho competitivo em relação aos antifúngicos convencionais.

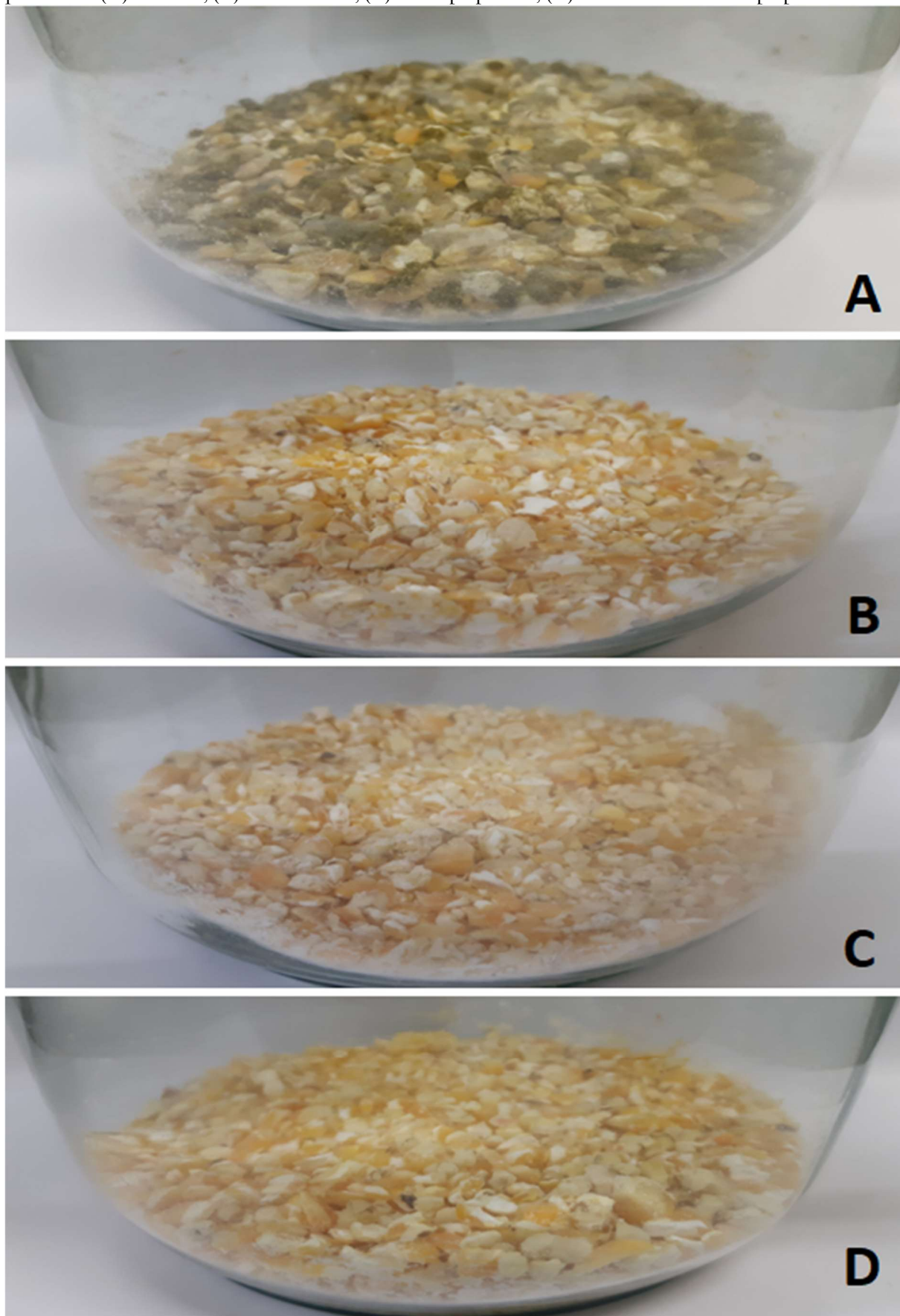
Flavonoides cítricos também foram avaliados como uma alternativa para o controle de contaminações por aflatoxinas. Poka *et al.* (2023) demonstraram uma redução de mais de 85% no acúmulo de aflatoxinas em milho com atividade de água de 0,95. Na Figura 8, Figura 9, Figura 10 e Figura 11 podemos observar macroscopicamente a infestação do *Aspergillus parasiticus* inoculado no milho.

Figura 8 - Frascos contendo milho com 14 dias após a inoculação de *Aspergillus parasiticus*. (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.



