



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CRISTIANE FIORENTIN

OZÔNIO NA SEGURANÇA DE BEBIDA COM AVEIA (*Avena sativa* L.): CONTROLE MICROBIOLÓGICO, MICOTOXINAS & GLIFOSATO EM MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO FINAL

Londrina
2023

CRISTIANE FIORENTIN

OZÔNIO NA SEGURANÇA DE BEBIDA COM AVEIA (*Avena sativa* L.): CONTROLE MICROBIOLÓGICO, MICOTOXINAS & GLIFOSATO EM MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO FINAL

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F518o Fiorentin, Cristiane.
OZÔNIO NA SEGURANÇA DE BEBIDA COM AVEIA (Avena sativa L.):
CONTROLE MICROBIOLÓGICO, MICOTOXINAS & GLIFOSATO EM
MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO FINAL / Cristiane Fiorentin. - Londrina, 2023.
128 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos, 2023.
Inclui bibliografia.

1. aveia - Tese. 2. segurança dos alimentos - Tese. 3. bebida vegetal - Tese.
4. contaminante microbiana - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Universidade Estadual
de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos. III. Título.

CDU 641.1

CRISTIANE FIORENTIN

OZÔNIO NA SEGURANÇA DE BEBIDA COM AVEIA (*Avena sativa* L.): CONTROLE MICROBIOLÓGICO, MICOTOXINAS & GLIFOSATO EM MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO FINAL

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^ª. Daiane Dias Lopes
Unites Sates Department of Agriculture- USDA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^ª. Leniza Ludwig
Agropecuária Ludwig

Dr^ª. Mariana da Costa
SL Cereais e Alimentos

Londrina, 23 de janeiro de 2023.

Dedicatória

*Á Deus,
Aos meus pais, Eloar e Nelsira,
À minha irmã Taís,
Ao meu esposo Wagner,
Á minha filha Heloisa,
Por todo amor, incentivo e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos por todo conhecimento concedido.

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, pelo conhecimento repassado, expertise no tema, incentivo, apoio, confiança, visão e principalmente pela paciência e compreensão diante das circunstâncias extrínsecas durante o percurso.

À Profa. Dra. Maria Victória Eiras Grossmann e Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira por todo conhecimento e contribuição concedidos na qualificação.

À Dra. Renata Pinheiro Sobottka por todo conhecimento e ajuda no desenvolvimento deste estudo.

À Dra. Renata Vardanega por todo conhecimento, ajuda, dedicação e tempo disponibilizado para ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas de pós-graduação pela amizade e experiências compartilhadas.

À empresa SL Alimentos que proporcionou a realização desse trabalho, através da estrutura, matéria prima, insumos, equipamentos, análises, investimentos, mas principalmente pelo incentivo para formação profissional e disponibilização de oportunidades. Ao Diretor Thomaz Setti, grande visionário, incentivador e impulsionador para aprimoramento pessoal e profissional.

A toda a equipe da SL Alimentos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho, Marieli, Lucimara, Rafaeli, Andrieli, Carol, Rafael Brito, Elizeu que me auxiliaram durante as etapas de testes e análises laboratoriais.

Agradeço imensamente a minha família, principalmente meus pais e minha irmã Taís Regina, que mesmo estando longe sempre ofereceram apoio, confiança, amor, suporte e compartilhamento em todos os momentos de alegrias e dificuldades.

Ao meu esposo Wagner por acreditar e apoiar meus sonhos, pelos incentivos, conselhos, companheirismo e que mesmo durante os períodos de ausência teve paciência, dedicação e muito carinho com nossa filha Heloísa.

A todos os meus amigos e pessoas que cruzaram o meu caminho, e que contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

FIorentin, Cristiane. **OZÔNIO NA SEGURANÇA DE BEBIDA COM AVEIA** (*Avena sativa* L.): **CONTROLE MICROBIOLÓGICO, MICOTOXINAS & GLIFOSATO EM MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO FINAL**. 2023. 128 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023

