Ozonização de “leite vegetal” de amendoim para degradação de aflatoxinas

Alessandra de Cássia Romero¹, Pedro Esteves Duarte Augusto^{1,2}, Maria Antonia Calori-Domingues³

Resumo

Dentre os produtos plant-based, os “leites vegetais” são produtos obtidos a partir de grãos e que vem crescendo em disponibilidade no mercado, seja em quantidade de marcas ou de tipos de produtos. Entretanto, considerando sua origem a partir de grãos, os leites vegetais podem apresentar contaminação por micotoxinas. Assim, além de atender à exigência dos consumidores quanto aos aspectos sensoriais e nutricionais, os leites vegetais devem também assegurar a ausência de contaminação por micotoxinas. Dentre as técnicas para destoxificação de produtos contaminados, a ozonização tem mostrado bons resultados para a redução de micotoxinas. Assim, neste estudo objetivou-se avaliar a ozonização do “leite de amendoim” para redução das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. As replicatas foram realizadas com coletas para a análise da redução da concentração das aflatoxinas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 min. AFB₁ e AFG₁ foram degradadas em 30 min enquanto AFB₂ e AFG₂ tiveram uma redução máxima, ao final de 210 min, de 32 e 41%, respectivamente. O consumo de ozônio foi mais intenso nos 30 primeiros min da reação, apresentando tendência a estabilidade a partir de 60 min, sugerindo que os compostos mais sensíveis a oxidação foram reduzidos nessa etapa inicial.

Palavras-chave: oxidação, destoxificação, micotoxinas, ozônio, plant-based.

Introdução

O mercado de produtos de origem vegetal vem se expandindo ao longo dos anos por estes serem uma alternativa de oferta de nutrientes em substituição ao consumo de produtos de origem animal para os públicos vegetariano e vegano. Pesquisas realizadas pela indústria apontam que 90% dos brasileiros demonstram interesse em consumir produtos plant-based (ABRAS, 2020).

Para atender a nova demanda desse público considerado exigente e diferenciado, produtos tipo “leite vegetal” a base de soja, amendoim, castanhas, avelã, nozes, arroz, coco, aveia, entre outros, tem sido desenvolvidos por diversas empresas. Entretanto, além dos quesitos sensoriais e nutricionais, os leites vegetais devem atender a segurança quanto à ausência de contaminantes naturais, como as micotoxinas.

Micotoxinas são compostos de origem fúngico com amplo espectro de toxicidade e podem, além dos reconhecidos riscos em potencial à saúde dos consumidores, representar um entrave para a conquista de mercado desses produtos.

Os “leites vegetais” são obtidos por meio do processamento de seus respectivos grãos adicionados a partir da trituração e homogeneização em água. Diferentes processos foram descritos para essa produção, incluindo etapas de torração, moagem, extração de óleo, entre outros, dependendo do tipo de grão ou produto vegetal a ser utilizado (DIARRA et al., 2007). Durante esse processamento, se houver presença de micotoxinas nos grãos, esses compostos podem ser arrastados para o leite, constituindo uma fonte de exposição até então não mensurada.

Os grãos utilizados para a obtenção de leites vegetais, tais como soja, arroz, aveia, amendoim, entre outros, podem estar contaminados com uma ou mais micotoxinas (PALUMBO et al., 2020). Em grãos de amendoim a presença de aflatoxinas já foi amplamente reportada na literatura (MAGRINI et al., 2011; HOELTZ et al., 2012), aumentando a importância dos estudos de rastreamento da contaminação nesses produtos e em seus derivados.

As aflatoxinas são compostos carcinogênicos e imunossupressores, os quais tem sua presença limitada em grãos (20 µg/kg para amendoim) e em leite bovino (0,5 µg/kg leite fluido, 5 µg/kg leite em pó) pela legislação brasileira (BRASIL, 2011). Entretanto não existem normativas para os produtos tipo “leite” de origem vegetal. É importante ressaltar que a presença de aflatoxinas em leite de origem animal é principalmente do tipo AFM₁, enquanto que em grãos elas podem ocorrer nos subtipos AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. A aflatoxina AFM₁ é um metabólito hidroxilado da aflatoxina AFB₁, excretada no leite em concentrações menores do que as de sua precursora e com menor potência do que a AFB₁ (JECFA, 2001). Embora não existam estudos sobre a ocorrência de micotoxinas em leites vegetais, é possível inferir que, caso a matéria prima esteja contaminada, essa contaminação poderia ser arrastada para o leite. Para reduzir esse risco, a ozonização pode ser uma alternativa para destoxificação do “leite de amendoim” durante ou após o preparo do produto.

A ozonização como técnica de destoxificação tem se mostrado um eficiente oxidante utilizado para diversos fins, desde a descontaminação de efluentes residuais a alimentos sólidos

¹Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: acromero@usp.br.