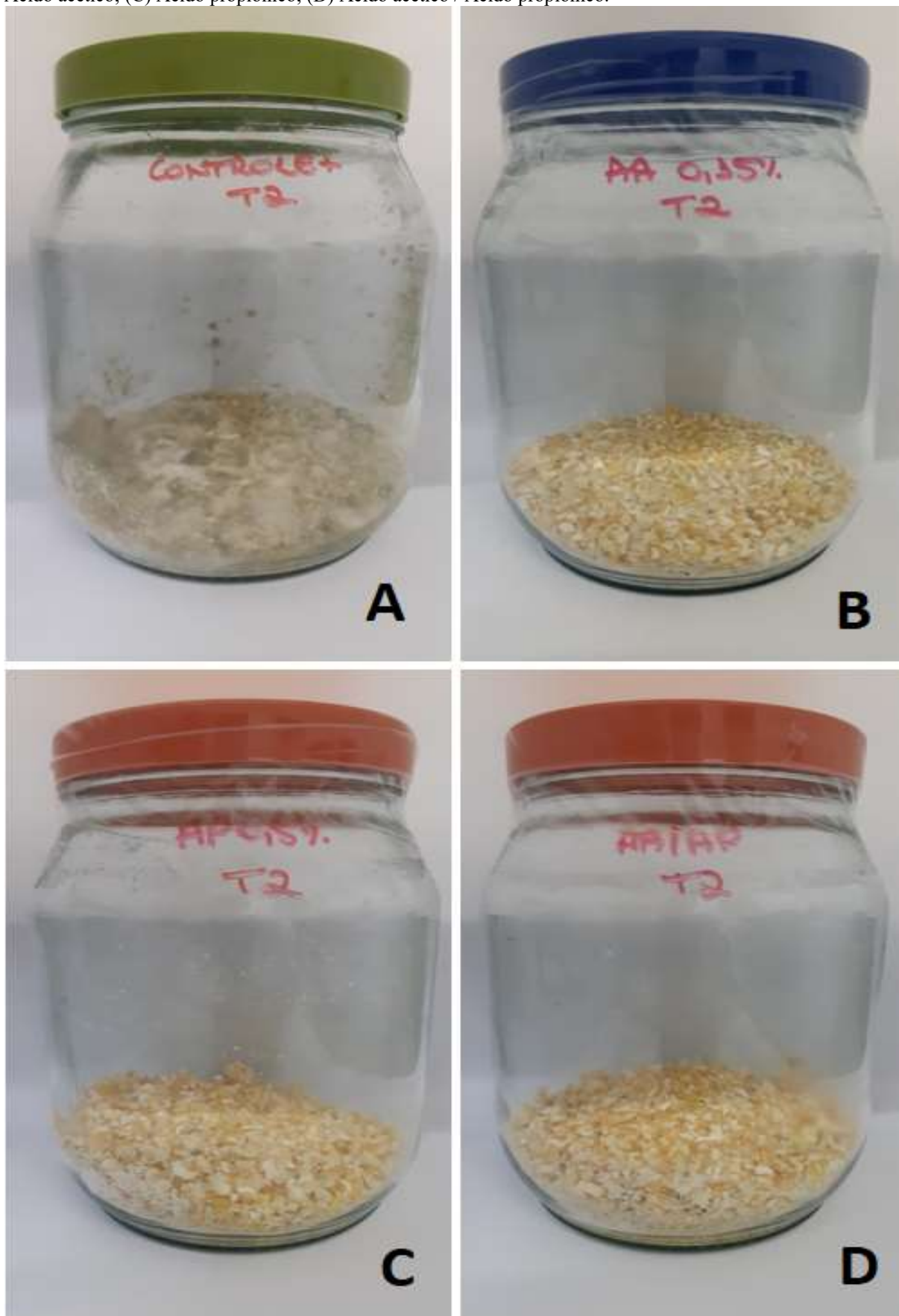
Fonte: O autor (2022).

Figura 9 - Vista aproximada dos frascos contendo milho com 14 dias após a inoculação de *Aspergillus parasiticus*. (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.



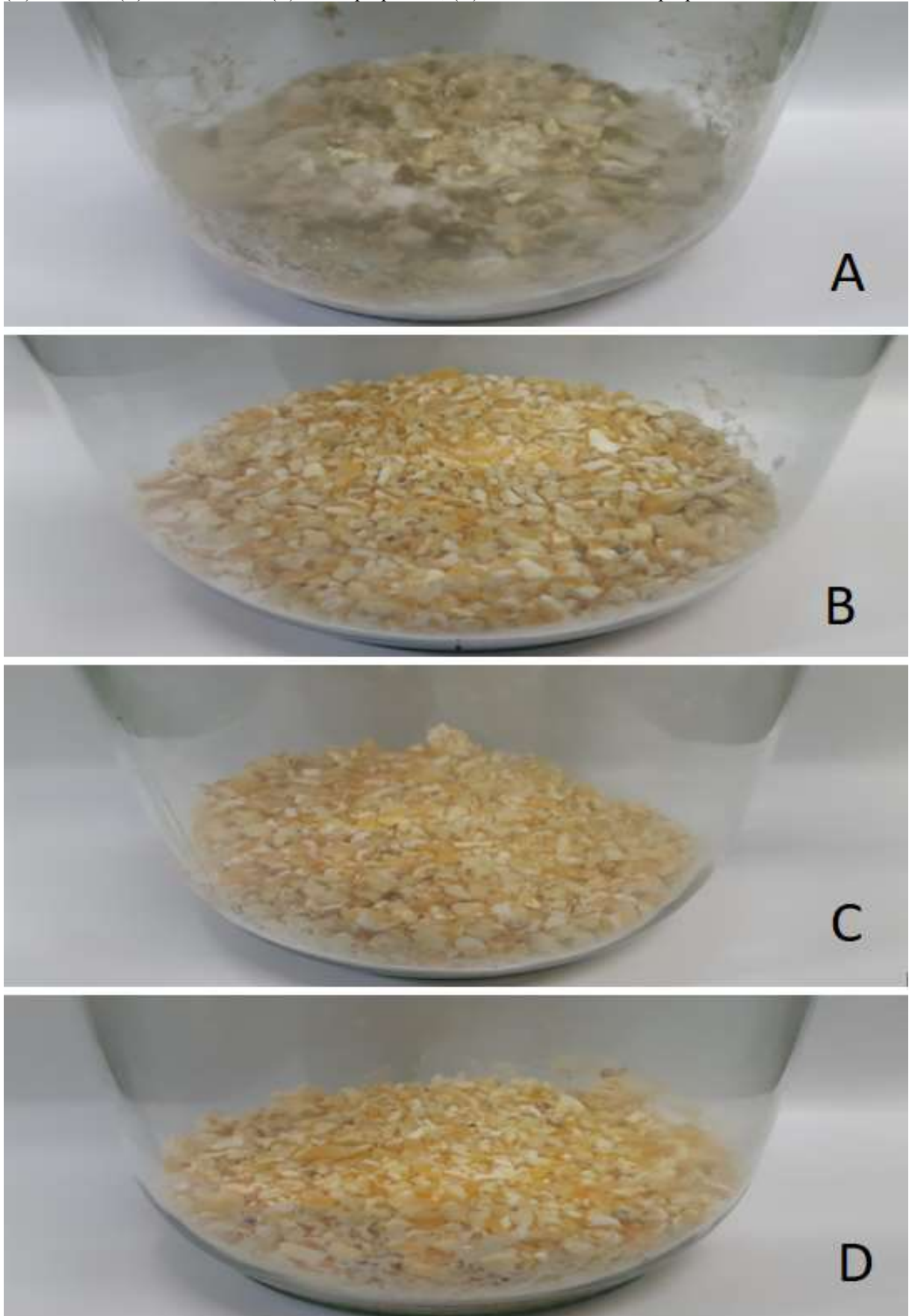
Fonte: O autor (2022).