RESUMO

A intensa busca por alimentos saudáveis com alta qualidade nutricional demanda ininterrupta inovação, em especial à bebida vegetal corroborando com a corrida de agroindústrias explorando novos cereais e, aprimorando os produtos existentes. O destaque à aveia (*Avena sativa* L.) entre bebidas lácticas alternativas é evidente, pela propriedade nutricional centrada em perfil de ácidos graxos e alto índice de fibras alimentares de excelência, a exemplo de β -glucana. A qualidade de produto final depende de atenção especial à segurança de matéria-prima. Aliado ao fato, a incorporação da produção de bebida líquida perecível ao sistema operacional de processo seco requer nova avaliação e cuidado redobrado perante segurança dos alimentos. Diante disso, a ozonização emerge entre tecnologia estratégica rápida e prática capaz de manter a qualidade de produto, reduzindo a carga de contaminantes, seja microbiana como químicos residuais. O presente estudo caracterizou inicialmente a matéria prima seca – grão de aveia descascada (i): contagem microbiana e ocorrência de deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), aflatoxina total (AFL) e glifosato em 615 amostras de aveia descascada pertencente à três safras (2019 a 2021) empregando imunoensaio rápido d-ELISA (*enzyme linked Immunosorbent assay*). A seguir, (ii) o efeito de O_3 foi avaliado em farinha de aveia naturalmente contaminado procedendo tratamento fatorial 2^2 empregando concentração de O_3 (20mg/L a 60mg/L) e tempo de exposição (15min a 45min). I.e., o tratamento com O_3 foi testado como tecnologia alternativa de ozonização para reduzir a carga microbiana, micotoxinas, glifosato além de gluten em farinha de aveia utilizada, assim como na bebida final desenvolvida, que também foi analisado perante características físico-químicas, viscosidade e cor. Salienta-se que validação inter-laboratorial periódica foi realizada seja perante análise microbiana como analítica quantitativa para garantir a veracidade dos resultados, com os experimentos realizados em duas etapas (i e ii). Monitoramento de grão descascado, (i): das 615 amostras, 229 foram analisadas para DON, 194 para ZEA e 61 para AFL. Embora tenha sido observada a ocorrência de DON em 82% (188 amostras), ZEA em 52% (100 amostras) e AFL em 61% (37 amostras), todas apresentaram o nível de contaminação inferior ao limite permitido pela legislação brasileira (1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, DON; 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, ZEA; 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, AFL). O glifosato apresentou-se ND – não detectado) em 195 das 376 amostras (52%), sendo 141 (37%) com teor inferior ao limite brasileiro (0,05 mg.kg^{-1} , Portaria nº 1421/2021) e 40 (11%) com teor superior a esse limite. Efeito de O_3 em farinha e produto obtido, (ii): a farinha de aveia destinada à produção de bebida, assim como o produto final foram submetidos ao tratamento com O_3 (20mg/L, 40mg/L e 60mg/L) sob tempo de exposição (15min, 30min e 45min). A farinha de aveia apresentou níveis de contaminação por *Salmonella*, *Bacillus cereus* e *Enterobacteriaceae* abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (Não Detectável em 25g; $<1,0 \times 10^3$ UFC/g; $<1,0 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente), não havendo diferença significativa em relação aos tratados com O_3 ($p > 0,05$). No entanto, a contagem de aeróbios mesófilos e bolores & leveduras foram reduzidos em até 1 log após o tratamento com O_3 ($p < 0,05$). AFL e ZEA apresentaram-se abaixo do limite de quantificação (AFL, LOQ 5 $\mu\text{g/kg}$; ZEA, LOQ 25 $\mu\text{g/kg}$); todavia, o tratamento com O_3 reduziu o nível de DON em 10% ($p < 0,05$), se comparado a farinha controle. O nível de glifosato reduziu de 460,1 $\mu\text{g/kg}$ para 363,3 $\mu\text{g/kg}$, correspondente ao índice de redução de 21% ($p > 0,05$), embora os valores permanecessem acima do limite estabelecido pela

legislação. O produto final, i.e., a bebida à base de aveia tratadas com O₃, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$) para análises microbiológicas. O tratamento com O₃ testado não degradou o glúten seja em matéria-prima como em produto final. Salienta-se que o tratamento em condições testadas não afetou as características físico-químicas, reológicas e de cor no produto final, o que permite aplicação promissora principalmente referente à redução de contaminação microbiológica, mas sem afetar as características nutricionais e sensoriais. Em suma, a baixa contaminação seja de carga microbiana como micotoxinas na matéria prima seca, i.e., a farinha de aveia na entrada de processamento asseguraria o produto final, constituído de bebida líquida perecível com maior atividade d'água. Não obstante, ainda se deve prosseguir com otimização operacional real para atingir equilíbrio ideal entre processo de descontaminação com O₃ versus matriz utilizada

Palavras-chave: aveia; segurança dos alimentos; bebida vegetal; ozônio; contaminante microbiana; micotoxinas; glifosato

FIorentin, Cristiane. **OZONE IN SAFETY OF OAT (*Avena sativa* L.) BEVERAGE: MICROBIAL, MYCOTOXINS & GLYPHOSATE CONTROL IN RAW MATERIAL AND FINAL PRODUCT**. 2023. 128 p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Center of Agricultural Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The intense search for healthy food with high nutritional quality demands uninterrupted innovation, especially for vegetable beverages, corroborating with the rush of agroindustries exploring new cereals and improving existing products. The emphasis on oats (*Avena sativa* L.) among alternative lactic beverages is evident, due to its nutritional properties centered on a fatty acid profile and a high level of excellent dietary fiber, such as β -glucan. Final product quality depends on special attention to raw material safety. Allied with this fact, the incorporation of the production of perishable liquid beverages into the dry process operating system requires a new evaluation and extra care regarding food safety. In view of this, ozonation emerges as a quick and practical strategic technology, capable of maintaining product quality, and reducing the load of contaminants, whether microbial or residual chemicals. The study initially characterized the dry raw material - husked oat grain (i): microbial count and occurrence of deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), total aflatoxin (AFL), and glyphosate in 615 samples of husked oats belonging to three harvests (2019 to 2021) using rapid immunoassay d-ELISA (*enzyme-linked Immuno sorbent assay*). Next, (ii) the effect of O₃ treatment was evaluated in naturally contaminated oat flour treated with a 2² factorial using different O₃ concentrations (20mg/L to 60mg/L) and exposure time (15min to 45min). I.e., O₃ treatment was tested as an alternative technology to reduce microbial load, mycotoxins, and glyphosate in oat flour, as well as in the final beverage developed, which was also analyzed for alterations physicochemical characteristics, viscosity, and color. An inter-laboratory validation was performed to guarantee the quantitative analytical results of the samples. (i): Of the 615 samples, 229 were analyzed for DON, 194 were analyzed for ZEA, and 61 were analyzed for AFL. Although the occurrence of DON was observed in 82% of the samples (188 samples), ZEA in 52% of the samples (100 samples), and AFL in 61% of the samples (37 samples), all samples showed a level of contamination below than the limit allowed by Brazilian Legislation (1000 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for DON, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for ZEA, and 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for AFL). Glyphosate was not detected (ND) in 195 of the 376 analyzed samples (52%), while 141 samples (37%) had glyphosate levels below the limit allowed (0.05 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Ordinance n° 1421/2021), and, 40 samples (11%) showed glyphosate levels above this limit. (ii): The treatment with O₃ was applied at different concentrations (20mg/L, 40 mg/L and 60mg/L) and different exposure time (15min, 30 min and 45min) for the oat flour used in the manufacturing process, as well as for the final product. Contamination by *Salmonella*, *Bacillus cereus* and *Enterobacteriaceae* in oat flour samples were below the limits stipulated by Brazilian legislation (Non-Detectable/25g; $<1.0 \times 10^3$ CFU/g; $<1.0 \times 10^2$ CFU/g, respectively), and showed no significant difference with O₃ treatment ($p > 0.05$). On the other hand, mesophilic aerobic and mold and yeast counts were reduced by up to 1 log after O₃ treatment ($p < 0.05$). Mycotoxin analyzes were below the limit of quantification for aflatoxin and zearalenone (AFL LOQ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ZEN LOQ 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$), however, O₃ treatment reduced the DON level by 10% ($p < 0.05$) when compared to the standard oat flour sample. The glyphosate level reduced from 460.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 363.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, representing a reduction of 21% ($p > 0.05$), however, the levels obtained were still above the stipulated by the Brazilian legislation. The final product, i.e., the oat-based beverage treated with O₃, did not show significant differences ($p > 0.05$) for microbiological analyzes. The O₃ treatments applied