²Úcleo de Pesquisas Avançadas em Alimentos e Nutrição (NAPAN), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

³Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Laboratório de Biologia Molecular e Micotoxinas. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP). Avenida Pádua Dias, 11, Piracicaba, São Paulo, Brasil. 13418-900.

ou líquidos (PANDIESELVAM et al., 2019, ALEXANDRE et al., 2017). Diversos estudos avaliaram o uso do ozônio para redução de micotoxinas em grãos *in natura* e em produtos industrializados, mas os níveis de redução obtidos são bastante variáveis em função dos parâmetros utilizados para a ozonização e das micotoxinas avaliadas (AFSAH-HEJRI et al., 2020). Assim, o objetivo desse estudo é avaliar a cinética de degradação das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em “leite de amendoim”.

Material e Métodos

A ozonização foi realizada utilizando amostras comerciais de “leite de amendoim”, da mesma marca, lote e data de validade adquiridas no comércio da região de Piracicaba – SP. O processamento por ozônio foi realizado utilizando um sistema composto por uma unidade geradora de ozônio (Ozone & Life, O&G Model RM 3.0, São José dos Campos, Brasil) e um monitor equipado com software para mensurar as concentrações de ozônio (2B Technologies Inc., 106-H). O fluxo de gás foi de 1,0 L/min e a concentração de ozônio foi de 47 mg/L. A amostra de “leite de amendoim” (700 mL) foi artificialmente contaminada empregando uma mistura de padrões das aflatoxinas (Sigma Aldrich), obtendo-se a concentração média de aflatoxinas totais (AF_T) de 170 µg/L (AFB₁ = 43 µg/L; AFB₂ = 38 µg/L; AFG₁ = 59 µg/L; AFG₂ = 30 µg/L). O processamento por ozônio foi realizado com coletas de alíquotas do “leite de amendoim” para análise nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 min, a fim de avaliar a redução da concentração inicial das micotoxinas em relação aos tempos de tratamento. Foram realizadas três repetições, com coletas nos onze tempos avaliados.

A extração de aflatoxinas foi realizada pela adição de metanol no leite na proporção 2:3 (leite:metanol, v/v) e agitação mecânica por 30 min (Marconi, MA 139/CFT, Piracicaba, Brazil) seguida de filtração em papel de filtro. A purificação do extrato após diluição (2:3, extrato:tampão, v/v), e centrifugação a 10.000 G durante 10 min (Eppendorf, MiniSpin® plus, Germany), foi realizada empregando NeoColumn™ para Aflatoxinas da marca Neogen. A eluição foi realizada com metanol: acetonitrila (1:1 v/v). A cromatografia foi realizada utilizando um HPLC Shimadzu equipado com detector de fluorescência (RF-20AXL) à 440

nm emissão e 362 nm excitação e coluna X-Terra RP18 (4.6 x 150mm, 5 µm, Waters, Milford, MA, USA).

Os resultados foram avaliados estatisticamente (SAS University Edition, 2021) por Anova e teste de Tukey (0,05% de significância) a fim de verificar se os diferentes tempos de ozonização produziram reduções significativas na concentração das aflatoxinas analisadas.

Resultados e Discussão

As reduções das concentrações iniciais (0 min) das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em cada um dos tempos de ozonização avaliados (5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 min) foram obtidas por meio de uma relação entre a concentração da respectiva aflatoxina obtida após cada um dos tempos analisados e a sua concentração inicial (C/C₀).

No presente estudo, observou-se que nos primeiros 5 min de processamento, a AFG₁ apresentou uma redução significativa ($P < 0,0001$) de 53%, enquanto AFB₁ de 43%, mostrando-se mais suscetíveis a oxidação pelo ozônio. Por outro lado, AFB₂ e AFG₂ se mostraram mais resistentes à degradação pelo ozônio, assim como já reportado na literatura (AGRIPOLU et al., 2016).

As aflatoxinas AFB₁ e AFG₁ foram reduzidas em até 30 min de ozonização a valores inferiores ao limite de detecção da metodologia (LD = 0,11 µg/L para AFB₁ e AFG₁ e LD = 0,07 µg/L para AFB₂ e AFG₂, respectivamente). Por outro lado, as aflatoxinas AFB₂ e AFG₂, apresentaram redução máxima de 41% para AFG₂ e de 32% para AFB₂ após 210 min de ozonização. As curvas da cinética de degradação das aflatoxinas em “leite de amendoim” são apresentadas na Figura 1.

Para AFB₁ e AFG₁, de maneira geral, todos os tratamentos produziram reduções significativas em relação a concentração inicial. Já AFB₂ e AFG₂ apresentaram maior variabilidade entre os resultados das replicatas do que as AFB₁ e AFG₁, o que pode ter contribuído para a ausência de significância nas reduções até os tempos 30 e 90 min (AFG₂ e AFB₂, respectivamente), juntamente com a maior resistência dessas micotoxinas a oxidação pelo ozônio (Tabela 1).

Figura 1: Cinética de degradação AFB₁ e AFB₂ (esquerda) e G₁ e G₂ (direita). Concentrações iniciais: AFB₁ = 43 µg/L; AFB₂ = 38 µg/L; AFG₁ = 59 µg/L; AFG₂ = 30 µg/L.