Figura 10- Frascos contendo milho com 28 dias após a inoculação de *Aspergillus parasiticus*. (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético / Ácido propiônico.



Fonte: O autor (2022).

Figura 11 - Vista aproximada dos frascos contendo milho com 28 dias após a inoculação de *Aspergillus parasiticus*. (A) Controle; (B) Ácido acético; (C) Ácido propiônico; (D) Ácido acético/ Ácido propiônico.



Fonte: O autor (2022).

Diante dos resultados obtidos nos testes *in vivo*, é possível propor o uso de substâncias GRAS para o controle da produção de aflatoxinas. Ao analisar os custos das diferentes opções de tratamentos e considerando que estes seriam realizados em uma tonelada de grãos, o tratamento com ácido acético 0,15% se destaca como a opção mais econômica. O custo total estimado é de aproximadamente R\$65,79, considerando a quantidade necessária de 1,5 litros e o preço médio de R\$43,86 por litro.

Em contrapartida, o tratamento com ácido propiônico 0,5% apresenta um custo significativamente maior, de R\$452,05, devido à necessidade de 5 litros para o tratamento de uma tonelada de grãos. A combinação do ácido acético 0,15% com o ácido propiônico 0,5% é ainda mais onerosa, com um custo total de R\$517,94 por tonelada.

Quando se compara diretamente o ácido acético com o ácido propiônico, o ácido acético oferece uma economia de R\$386,26, o que representa uma redução de aproximadamente 85,43% no custo. Já em relação à combinação de ambos os ácidos, o uso exclusivo de ácido acético gera uma economia de R\$452,15, ou seja, uma redução de 87,29% no custo.

Portanto, o ácido acético se apresenta como a alternativa mais econômica para o tratamento de grãos, proporcionando uma economia significativa em comparação com as outras opções de tratamento avaliadas. No entanto, é importante observar que os valores utilizados nos cálculos são baseados em preços disponibilizados por comerciantes para a compra de apenas 1 litro de cada substância GRAS. Esses valores podem sofrer uma redução considerável ao se levar em conta o maior volume de compra necessário para tratar grandes quantidades de grãos. A compra em maior escala tende a oferecer condições comerciais mais favoráveis, com descontos progressivos, o que pode impactar significativamente o custo final dos tratamentos. (BERTRAND *et al.* 2021). Assim, embora o ácido acético tenha se mostrado a opção mais econômica nas simulações realizadas, a análise deve ser ajustada conforme as condições reais de mercado, onde a aquisição em grandes volumes pode também tornar as outras alternativas viáveis.

5 CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho podemos concluir que as substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), ácido acético e ácido propiônico são uma excelente alternativa para inibição do crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus* e a consequente redução na produção de aflatoxinas em milho. Os experimentos *in vitro* realizados com ácido acético na concentração 0,15% e com ácido propiônico nas concentrações 0,5%, 0,75% e 1,0% conseguiram inibir por completo o crescimento do fungo. Além disso, os testes *in vivo* realizados com o ácido acético 0,15%, ácido propiônico 0,5% e a mistura de ácido acético 0,15% / com ácido propiônico 0,5% mostraram uma redução significativa nas concentrações de aflatoxinas quando comparamos com o controle, após 28 dias de tratamento.

Os resultados encontrados demonstram que os tratamentos propostos são uma alternativa promissora ao uso de fungicidas sintéticos, e trazem benefícios através da promoção da segurança alimentar e da saúde pública. Além de minimizar as perdas econômicas provocadas pela contaminação dos grãos por aflatoxinas.

A proposta do tratamento mostra grande potencial para ser implementado em práticas agrícolas e de armazenamento de grãos. E assim concluímos que o método proposto foi capaz de cumprir com o objetivo principal do trabalho de ser uma estratégia de tratamento eficaz, segura e economicamente viável para inibir o crescimento do *Aspergillus parasiticus* e consequentemente reduzir a concentração de aflatoxinas produzidas em grãos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, E.; HASHEMI, S. M. B. Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. **Heliyon**, v. 6, n. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>.

ACHUGBU, A. D.; AMADI, J. E.; EKWEALOR, K. U. Pre- and post-harvest evaluation of approaches in controlling aflatoxin-producing fungi in maize (*Zea mays* L.): A review. **International Journal of Multidisciplinary Research and Growth Evaluation**, v. 03, n. 06, p. 542-548, 2022.

AGHAMOHSENI, Z. *et al.* Antifungal activity and detoxification by *Candida albicans* against *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 17, n. 04, p. 377–386, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00003-022-01381-1>.

AGRIOPOULOU, S.; STAMATELOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. **Foods**, v. 9, n. 02, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9020137>.

AHMADI, N.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MORTAZAVIAN, A. M. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, n. 01, p. 84-91, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.04.004>.

ALBUQUERQUE, A. C. M. *et al.* Production and characterization of ricotta cheese treated with lactase. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 08, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30300>.

ALKUWARI, A. *et al.* Occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in cereals and application of yeast volatiles for their biological control. **Toxins**, v. 14, n. 04, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins14060404>.

ALSAHEB, R. A. A. *et al.* Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 10, p. 729-735, 2015.

AMAKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 01, p. 107-133, 2011.

AMMAR, E. M. *et al.* Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii*: effect of expressing phosphoenolpyruvate carboxylase on propionic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 7761-7772, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5836-y>.

AMMAR, E. M. *et al.* Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* using sweet sorghum bagasse hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 22, p. 9619-9629, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10953-w>.