in this experimental study did not affect the physical-chemical, rheological and color characteristics of the final product, which suggests a promising application, mainly in the adequate reduction of microbiological contamination without affecting the nutritional and sensorial characteristics of the product. In summary, the low contamination of the microbial load such as mycotoxins in the dry raw material - oat flour in the initial phase of the process ensures the final product, consisting of a perishable liquid beverage with higher water activity. Nevertheless, real operational optimization must still be pursued to achieve an ideal balance between the O₃ decontamination process *versus* the matrix used.

Key-words: oat; food safety; vegetable beverage; ozone; microbial contaminant; mycotoxins; glyphosate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da estrutura de cariopse, aveia. À esquerda a cariopse com casca; na direita, corte transversal com (A) farelo, (B) endosperma amiláceo e (C) interface germe-endosperma.....	19
Figura 2 - Antécio de aveia branca com gineceu e o androceu protegidos pela lema e pela palea.....	20
Figura 3 - Estrutura química desoxinivalenol ($C_{15}H_{20}O_6$).....	30
Figura 4 - Estrutura química zearealenona ($C_{18}H_{24}O_5$).....	31
Figura 5 - Estrutura química das Aflatoxinas: a) Aflatoxina B1 ($C_{17}H_{12}O_6$); b) Aflatoxina B2 ($C_{17}H_{14}O_6$); c) Aflatoxina G1 ($C_{17}H_{12}O_7$); d) Aflatoxina G2 ($C_{17}H_{14}O_7$).....	33
Figura 6 - Estrutura química glifosato ($C_3H_8NO_5P$).....	35
Figura 7 - Insegurança alimentar mundial no período de 2014 a 2019.....	36
Figura 8 - Número de obesos no mundo entre 1975 a 2015.....	36
Figura 9 - Estrutura química do ozônio (O_3).....	42
Figura 10 - Gerador de ozônio tipo descarga de corona.....	42
Figura 11 - Gerador de ozônio (O_3).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal de fontes de extrato vegetal.....	39
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 ASPECTOS GERAIS DA AVEIA	18
3.1.1 Origem da Cultura Aveia.....	20
3.1.2 Importância Econômica da Cultura de Aveia.....	21
3.1.3 Cultivares de Aveia – Características Relacionadas à Qualidade Industrial	22
3.1.4 Controle de Plantas Daninhas – Aplicação de Defensivos Agrícolas	23
3.1.5 Pré e Pós Colheita da Aveia	23
3.1.6 Qualidade e Composição Nutricional.....	25
3.1.7 Resistência ao Acamamento de Aveia.....	26
3.2 CONTAMINANTES DE AVEIA.....	27
3.2.1 Micotoxinas	28
3.2.1.1 Desoxinivalenol – DON	29
3.2.1.2 Zearalenona – ZEA.....	30
3.2.1.3 Aflatoxinas – AFLs	31
3.2.1.4 Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas.....	33
3.2.2 Defensivos Agrícolas.....	34
3.3 TENDÊNCIA DO MERCADO <i>PLANT-BASED</i>	35
3.4 BEBIDA VEGETAL	37
3.4.1 Processamento da Bebida Vegetal.....	39
3.5 APLICAÇÃO DE OZÔNIO EM CEREAIS	40
3.5.1 Descontaminação Química Através da Aplicação do Gás Ozônio	41
3.5.2 Aplicações de Ozônio para Redução de Micotoxinas em Alimentos.....	44
3.5.3 Aplicação do Ozônio (O ₃) na Redução de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos	46
3.5.4 Aplicações de Ozônio para Redução de Microrganismos	47
3.5.5 Produção Industrial de Ozônio e Legislação Para o Uso no Processamento de Alimentos	49
CAPÍTULO 1 - SAFETY EMPHASIZED ON MICROBIAL, MYCOTOXIN AND GLYPHOSATE IN OATS INTENDED FOR VEGETABLE-BASED BEVERAGE INGREDIENT	51
CAPÍTULO 2 – OZONE IN DETOXIFICATION (MYCOTOXINS AND GLYPHOSATE) AND MICROBIAL DECONTAMINATION IN INNOVATIVE OAT-BASED BEVERAGE PRODUCING PLANT	79

4 CONCLUSÃO GERAL	108
CONSIDERAÇÕES FUTURAS	110
REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

O consumo de aveia (*Avena sativa* L.) vem se destacando nos últimos anos, impulsionado pela valorização de propriedades e qualidades nutricionais, principalmente no perfil de ácidos graxos e alto índice de fibras de excelência, a β -glucana, capaz de proporcionar inúmeros benefícios à saúde. Desencadeando a demanda ininterrupta de inovações frente ao lançamento de novos produtos agroindustriais, as opções se estendem além da tradicional aveia em floco, farinha e farelo; aponta-se entre os últimos lançamentos, a bebida de aveia, um produto vegano como alternativa substituto de leite. Além de mercado segmentado ao público intolerante à lactose ou alérgicos às proteínas de leite, as bebidas vegetais tornaram-se atraente perante opção saudável e sustentável, com vegetarianismo e veganismo incentivando a pesquisar opções inovadoras de laticínios, análogos não-alcoólicos à base de grão.