Tabela 1: Redução (%) das aflatoxinas e do consumo médio de ozônio ao longo do processamento

Tempo de Ozonização (min)	Redução (%) da concentração das Aflatoxinas				[mg/L] O ₃ Consumido
	B1	B2	G1	G2	
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	45,0
5	15 ^b	1 ^{ab}	18 ^b	2 ^{ab}	32,0
10	71 ^c	4 ^{ab}	81 ^c	3 ^a	29,6
20	92 ^d	5 ^{ab}	96 ^d	6 ^{ab}	27,4
30	98 ^e	11 ^{ab}	99 ^{de}	14 ^{abc}	26,2
60	99 ^e	19 ^{ab}	>LD ^{e**}	27 ^c	24,8
90	99 ^e	21 ^{bc}	>LD ^e	24 ^{bc}	24,2
120	99 ^e	24 ^{bc}	>LD ^e	29 ^c	23,5
150	99 ^e	27 ^{cd}	>LD ^e	32 ^{cd}	22,6
180	99 ^e	32 ^{cd}	>LD ^e	37 ^d	21,9
210	99 ^e	32 ^d	>LD ^e	41 ^d	21,3

*letras iguais na mesma coluna representam que não houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$). ** LD = 0,11 µg/L para AFB₁ e AFG₁ e LD = 0,07 µg/L para AFB₂ e AFG₂, respectivamente.

O ozônio consumido pode ser mensurado por meio da diferença entre a concentração de ozônio produzido (medida realizada na entrada do reator) e a concentração de ozônio excedente (medida realizada na saída do reator). Na Figura 2 observa-

se que houve um menor excedente de ozônio no início do processo de ozonização, o que representa que houve um maior consumo de ozônio.

Assim, podemos inferir que a reação do ozônio ocorre com maior intensidade no início do processamento, assim como ocorre com a redução da concentração das aflatoxinas AFB₁ e AFG₁. Após 30 min, a reação parece atingir um certo equilíbrio até o final do processamento, sugerindo que os componentes mais sensíveis a oxidação foram consumidos durante essa etapa da reação.

Conclusões

As aflatoxinas AFB₁ e AFG₁ foram totalmente degradadas pelo ozônio após 30 min de tratamento. As aflatoxinas AFB₂ e AFG₂ se mostraram resistentes ao tratamento, com reduções máximas de 42% para AFB₂ e 31% para AFG₂. O

consumo de ozônio durante o processamento foi mais intenso nos 30 primeiros min do processo e atinge uma certa tendência a uma estabilidade a partir de 60 min, sugerindo que os compostos mais sensíveis a oxidação foram reduzidos nessa etapa inicial.

Figura 2: Concentração de ozônio produzida, excedente (à esquerda) e consumida ao longo do processamento de ozonização do "leite de amendoim" (à direita).

Referências

ABRAS – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SUPERMERCADOS PORTAL. *Pesquisa mostra que 90% dos brasileiros tem interesse em alimentos vegetais*. 2020. Disponível em: <https://www.abras.com.br/clipping/geral/71654/pesquisa-mostra-que-90-dos-brasileiros-tem-interesse-em-alimentos-vegetais>. Acesso em: 16/04/21.

AFSAH-HEJRI, L.; HAJEB, P.; EHSANI, R.J. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.19, 1777-1808.

ALEXANDRE, A.P.S.; CASTANHA, N.; AUGUSTO, P.E.D.; CALORI-DOMINGUES, M.A. Ozonation of whole wheat flour and wet milling effluent: degradation of deoxynivalenol (DON) and rheological properties. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v.52, n.7, 516-524, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC n.7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos*. Diário Oficial da União, n.37, de 22/02/2011, seção 1, 72, 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acesso em: 27/04/21.

DIARRA, K.; NONG, Z.G.; JIE, C. Peanut milk and peanut milk based products production: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, 405-423, 2005.

HOELTZ, M.; EINLOFT, T.C.; OLDONI, V.P.; DOTTORI, H.A.; NOLL, I.B. The occurrence of aflatoxin B1 contamination in peanuts and peanut products marketed in southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.55, n.2, 313-317, 2012.

JECFA. JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. In: 56th meeting of the food additives Series n.47, 2001. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>. Acesso em: 25/04/21.

MAGRINI, I.C.O.; FERRARI, S.S.C.; SOUZA, G.F.; MINAMIHARA, L.; KEMMLEMEIER, C.; BANDO, E.; MACHINSKI JR, M. Intake of aflatoxins through the consumption of peanut products in Brazil. *Food Additives and Contaminants: Part B*, v.4, n.2, 99-105, 2011.

PALUMBO, R.; CRISCI, A.; VENÂNCIO, A.; ABRAHANTES, J.C.; DORNE, J.-L.; BATTILANI, P.; TOSCANO, P. Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in cereal-based feed and food. *Microorganisms*, v.8, n.1, 74, 2020.

PANDIESELVAM, R.; SUBHASHINI, S.; BANUU PRIYA, E.P.; KOTHAKOTA, A.; RAMESH, S.V.; SHAHIR, S. Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. *Ozone: Science & Engineering*, v.41, n.1, 17-34, 2019.