- AMMAR, E. M.; PHILIPPIDIS, G. P. Fermentative production of propionic acid: Prospects and limitations of microorganisms and substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 21, p. 7529-7544, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11499-1>.
- AMRUTHA, B. *et al.* Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 156-162, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.042>.
- ASGHAR, M. A. *et al.* Effects of climatic conditions and hermetic storage on the growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin B1 contamination in basmati rice. **Journal of Stored Products Research**, v. 96, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2022.101944>.
- BAIÃO, R. R. **Ácido Acético: Tecnologias e Análise de Mercado**. 2015. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro/EQ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- BANGAR, S. P. *et al.* Recent developments in applications of lactic acid bacteria against mycotoxin production and fungal contamination. **Food Bioscience**, v. 44, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101444>.
- BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 441–446, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530050953>.
- BARBOSA, J.C.; MALDONADO JR, W. **AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios Agronômicos**. Versão 1.1.0.694. Jaboticabal: Funep, 2011.
- BBOSA, G. S. *et al.* Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems: Aflatoxins-Recent advances and future prospects. Intechopen Publisher, v. 12, p. 239-265, 2013.
- BERTRAND, A. A.; DELONG, M. R.; CHANDAWARKAR, A.; ROBINSON, C. The Development and Commercialization of Medical Technologies. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 41, n. 12, p. 2020–2029, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/asj/sjaa424>.
- BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; DESTRO, D. Comparação de substratos utilizados para detecção de toxinas produzidas por *Aspergillus flavus* em soja. **Revista UNIMAR**, v. 19, n. 3, p. 709-719, 1997.
- BOCATE, K. P. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 79–86, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.012>.
- BØRSTING, C. F. *et al.* Enteric methane emission and digestion in dairy cows fed wheat or molasses. **Journal of Dairy Science**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16655>.
- BOXSTAEL, S. V. *et al.* Food safety issues in fresh produce: Bacterial pathogens, viruses and pesticide residues indicated as major concerns by stakeholders in the fresh produce chain. **Food Control**, v. 32, p. 190-197, 2013.

BRANDÃO, W. F.; HORNINK, G. G.; CUNHA, M. M. **Bactérias ácido acéticas (série microrganismos) - infográfico**. 2023. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25937.40808>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Instrução Normativa Nº 160. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**, 2022. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_160_2022_.pdf. Acesso em: 19 ago, 2022.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 2, de 08 de janeiro de 2004. **Aprova o uso do ácido peracético como coadjuvante de tecnologia na função de agente de controle de microrganismos em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final**. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, seção 1, n. 6, p. 28, 09 jan. 2004.

BUDAK *et al.* Functional Properties of Vinegar. **Journal of Food Science**, v, 79, n. 5, p. 757-764, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12434>.

BUITIMEA-CANTÚA, G. V. *et al.* Inhibitory effect of *Capsicum chinense* and *Piper nigrum* fruits, capsaicin and piperine on aflatoxins production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of aflD, aflM, aflR, and aflS genes of aflatoxins biosynthetic pathway. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 9, p. 835–843, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1787758>.

BULUT, N. *et al.* Potential of pulsed electric field to control *Aspergillus parasiticus*, aflatoxin and mutagenicity levels: Sesame seed quality. **Journal of Food Safety**, v. 40, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12855>.

CACERES, I. *et al.* Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. **Toxins**, v. 12, n. 150, 2020.

CHANG, J. M.; FANG, T. Survival of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157. **Food Microbiology**, v. 24, n. 7-8, p. 745-751, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.005>.

CHEN, J. *et al.* Propionic acid bacteria enhance ruminal feed degradation and reduce methane production in vitro. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/09064702.2020.1737215>.

CHEUNG, H.; TANKE, R. S.; TORRENCE, G. P. Acetic Acid. In: ULLMANN, F. (Org.). **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Reino Unido: Wiley-VCH, 2002.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2020/2021. 9º. Levantamento**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 18 jun. 2022.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/22, n. 10 décimo levantamento, julho 2022.

CONTE, G. *et al.* Mycotoxins in Feed and Food and the Role of Ozone in Their Detoxification and Degradation: An Update. **Toxins**, v. 12, n. 486, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12080486>.

CORAL, J. **Propionic acid production by *Propionibacterium* sp. using low-cost carbon sources in submerged fermentation**. Divisão de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. 39 p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Biometria**. 1st ed. Viçosa: UFV, 2006b

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes**. 1st ed. Viçosa: UFV, 2006a.

DAGNAS, S. *et al.* Quantifying effect of lactic, acetic, and propionic acids on growth of molds isolated from spoiled bakery products. **J. Food Protect**, v.78, p. 1689–1698, 2015.

DE ALBUQUERQUE, T. L. *et al.* Polylactic acid production from biotechnological routes: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 933-951, 2021.

DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115-119, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>.

DE VOGEL, P. *et al.* A rapid screening test for aflatoxin-synthesizing aspergilli of the *flavus-oryzae* group. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 28, p. 213-220, 1965.

DEL NOBILE, M. A. *et al.* Bio-based device to control active compound release for food preservation: the case of propionic acid. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12675>.

DESHMUKH, G.; MANYAR, H. Production Pathways of Acetic Acid and Its Versatile Applications in the Food Industry. IntechOpen, In book: **Biotechnological Applications of Biomass**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.92289>.

DEVI, Y. *et al.* Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. **Food Control**, v. 77, p. 187-191, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.019>.

DIETZ, D.; SABRA, W.; ZENG, A. P. Co-cultivation of *Lactobacillus zeae* and *Veillonella criceti* for the production of propionic acid. **AMB Express**, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-29>.

DISHISHA, T.; ALVAREZ, M. T.; HATTI-KAUL, R. Batch-and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.079>.

DÖVÉNYI-NAGY, T. *et al.* Pre-Harvest Modelling and Mitigation of Aflatoxins in Maize in a Changing Climatic Environment—A Review. **Toxins**, v. 12, n. 768, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12120768>.

EFSA - European Food Safety Authority. **Evaluation of the safety and efficacy of lactic acid to reduce microbiological surface contamination on carcasses from kangaroos, wild pigs, goats and sheep.** *EFSA Journal*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7265>.

EFSA - European Food Safety Authority. **Safety of lactic acid and calcium lactate when used as technological additives for all animal species.** *EFSA Journal*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5914>.

EFSA - European Food Safety Authority. **Scientific Opinion on the safety and efficacy of propionic acid, sodium propionate, calcium propionate and ammonium propionate for all animal species.** *EFSA Journal*, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2446>.