Outrossim, o provimento de produto de alta qualidade exige atenção especial à segurança de matéria-prima, aliada ao rastreamento em todas as etapas de processo monitorando contaminação microbiana, micotoxinas, glifosato e, em muitos casos a contaminação cruzada com glúten.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos em umidade e temperatura ideal ao crescimento fúngico sob fatores peculiares de substrato e estresse, constituindo-se em toxina natural contaminante direto em produtos de origem vegetal e, indireta em origem animal. A ocorrência de micotoxinas em campo, armazenagem inadequada ou processamento constitui problema de saúde humana e animal, cujos relevantes na agroindústria cereal envolvem tricotecenos (desoxinivalenol – DON, nivalenol – NIV, toxina T-2 e HT-2), zearalenona (ZEA), ocratoxina-A (OTA), fumonisina e aflatoxina (AFL).

Uma prática comum na pré-colheita é a dessecação, adotada para reduzir a infestação de plantas daninhas e maturação desuniforme, antecipando a colheita. O herbicida glifosato, caracterizado pela alta eficiência e baixa toxicidade, destaca-se entre defensivos agrícolas. Além de controle de plantas daninhas, também reduz a população de pragas agrícolas, constituindo-se numa das últimas opções pós-rotação de cultura e uso de outros fitossanitários. Todavia, o uso é condicionado à regra rígida nem sempre respeitada, sendo preocupante, já que a exposição ou ingestão de resíduos de glifosato podem causar sérios riscos à saúde.

A fração proteica de aveia contém avenina (prolamina) e glutenina, portanto cereal tecnicamente isento de glúten. Todavia, o plantio de aveia comumente ocorre no mesmo campo destinado ao cultivo de outros cereais de inverno com glúten como trigo, cevada e

centeio, desencadeando contaminação cruzada. Além disso, se as linhas de processamento forem compartilhadas com cereais com glúten, estas podem carrear contaminação aos produtos como aveia em flocos grossos, aveia em flocos, aveia em flocos finos, *oat bran* e farinha de aveia. A ausência de glúten na aveia se controla através de rígidos programas e procedimentos consolidados ao longo da cadeia produtiva, baseados em análise laboratorial.

Aliado ao processo básico de produtos secos, a incorporação da linha de bebida líquida perecível ao sistema operacional demanda nova avaliação e cuidado redobrado perante segurança de alimentos, principalmente de patógenos microbianos, assim como perigo oriundo de processos. Entre alternativas de controle destaca-se a ozonização caracterizada com potencial oxidativo, cuja degradação resulta em oxigênio não-poluinte ambiental, sem resíduos fixos, reconhecido atualmente como substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ecologicamente correto considerado tecnologia “verde”. A ozonização emerge entre tecnologia estratégica rápida e prática capaz de manter a qualidade de produto, reduzindo carga de contaminantes, seja microbiana como químicos residuais.

O trabalho contribuiu com o monitoramento de contaminantes em aveia pós-colheita (grão descascada) e produto final líquido, seguida do efeito de ozônio (O₃) em farinha de aveia pré-processado (matéria-prima), assim como em produto final - bebida vegetal à base de aveia. A veracidade de resultados foi garantida procedendo validação inter-laboratorial periódica, seja de análise microbiana como analítica quantitativa. O estudo procedeu-se dividindo em duas partes: (i) monitorar a ocorrência de micotoxinas – desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN) e aflatoxina (AFL) – e resíduos de glifosato em aveia da principal região produtora do Brasil no decorrer de três safras sequenciais (2019, 2020 e 2021), assim como avaliar a contaminação microbiana em bebidas à base de aveia produzida. (ii) avaliar o efeito de O₃ gasoso em diferentes tempos e concentrações frente a contaminação microbiana, micotoxinas, glifosato e glúten em matéria prima (farinha de aveia destinada ao processamento líquido) e, produto final (bebida vegetal), sendo o último também analisado perante características físico-químicas, viscosidade e cor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a estratégia de controle na aveia e produto derivado com objetivo de reduzir contaminantes – matéria-prima seca ao produto final – bebida à base de aveia aplicando ozônio gasoso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência de micotoxinas – desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN) e aflatoxina (AFL) – e resíduos de glifosato em aveia da principal região produtora (Sul do Brasil) ao longo de três safras sequenciais (2019, 2020 e 2021);
- Avaliar a contaminação microbiológica de amostras de bebida vegetal à base de aveia;
- Avaliar o efeito de O₃ na descontaminação / redução de micotoxinas em farinha de aveia, empregando diferentes concentrações e tempo de exposição;
- Avaliar o efeito do O₃ gasoso na remoção/redução de resíduos de glifosato utilizado como dessecante no campo (farinha de aveia);
- Avaliar o efeito do O₃ gasoso na remoção/redução da contaminação microbiológica em farinha de aveia e bebida vegetal à base de aveia, empregando diferentes concentrações e tempo de exposição;
- Analisar se O₃ gasoso proporcionará alterações na quantificação de glúten na farinha de aveia e da bebida vegetal à base de aveia, empregando diferentes concentrações e tempo de exposição;
- Analisar alteração reológica e físico-química da farinha de aveia integral e bebida vegetal à base de aveia pós-exposição de O₃ gasoso;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA AVEIA

A aveia é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Pooideae* e gênero *Avena*, sendo as espécies mais cultivadas no mundo a *Avena sativa* e *Avena byzantina* (PETERSON; HAHN, 2002). *Avena sativa* representa 96% de aveia brasileira produzida, atingindo uma média de 2,1 t ha⁻¹, centrada na Região Sul; esta representa apenas a metade, portanto o país ainda é dependente de importação (TIBOLA, et al., 2015; CONAB, 2018).