EFSA - European Food Safety Authority. **Scientific Opinion on the safety and efficacy of acetic acid, sodium diacetate and calcium acetate as preservatives for feed for all animal species.** *EFSA Journal*, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2571>.

ELIAS, M. C. *et al.* Avaliação do uso de ácidos orgânicos na conservação de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) durante o armazenamento. **Semina: Ciências Agrárias**, 2008.

EŞ, I.; KHANEGHAH, A. M.; HASHEMI, S. M. B.; KOUBAA, M. Current advances in biological production of propionic acid. **Biotechnology Letters**, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2293-6>.

FARAJI, H.; YAZDI, F. T.; RAZMI, N. The influence of ultraviolet radiation on aflatoxin producing *Aspergillus* species isolated from Iranian rice. *Toxicology Reports*, v. 9, p. 1528–1536, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.07.007>.

FARGHL, A. A. M.; EL-SHEEKH, M. M.; EL-SHAHIR, A. A. Seaweed extracts as biological control of aflatoxins produced by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 33, n. 50, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00696-x>.

FATEMI, F. *et al.* Changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity and expression of its class-P during prenatal and postnatal period in rats treated with aflatoxin B1. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 09, p. 572-579, 2006.

FDA - Food and Drug Administration. **Title 21 - Food and Drugs, Part 184 - Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe, Section 1081 - Propionic Acid.** Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1081>. Acesso em: fevereiro de 2024. Publicado originalmente no Federal Register em 3 de abril de 1984. Última atualização em: 22 de dezembro de 2023a.

FDA - Food and Drug Administration. **Title 21 - Food and Drugs, Part 184 - Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe, Section 1005 - Acetic Acid.** Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1005>. Acesso em: fevereiro de 2024. Publicado originalmente no Federal Register em 25 de junho de 1982. Última atualização em: 22 de dezembro de 2023b.

FENG, X. *et al.* Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.087>.

FERREIRA, D. F. **Sisvar - sistema de análise de variância para dados balanceados**. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.

FERREIRA, E. M. S. *et al.* Avaliação da resistência de leveduras biocontroladoras à substâncias “GRAS” - (Generally Regarded As Safe). **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 4, p. 178-182, 2015.

FOUAD, A. M. *et al.* Harmful Effects and Control Strategies of Aflatoxin B1 Produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Strains on Poultry: Review. **Toxins**, v. 11, n. 176, 2019.

FUZAWA, M. *et al.* The Basis of Peracetic Acid Inactivation Mechanisms for Rotavirus and Tulane Virus under Conditions Relevant for Vegetable Sanitation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 86, n. 19, p. 1095-20, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-20>.

GEBRIE S.A. Biotrophic Fungi Infection and Plant Defense Mechanism. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 7, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000378>.

GHAFFAR, T. *et al.* Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 222-229, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.03.002>.

GIZACHEW, D. *et al.* Aflatoxin B1 (AFB1) production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 296, p. 8-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.017>.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, n. 2, p. 157-168, 2010.

GÓMEZ-SALAZAR, J. A. *et al.* Postharvest strategies for decontamination of aflatoxins in cereals. **Food Reviews International**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2013254>.

GONZALEZ, G. G. **Ácido acético a partir de etanol na ausência de O₂ sobre catalisadores Cu, ZnO, ZrO₂ e Al₂O₃**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia e Ciências, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2017.

GONZÁLEZ-PONCE, H. A. *et al.* Natural dietary pigments: Potential mediators against hepatic damage induced by over-the-counter non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drugs. **Nutrients**, v. 10, n. 117, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10020117>.

GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W.; WILD, C. P. Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing Countries. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 187-203, 2018.

GSLC – Genetic Science Learning Center. **Evolution of corn**. 2017. Disponível em: <https://learn.genetics.utah.edu/content/evolution/corn>. Acesso em: 28 jul. 2022.

GU, Z.; GLATZ, B. A.; GLATZ, C. E. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 13-18, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00094-X).

HACKBART, H. C. S.; MACHADO, A. R.; CHRIST-RIBEIRO, A. Reduction of aflatoxins by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*. **Mycotoxin Research**, v. 30, p. 141–149, 2014.

HANVI, D. M. *et al.* Natural occurrence of mycotoxins in maize and sorghum in Togo. **Mycotoxin Research**, v. 35, p. 321–327, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00351-1>.

HARA, S.; FENNELL, D. I.; HESSELTINE, C. W. Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 1118-1123, 1974.

HASSAN, S. M. *et al.* Cellular Interactions, Metabolism, Assessment and Control of Aflatoxins: An Update. **Computational Biology and Bioinformatics**, v. 8, n. 2, p. 62-71, 2020. DOI: <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/cbb> DOI: 10.11648/j.cbb.20200802.15.

HEDAYATI, M. T. *et al.* *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 2007.

HERNANDEZ, C. *et al.* Mimosa tenuiflora aqueous extract: role of condensed tannins in anti-aflatoxin B1 activity in *Aspergillus flavus*. **Toxins**, v. 13, n. 6, 2021.

HOLMQUIST, G. U.; WALKER, H. W.; STAHR, H. M. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Food Science**, 1983.

HOPPANOVÁ, L. *et al.* Non-thermal plasma induces changes in aflatoxin production, devitalization, and surface chemistry of *Aspergillus parasiticus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 2107–2119, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11828-y>.

HOSSEINI, H. M. *et al.* The effect of propolis on inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth, aflatoxin production and expression of aflatoxin biosynthesis pathway genes. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 18, p. 297–302, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00467-y>.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1-51, 2011.

HOUSSNI, I. E. *et al.* The inhibitory effects of lactic acid bacteria isolated from sourdough on the mycotoxigenic fungi growth and mycotoxins from wheat bread. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102702>

HUANG, Y. *et al.* Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 33-36, 2010.

IARC. **Chemical Agents and Related Occupations**. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, v. 100F, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2012.

INDUSTRY ARC. **Propionic Acid Market Overview**. 2022. Disponível em: <https://www.industryarc.com/Research/Propionic-Acid-Market-Research-502874>. Acesso em: fevereiro de 2024.

INGRAO, C. *et al.* Bandejas de ácido polilático para embalagens de alimentos frescos: uma avaliação da pegada de carbono. **Science of the Total Environment**, v. 537, p. 385–398, 2015.

ISMAIL, A. *et al.* Aflatoxin in Foodstuffs: Occurrence and Recent Advances in Decontamination. **Food Research International**, v. 113, p. 74-85, 2018.

JAMSHIDIAN, M. *et al.* Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 552-571, 2010.

JIANG, L. *et al.* Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized *Propionibacterium acidipropionici* and the role of trehalose synthesis in acid tolerance. **Green Chemistry**, v. 17, p. 250-259, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4GC01256A>.

JOHNS, A. T. The Mechanism of Propionic Acid Formation by *Clostridium propionicum*. **Microbiology**, v. 6, p. 123-127, 1952. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-6-1-2-123>.

JOHNSTON, C. S.; GASS, C. A. Vinegar: Medicinal Uses and Antiglycemic Effect. **Medscape General Medicine**, 2006.

JOSÉ, J. F. B. Estratégias alternativas na higienização de frutas e hortaliças. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 3, p. 630-640, 2017. DOI: <https://doi.org/10.19084/RCA16124>.

JOSÉ, J. F. B. *et al.* Effect of ultrasound and chemical compounds on microbial contamination, physicochemical parameters and bioactive compounds of cherry tomatoes. **Italian Journal of Food Science**, v. 30, n. 3, p. 467-486, 2018. DOI: <https://doi.org/10.14674/IJFS-1015>.

KAGLIWAL, L. D. *et al.* Wheat flour based propionic acid fermentation: An economic approach. **Bioresource Technology**, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.154>.

KIM, J. *et al.* Lactic Acid for Green Chemical Industry: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. **Fermentation**, v. 8, n. 11, p. 609, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8110609>.

KOMESU, A. *et al.* Lactic Acid Production to Purification: A Review. **BioResources**, v. 12, n. 2, p. 4364-4383, 2017.

KONG, Q. *et al.* The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5161–5172, 2014.

KONLAMBIGUE, M. *et al.* Lessons Learned on Scaling Aflasafe® through Commercialization in Sub-Saharan Africa. **International Food Policy Research Institute**, 2020.

KORTEI, N. K. *et al.* The occurrence of aflatoxins and human health risk estimations in randomly obtained maize from some markets in Ghana. **Scientific Reports**, v. 11, n. 4295, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83751-7>.

KOUCHESFAHANI, M. M. *et al.* The *Antifungal* Effects of Ozonated Water on *Aspergillus parasiticus*: A new approach to prevent wheat contamination. **Journal of Food Safety**, v. 35, p. 295-302, 2015.

KRISHNA, B. *et al.* Industrial production of lactic acid and its applications. **International Journal of Biotechnology Research**, v. 1, n. 1, p. 42-54, 2018.

KUMAR, A. *et al.* Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 3, n. 17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00064-y>.

KUMAR, P. *et al.* Aflatoxins in cereals and cereal-based products: occurrence, toxicity, impact on human health, and their detoxification and management strategies. **Toxins**, v. 14, n. 687, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins14100687>.

KUMBHAR, G. B. *et al.* Different Routes for Production of Acetic Acid - A Case Study. **International Research Journal of Engineering and Technology**, 2019.

LEITE, M. *et al.* Maize food chain and mycotoxins: A review on occurrence studies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 307–331, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.045>.

LIAO, J. *et al.* A review on biosynthesis and genetic regulation of aflatoxin production by major *Aspergillus* fungi. **Oil Crop Science**, v. 5, p. 166–173, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2020.11.001>.

LIMA, K. R. **Perfil físico-químico de requeijão cremoso obtido a partir de diferentes coagulantes**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Rio Verde, GO, 2019.

LIN, M. T.; DIANESE, J. C. A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v. 66, p. 1466-1469, 1976.

LIN, W. C. *et al.* Inhibitory effect of CDA-II, a urinary preparation, on aflatoxin B(1)-induced oxidative stress and DNA damage in primary cultured rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 546-551, 2006.

LIU, L. *et al.* Improved production of propionic acid via combinational overexpression of glycerol dehydrogenase and malate dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* in *Propionibacterium jensenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03572-14>.

LIU, L. *et al.* Pathway engineering of *Propionibacterium jensenii* for improved production of propionic acid. **Scientific Reports**, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep19963>.

LIU, Z.; MA, C.; GAO, C.; XU, P. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.118>.

LOPEZ, M. E.; GARCIA, H. S.; MALO, L. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 713-721, 2012.

LORÁN, S. *et al.* Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production by natural essential oils and phenolic acids. **Toxins**, v. 14, n. 384, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins14060384>.

LUO, S. *et al.* Contamination status of major mycotoxins in agricultural products and food stuff in Europe. **Food Control**, v. 127, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108120>.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, p. 713-721, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.

MANYES, L. *et al.* In vitro antifungal activity of allyl isothiocyanate (AITC) against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum* and evaluation of the AITC estimated daily intake. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 293-299, 2015.

MARTINEZ, F. A. C. *et al.* Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 70-83, 2013.

MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A. *et al.* Sanitation of Fresh Green Asparagus and Green Onions Inoculated with *Salmonella*. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, n. 6, p. 454-462, 2009. DOI: <https://doi.org/10.17221/138/2008-CJFS>.

MASMOUDI, F. *et al.* Concepção de materiais de embalagem biodegradáveis baseados em amido e ácido polilático (PLA) reforçado com celulose. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 20904-20914, 2016.

MATEO, E. M. *et al.* Impact of bioactive packaging systems based on EVOH films and essential oils in the control of aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in maize. **International Journal of Food Microbiology**, v. 254, p. 36-46, 2017.

MCCORMICK, A.; LOEFFLER, J.; EBEL, F. *Aspergillus fumigatus*: Contours of an opportunistic human pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 1535-1543, 2010.

MEHMOOD, N. *et al.* Carcinogenic Properties of Aflatoxins in Maize Production and Recent Technologies Involved. **Austin Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 9, n. 2, 2021.

MEKAWEY, A. A. I.; EL-METWALLY, M. M. Impact of nanoencapsulated natural bioactive phenolic metabolites on chitosan nanoparticles as aflatoxins inhibitor. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, p. 599-608, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800481>.