Devido à diversidade de uso, a produção de aveia aumentou mais de 100 % nos últimos 20 anos (CARDOZO; SCHUCH; ROSENTHAL, 2002). O principal fator que impulsionou a ampliação na demanda por aveia branca decorreu do aumento de consumo devido à elevada qualidade nutricional como alto teor de proteína, bom balanço de aminoácidos, sais minerais e vitaminas, sendo o caráter mais notável, a β -glucana entre fibras alimentares (VELLOSO; FEDERIZZI, 2000; CLEMENS; KLINKEN, 2014).

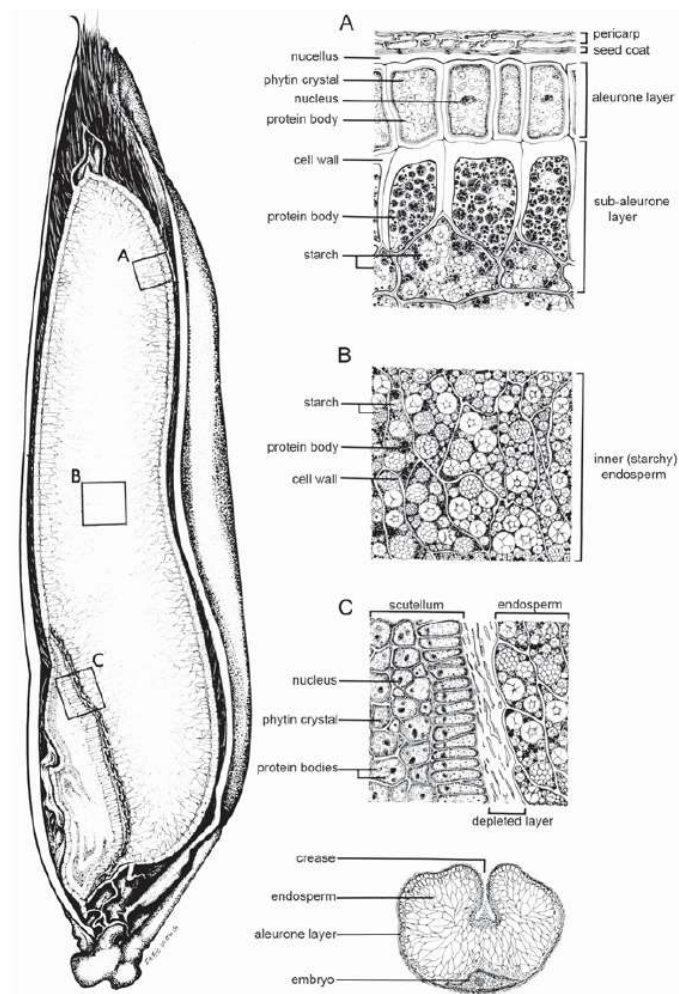
Conforme *American Dietetic Association* (2002), a fibra alimentar é a porção vegetal, ou carboidratos resistentes à digestão e absorção no intestino delgado e, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. As fibras insolúveis atuam no intestino grosso e formam o bolo fecal, enquanto as solúveis retêm água e produz géis em solução aquosa. A propriedade formadora de gel, denominada goma ou hidrocolóide, tem forte impacto positivo na indústria alimentícia, por modificarem a viscosidade (BRENNAN, 2005; CATALANI et al., 2003). O consumo controla o índice glicêmico, diminuindo a absorção de glicose, auxiliando os diabéticos (CHANDALIA, 2000).

Embora seja cereal semelhante aos demais, a aveia apresenta determinadas propriedades impactantes no processo industrial. O comprimento de grão varia de 6 a 13 mm e espessura de 1,0 a 4,5 mm, a densidade pode atingir até 756 kg/m³ com peso médio de 32 mg (BUTT et al, 2008). A estrutura se divide em: 25% de peso representa a casca; 9 a 12% em pericarpo, composto por camadas de epiderme e hipoderme; o endosperma, composto pelo endosperma amiláceo e camada de aleurona, pode contribuir com até 84% do peso total; e o germe ocupa apenas uma pequena fração, variando de 2,8 à 3,7% (SANDRIN, et al., 2013).

A casca de grão com aspecto característico é fibrosa, cerosa e indigerível a ser humano, enquanto o germe é longo e estreito, semelhante ao trigo, compreendendo cerca de um terço do comprimento. Comparada a demais cereais, o grão de aveia contém maior teor lipídico e proteico, além de várias enzimas, com cuidado especial à lipase durante o

processamento, que reduz a vida de prateleira dos produtos se não for desnaturada (HOSENEY, 1986). A Figura 1, apresenta a estrutura da cariopse de aveia.