MILICEVIC', D. R., ŠKRINJAR, M., BALTIC', T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control. **Toxins**, v. 2, p. 572-592, 2010.

MIR, S. A. *et al.* Recent developments for controlling microbial contamination of nuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, p. 6710-6722, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2038077>.

MØLLER, C. O. A. *et al.* Effect of Lactic Acid Bacteria Strains on the Growth and Aflatoxin Production Potential of *Aspergillus parasiticus*, and Their Ability to Bind Aflatoxin B1, Ochratoxin A, and Zearalenone in vitro. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655386>.

MÖLLER, H. *et al.* Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52 (21), p. 6585-6591, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0306690>.

MONTEIRO, E. R.; TIECHER, A. Sanitização de frutas e hortaliças: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 36, n. 295, p. e1106, 2022. DOI: <https://doi.org/10.37585/HA2022.02frutas>.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho do mercado América do Sul Ácido láctico e Análise de participação - Tendências de crescimento e Previsões (2023 - 2028)**. 2024c. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/south-america-lactic-acid-market>. Acesso em: fevereiro de 2024.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho do mercado de ácido acético e análise de ações - Tendências e previsões de crescimento (2023 - 2028)**. 2024a. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/acetac-acid-market>. Acesso em: fevereiro de 2024.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho do mercado de ácido láctico e análise de ações - Tendências e previsões de crescimento (2023 - 2028)**. 2024b. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/lactic-acid-market>. Acesso em: fevereiro de 2024.

NERILO, S. B. *et al.* Antifungal activity and inhibition of aflatoxins production by *Zingiber officinale* Roscoe essential oil against *Aspergillus flavus* in stored maize grains. **Ciência Rural**, v. 50, n. 6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190779>.

NEUMANN, P. S.; ROSA, T. R. Ácidos orgânicos de cadeia curta: eficácia no controle higiênico sanitário usado como sanitizante de frutas e hortaliças. **Redes - Revista Interdisciplinar do IELUSC**, v. 1, n. 1, p. 33-46, 2018.

OJO, A. O.; DE SMIDT, O. Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 688, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr11030688>.

ORTIZ, M. A. V. *et al.* Garlic (*Allium sativum* L.) essential oil against growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 23, n. 32, 2020.

PAGE, L. H. *et al.* Characteristics of volatile fatty acids in stored dairy manure before and after anaerobic digestion. **Biosystems Engineering**, v. 118, p. 16-28, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2013.11.004>.

PANKAJ, S. K.; SHI, H.; KEENER, K. M. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 73-83, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.007>.

PATYKA, V. *et al.* Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. **Ecological Chemistry and Engineering**, v. 23, n. 2, p. 311-31, 2016.

PEDROSO, C. R.; BATISTA, F. L. O uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais. **Saúde & Ciência em Ação: Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, 2017.

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

PILDAIN, M. B. *et al.* Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentine peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 725-735, 2008.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15.ed. Piracicaba: FEALQ, 2009. 451p

PIZZOLITTO, R. P. *et al.* Inhibitory Effect of Natural Phenolic Compounds on *Aspergillus parasiticus* Growth. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

PLEISSNER, D. *et al.* Direct production of lactic acid based on simultaneous saccharification and fermentation of mixed restaurant food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 615-623, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.065>.

POK, P. S. *et al.* Evaluation of citrus flavonoids against *Aspergillus parasiticus* in maize: Aflatoxins reduction and ultrastructure alterations. **Food Chemistry**, v. 318, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126414>.

PORNPUKDEEWATTANA, S. *et al.* Upland rice vinegar vapor inhibits spore germination, hyphal growth and aflatoxin formation in *Aspergillus flavus* on maize grains. **Food Control**, v. 71, p. 88-93, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.030>.

PRIESTERJAHN, E.-M., GEISEN, R., SCHMIDT-HEYDT, M. Influence of Light and Water Activity on Growth and Mycotoxin Formation of Selected Isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Microorganisms**, v. 8, 2020.

RANAEI, V. *et al.* Propionic Acid: Method of Production, Current State and Perspectives. **Food Technology and Biotechnology**, v. 58, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6356>.

RANGEL, M. A. S.; VILLELA, F. A. Conservação de sementes de soja pela aplicação de produtos à base de ácido propiônico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222004000100009>.

RAO, K. P. *et al.* Antiaflatoxicogenic Potential of Cell-Free Supernatant from *Lactobacillus plantarum* MYS44 Against *Aspergillus parasiticus*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 55–64, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9338-y>.

REBONATTO, B. *et al.* Sinergismo entre ácidos orgânicos e sorbato de potássio no controle de *Aspergillus flavus*. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 3, p. 114–125, 2018.

REN, X., ZHANG, Q., ZHANG, W., MAO, J., LI, P. Control of Aflatoxigenic Molds by Antagonistic Microorganisms: Inhibitory Behaviors, Bioactive Compounds, Related Mechanisms, and Influencing Factors. **Toxins**, v. 12, n. 24, 2020.

SÁNCHEZ-ORTEGA, I. *et al.* Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. **Scientific World Journal**, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/248935>.

SARAIVA, B. M.; FERNANDEZ, E. C. A. M.; FERNANDEZ, A. T. Avaliação da eficiência antibacteriana de fermentados acéticos comerciais em saladas de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Duque de Caxias, Rio de Janeiro. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 7, n. 3, p. 53-59, 2019. DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01298>.

SARITA, B. A. K., SINGH, R. Seed borne mycoflora of mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) and its control by fungicides. **Advances in Applied Science Research**, v. 5, n. 6, p. 8-10, 2014.

SCUSSEL, V. M. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled Brazil nuts during storage. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2011, 9 pages, 2011.

SEGURA-PALACIOS, M. A. *et al.* Use of Natural Products on the Control of *Aspergillus flavus* and Production of Aflatoxins In Vitro and on Tomato Fruit. **Plants**, v. 10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10122553>.

SELDER, L. *et al.* Co-cultures with integrated in situ product removal for lactate-based propionic acid production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 1027-1035, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02300-0>.