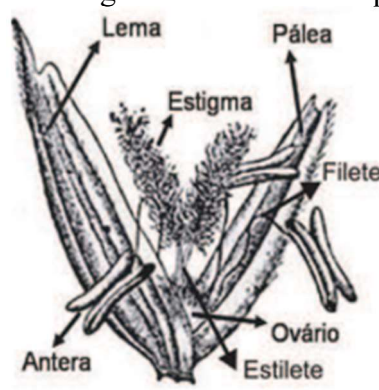
Figura 1 - Diagrama da estrutura de cariopse, aveia. À esquerda a cariopse com casca; na direita, corte transversal com (A) farelo, (B) endosperma amiláceo e (C) interface germe-endosperma.



Fonte: Miller e Fulcher (2011).

A aveia branca apresenta flores hermafroditas (flor com órgão masculino e feminino), denominada de antécio, composto pela pálea e lema, responsáveis por envolver o androceu (conjunto de órgão masculino); este é formado por três estames laminares com filete, uma haste que sustenta a antera, conforme ilustrado na Figura 2 (BORÉM, 2009).

Figura 2 - Antécio de aveia branca com gineceu e o androceu protegidos pela lema e pela pálea.



Fonte: Teillier (2007).

Espiguetas são conjuntos de dois ou três antécios aglomerados e protegidos externamente por duas glumas. Esse arranjo floral permite índice elevado de autofecundação atingindo 95%, tornando o processo de hibridização artificial muito trabalhoso (BORÉM, 2009).

3.1.1 Origem da Cultura Aveia

Igualmente aos demais cereais, desconhece-se o exato início do cultivo de aveia, embora evidências indiquem como um dos últimos grãos a ser cultivados na Europa há aprox. três milênios. Todavia, alguns registros indicam plantações de aveia na China ancestral, já em 7.000 A.C. (FEDERIZZI; ALMEIDA, 1998). O trigo e a cevada representaram as primeiras culturas de maior importância ao homem, enquanto a aveia cultivada evoluiu tardiamente, entre o terceiro e segundo milênio A.C, surgindo como uma espécie invasora das culturas. Assim como o trigo, a aveia é uma planta alohexaplóide autopolinizada, resultado de diversos ciclos de hibridização (RAJHATHY; THOMAS, 1974).

Malzew (1930) defendeu a teoria da existência de dois centros de origem de aveia cultivada, no Próximo Oriente (Iran, Iraque e Turquia, e no Mediterrâneo ocidental) e, outra nas regiões da Península Ibérica e o Noroeste da África. No final da Idade do Bronze, a aveia comum (*Avena sativa* L.) se expandiu à Europa, enquanto a aveia vermelha (*A. byzantina* K. Koch) predominava na África do Norte e Espanha. A genética dos cereais, inicialmente bastante uniforme se diversificou e aumentou devido às mutações e as separações geográficas, resultando espécies heterogêneas, sendo muitas espécies perdidas no decorrer dos anos.

A introdução de *Avena sativa* L. e *A. byzantina* K. Koch na América do Norte ocorreu apenas no século XVI (COFFMAN, 1977). O tipo *byzantina* se adaptou melhor no

outono, enquanto o tipo *sativa* preferiu se estabelecer como uma cultura primaveril no sul dos Estados Unidos. Recentes estudos em adaptação de outras espécies em diversos ambientes conduziram à descoberta de famílias com excelentes qualidades tecnológicas, como elevado teor de β -glucana elevado (HOLLAND et al., 2002).

Apesar dos demais cereais como o trigo e a cevada, que avançaram para regiões mais frias e úmidas, não terem se adaptado, esse avanço foi favorável para o desenvolvimento da aveia que finalmente foi domesticada como uma lavoura alternativa (COFFMAN 1961). Algumas alterações genéticas importantes, e seletivas para o cultivo, foram observadas nesse período, como a perda da debulha natural do grão e da dormência (TAVARES; ZANETTINI; DE CARVALHO, 1993).

Segundo Boerger (1943) a aveia branca foi introduzida no Brasil em 1930 com testes experimentais em cultivares vindas da Argentina e Uruguai. Três décadas depois, as cultivares Coronado e Suregrain, trazidas dos Estados Unidos, foram adotadas nas lavouras brasileiras (FEDERIZZI et al., 2005). Inicialmente, as cultivares de aveia branca, que participaram dos programas de melhoramento quando foram introduzidas no Brasil, não mostravam um potencial de produção bom e além da baixa velocidade de adaptação às condições ambientais (HAWERROTH et al., 2014)

Fernando Irajá Félix de Carvalho, em 1974, trouxe dos Estados Unidos da América, para a faculdade de agronomia da Federal do Rio Grande do Sul, algumas espécies puras e populações segregantes de aveia branca e, em conjunto com os demais pesquisadores, começaram um trabalho voltado para o melhoramento genético da espécie. Foi a partir desse período que iniciou o programa de melhoramento genético da aveia no Brasil (FEDERIZZI et al., 2005).

3.1.2 Importância Econômica da Cultura de Aveia

O cultivo de aveia foi economicamente viável pois trouxe uma possibilidade de ocupar os solos da região centro-sul do Brasil principalmente no período de inverno, cujo solo está em descanso (CARDOZO; SCHUCH; ROENTHAL, 2002). Entre os estados com grande destaque nesse cultivo encontram-se o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul.

A aveia possui múltiplas formas de utilização: produção de grãos para consumo humano; matéria-prima industrial para a produção de cosméticos e para a indústria química; formação de pastagens de inverno para pastejo direto e/ou elaboração de feno e de

silagem; cobertura de solo e adubação verde com vistas à implantação de culturas de verão. Na alimentação humana, o cereal tem sido empregado para a produção de alimentos infantis, cereais matinais (quentes ou frios), granolas, barras de cereais, produtos forneados ou assados (pães, biscoito, bolos, etc.), componentes adicionais para engrossar sopas, molhos e para aumentar o volume de produtos cárneos (DE MORI; FONTANELI; SANTOS, 2012). Outros usos industriais de aveia são como antioxidante e estabilizante em gelados e outros produtos lácteos. Também as suas cascas são utilizadas como matéria-prima para a fermentação (GUTKOSKI; PEDÓ, 2000) e para queima em substituição à lenha.

3.1.3 Cultivares de Aveia – Características Relacionadas à Qualidade Industrial

A escolha de uma cultivar deve considerar sua potencialidade para rendimento de grãos e suas características agronômicas: suscetibilidade ao acamamento, a moléstias (principalmente às ferrugens e manchas foliares), a geadas, além de ciclo e qualidade industrial (LÂNGARO; CARVALHO, 2014).

As condições favoráveis para o estabelecimento de patógenos são, em geral, temperatura e umidade do ar alta. As principais moléstias são as ferrugens, porém nem todas as cultivares reagem da mesma forma a essas doenças, necessitando de um correto monitoramento e controle. A reação de cultivares às ferrugens é um processo dinâmico, pois há uma constante mudança das espécies de fungos, além de interação com as condições de ambiente. Algumas cultivares são mais sensíveis às geadas, que ocorrem frequentemente durante o período de crescimento vegetativo. Deve-se evitar o uso de cultivares sensíveis a geadas em regiões onde a probabilidade de ocorrência desse fenômeno seja alta (LÂNGARO; CARVALHO, 2014).

Parâmetros como o rendimento e a qualidade industrial de grãos de aveia são relevantes para a comercialização. A qualidade mínima exigida para os grãos destinados à indústria de alimentos é a massa de mil grãos (MMG), a porcentagem de grãos maiores que 2 mm ($\%>2$ mm), peso hectolitro (PH) e o índice de descasque (ID). O ID é a relação entre o peso de grãos descascados/peso de grãos inteiros multiplicados por 100. O rendimento industrial (RI%) é calculado pela quantidade de produto processado obtido por meio do ID multiplicado pela $\%>2$ mm, que significa a porcentagem de produto obtido a partir de amostras de grãos integrais (LÂNGARO; CARVALHO, 2014).

3.1.4 Controle de Plantas Daninhas – Aplicação de Defensivos Agrícolas

A cultura da aveia pode sofrer interferência de plantas daninhas, resultando em perdas de rendimento de grãos, principalmente quando o efeito ocorre em estádios iniciais do desenvolvimento da cultura. Ainda, a presença de plantas daninhas pode gerar dificuldade de colheita e diminuir a qualidade do produto colhido (LÂNGARO; CARVALHO, 2014).

A utilização de herbicidas é necessária quando a infestação de plantas daninhas for elevada e as dimensões da lavoura não permitirem o controle por outros métodos, como o mecânico, por exemplo. O controle seletivo de azevém e de outras plantas daninhas de folha estreita ainda não é possível por meio dos herbicidas registrados disponíveis no país (LÂNGARO; CARVALHO, 2014).

Para o manejo das plantas daninhas em pré-semeadura (dessecação), em áreas destinadas ao plantio direto, pode-se usar os mesmos herbicidas recomendados para o trigo, ressaltando-se, porém, que a presença de invasoras mais desenvolvidas e tolerantes pode requerer duas aplicações (LÂNGARO; CARVALHO, 2014).

3.1.5 Pré e Pós Colheita da Aveia

A aveia (*Avena sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado no sul do país, ganhando destaque por suas excelentes propriedades nutricionais e como alternativa para produção de inverno e diversificação da cobertura do solo. À medida que a área cultivada com aveia aumenta, também aumenta o risco de ataque no campo, que inevitavelmente surge quando as condições são favoráveis (DEUNER et al, 2014).

Uma prática comum na pré-colheita é a dessecação, adotada com o objetivo de reduzir a infestação de plantas daninhas e a maturação desuniforme da lavoura, antecipando, conseqüentemente, a colheita. Entretanto, é necessário se atentar a alguns pontos: o dessecante só deverá ser aplicado quando a planta estiver no início da maturação; é preciso pesquisar sobre as condições climáticas no período de aplicação, pois caso ocorra chuva entre o momento de aplicação do dessecante e a colheita, as sementes poderão perder a qualidade devido ao desenvolvimento dos fungos *Phomopsis* spp. e *Fusarium* spp.; e saber qual tipo de dessecante é o ideal para a espécie que deseja aplicar (FRANÇA-NETO et al., 2016).

Um herbicida com forte potencial dessecante, é o glifosato. Esse destaque está relacionado com sua ação sistêmica em todos os tecidos das plantas, o que difere dos agentes químicos cuja ação é por contato (DE ANDRADE; JUNIOR; POSSENTI, 2003).

O glifosato (N-fosfonometil glicina) foi descoberto em 1964, e seu uso como herbicida só ocorreu em 1971. A finalidade do glifosato no início era como um quelante industrial. O glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfatossintase (EPSPs), responsável pela catalisação da reação do chiquimato-3-fosfato com o fosfoenolpiruvato (PEP) (HERRMANN, 1995).