SHABEER, S. *et al.* Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review. **Toxins**, v. 14, n. 307, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins14050307>.

SHEHATA, M. G. *et al.* Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, p. 71-78, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2019.05.002>.

SILVA, J. F. M. *et al.* Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains. **The Scientific World Journal**, v. 15, 2015.

SILVA, J. F. M. *et al.* Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, v. 74, n. 4, p. 467-475, 2015.

SILVA, P.; DUPIM, M.; CHAZIM, E. Métodos de preparação industrial de solventes e reagentes químicos: ácido acético (CAS 64-19-7). **Revista Virtual de Química**, 2015.

SINGH, R., SHRIVASTAV, H. P., SHRIVASTAV, A. K. Mycotoxin contamination in maize as poultry feed. **Indian Journal of Poultry Science**, v.45, n.108-110, 2010.

SINGHVI, M. S.; ZINJARDE, S. S.; GOKHALE, D. V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1612-1626, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14290>.

SINTIM, H. Y. *et al.* Liberação de micro e nanopartículas de plástico biodegradável durante a compostagem in situ. **Science of the Total Environment**, v. 675, p. 686-693, 2019.

SOARES, E. F.; PRADO, G. R. **Eficácia microbiana e parasitária de sanitizantes à base de cloro e ácido acético em alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão e Controle de Qualidade de Alimentos) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Unidade Universitária Cruz Alta.

STANOJEVIC-NIKOLIC *et al.* Antimicrobial activity of lactic acid against pathogen and spoilage microorganisms. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, p. 990-998, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12679>.

STATISTA RESEARCH DEPARTMENT. **Global propionic acid market volume 2015-2030**. 2023. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/1245247/propionic-acid-market-volume-worldwide/>. Acesso em: fevereiro de 2024.

STRATFORD, M. *et al.* Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **Int. J. Food Microbiol**, v. 136, p. 37-43, 2009.

SULTANA, B.; NASEER, R.; NIGAM, P. Utilization of agro-wastes to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus parasiticus*: A biotreatment of three cereals for safe long-term storage. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 443-450, 2015.

SUN, Q. *et al.* Cinnamaldehyde inhibits fungal growth and aflatoxin B1 biosynthesis by modulating the oxidative stress response of *Aspergillus flavus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1355-1364, 2016.

TANG, J. *et al.* Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. **Waste Management**, v. 52, p. 278-285, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.034>.

TARAZONA, A. *et al.* Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. **Food Control**, v. 118, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107370>.

TIWARI, S. *et al.* Boosting modern technologies with emphasis on biological approaches to potentiate prevention and control of aflatoxins: recent advances. **Toxin Reviews**, v. 41, n. 3, p. 1007-1017, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1933534>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 13. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UDOMKUN, P. *et al.* Innovative Technologies to Manage Aflatoxins in Foods and Feeds and the Profitability of Application: A Review. **Food Control**, v. 76, p. 127-138, 2017.

USDA - United States Department of Agriculture and FSIS. **3º Levantamento anual da safra mundial de milho 2022/2023**. 2022.

VERMA, R. J. Aflatoxin cause DNA damage. **International Journal of Human Genetics**, v. 4, p. 231-236, 2004.

VOULGARI, K. *et al.* Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, v. 21, p. 136-142, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.04.007>.

WANG, P.; JIAO, Y.; LIU, S. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 1811-1815, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1513-5>.

WANG, X. *et al.* Propionic acid production from corn stover hydrolysate by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0884-z>.

WASEWAR, K. L. Separation of Lactic Acid: Recent Advances. **Chemical and Biochemical Engineering**, v. 19, p. 159-172, 2005.

WEE, J.; DAY, D. M.; LINZ, J. E. Effects of Zinc Chelators on Aflatoxin Production in *Aspergillus parasiticus*. **Toxins**, v. 17, 2016.

WEE, Y.-J.; KIM, J.-N.; RYU, H.-W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, 2006.

WU, Q. *et al.* Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, p. 1-7, 2009.

WU, Y.; CHENG, J.; SUN, D. Blocking and degradation of aflatoxins by cold plasma treatments: Applications and mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 647-661, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.053>.

YANG, H. *et al.* Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>.

YANG, S.-T.; ZHU, H.; LI, Y.; HONG, G. Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 1124-1130, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.260431117>.

YILMA, S.; SADESSA, K.; KEBEDE, D. Fungal Infections and Aflatoxin Contamination in Maize Grains Collected from West Showa and East Wallega Zones, Ethiopia. **International Journal of Current Research and Review**, v. 11, n. 21, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.31782/IJCRR.2019.11213>.

YIN, H. *et al.* Hydrothermal conversion of glycerol to lactic acid catalyzed by Cu/hydroxyapatite, Cu/MgO, and Cu/ZrO₂ and reaction kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 288, p. 332-343, 2016.

YIN, Y. N. *et al.* Biological control of aflatoxin contamination of crops. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 9, p. 787-792, 2008.

YOGENDRARAJAH, P. *et al.* Mycotoxin production and predictive modelling kinetics on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates in whole black peppercorns (*Piper nigrum* L). **International Journal of Food Microbiology**, v. 228, p. 44-57, 2016.

ZAHIJA, I. *et al.* Production of Aflatoxin B1 by *Aspergillus parasiticus* Grown on a Novel Meat-Based Media. **Toxins**, v. 15, n. 25, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins15010025>.

ZEIDAN, R. *et al.* Application of Low-Fermenting Yeast *Lachancea thermotolerans* for the Control of Toxigenic Fungi *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum* and *Fusarium graminearum* and Their Mycotoxins. **Toxins**, v. 10, 2018.

ZHANG, S.; FARBER, J. M. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 311-321, 1996.

ZHANG, Z. Y. *et al.* Dietary aflatoxin impairs flesh quality through reducing nutritional value and changing myofiber characteristics in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 274, 2021.

ZHAO, J.; WILKINS, R. M. Low molecular weight polylactic acid as a matrix for the delayed release of pesticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4076-4082, 2005.

ZHENG, A.; ZHANG, L.; WANG, S. Verification of radio frequency pasteurization treatment for controlling *Aspergillus parasiticus* on corn grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 249, p. 27-34, 2017.