Segundo alguns estudos, uma das características mais marcantes do glifosato é a rapidez da sua translocação das folhas das plantas até as raízes, rizomas e meristemas apicais. Essa particularidade faz com que as todas as plantas invasoras perenes, como rizomas de *Sorghum halepense*, *Agropyron repens*, *Cirsium arvense*, *Cyperus* spp., *Cinodon dactylon*, *Imperata cilindrica* e mesmo *Pueraria lobata*, fiquem completamente desnutridas (FRANZ, 1985; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

A ação do glifosato nas plantas, primeiramente ocorre por meio de uma rápida penetração, seguida de uma penetração lenta e longa, sendo que a duração dessas etapas é influenciada pela espécie, condições ambientais, idade e concentração do glifosato utilizado. O glifosato presente no floema é transportado por toda a planta, porém há uma tendência de acúmulo nas regiões meristemáticas. Outras formas de penetração do herbicida nas plantas foram avaliadas como, por exemplo, as formulações solubilizadas em óleo que permitem a penetração pela casca, além de raízes de cultivo, que absorvem o glifosato presente em soluções nutritivas e transporta através das plantas (HADERLIE; SLIFE; BUTLER, 1978; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

Sabe-se que uma molécula que tem menor solubilidade em água possui maior capacidade de sorção no solo, no entanto o glifosato é uma exceção à essa regra, pois é altamente solúvel em água ao mesmo tempo que é extremamente sorvida pelo solo. A formação de ligação covalente com os átomos metálicos dos óxidos do solo pode ser o responsável pela permanência, na forma de resíduo-ligado, do glifosato no solo (PRATA, 2002).

Como agente dessecante, o uso do glifosato pode causar algumas alterações fisiológicas, como a condutividade estomática, fotossíntese e respiração (CAMARGO, 2006), e reduzir a transpiração das plantas logo após sua aplicação, resultando em um fechamento forçado dos estômatos (YANNICCARI et al., 2012). Além do mais, o glifosato consegue influenciar na alteração da síntese proteica das plantas, reduzindo a quantidade de aminoácidos totais e proteína bruta.

A colheita deve ser realizada quando os grãos apresentam condições de debulha e as plantas ainda se encontram em pé. A operação de colheita deve iniciar quando os grãos estiverem com teor de água abaixo de 20%. O atraso na colheita determina a ação de fatores adversos, com prejuízos tanto no rendimento quantitativo quanto no qualitativo, ou seja,

pode ocorrer debulha de grãos, acamamento e quebra do colmo das plantas, e consequentemente, perdas de panículas que caem no solo e não são recolhidas pelas colhedoras, impactando negativamente o rendimento (ARENHARDT et al, 2016).

A antecipação da colheita reduz o risco devido aos efeitos de fatores climáticos adversos, mas a aeração e secagem com secador de grãos é necessária para manter a qualidade do grão e reduzir o teor de umidade dos grãos até que ele possa ser armazenado com segurança (ARENHARDT et al, 2016).

Na colheita de aveia, um dos objetivos a serem alcançados é a retirada de grãos do campo com o mínimo possível de impurezas, sem, no entanto, perder grãos nos mecanismos internos da colhedora. O mecanismo responsável pela limpeza de grãos requer cuidados e regulagens para desempenhar satisfatoriamente a função. A temperatura da massa na secagem artificial para sementes e para grãos destinados ao consumo humano deve ser inferior a 40 °C e 50 °C, respectivamente. Para o armazenamento seguro, o teor de água dos grãos deve ser inferior a 13% (DOS SANTOS; RABELO 2008).

3.1.6 Qualidade e Composição Nutricional

Para se obter os valores da composição da aveia é necessário realizar análises químicas ou outras análises laboratoriais. Porém, para conseguir os dados sobre a qualidade nutricional, é preciso avaliar a capacidade do produto em satisfazer as necessidades nutricionais, que pode ser influenciada por fatores como digestibilidade e disponibilidade de nutrientes (DREWNOWSKI, DARMON 2005).

Entretanto, alguns fatores modificam a composição nutricional dos produtos de aveia, são eles: o processamento inadequado do cereal, podendo levar ao esgotamento de vitaminas, minerais e das camadas de farelos, ricas em fibras; adição de ingredientes como açúcares, gorduras entre outros; e a fortificação dos produtos por meio do enriquecimento de vitaminas e minerais (WEBSTER; WOOD, 2011).

Algumas variações no cultivo de cereais, decorrentes de fatores genéticos e ambientais, são observadas até mesmo em espécies iguais por exemplo, cultivares de aveia, semeadas no outono tem forte tendência em ter o teor lipídios maior que o proteico, diferindo das culturas primaveris (WELCH, 1995).

Entre os principais componentes do grão, a proteína é a mais variável. A aplicação tardia de fertilizantes nitrogenados na cultura e a disponibilidade de água são os principais fatores que interferem no rendimento proteico do grão, sendo as culturas de maior

rendimento responsáveis pela produção de grãos com menor índice de proteínas. Por isso grãos de diferentes lugares possuem diferentes composições, por exemplo o teor de proteínas dos grãos das regiões da Ásia, Austrália, Europa e América do Norte variam de 11,2 a 16%. Essa diferença é reduzida no momento do processamento onde é feita a misturas de aveia de várias fontes (WELCH; McCONNELL, 2001).

U.S. Department of Agriculture levantou dados a respeito da composição centesimal de cereais, e verificou que o constituinte majoritário dos cereais é o carboidrato, presente na forma de amido e, em menores concentrações, na forma de açúcares e oligossacarídeos. A proteína também representa uma parcela significativa dos cereais, e como mencionado anteriormente, seu índice é mais elevado em aveia e no trigo. A fração lipídica presente na aveia, rica em ácidos graxos, é maior que o dobro da quantidade encontrada nos demais cereais, e sua distribuição é por todo o endosperma e não centralizada no gérmen como a maioria dos grãos. A aveia também está entre os cereais com maior índice de fibras alimentares, sendo este componente o mais variável entre as espécies (WEBSTER; WOOD, 2011).

Os ácidos graxos da porção lipídica da aveia, são de cadeia longa encontrados na forma de triacilglicerol, mas também podem se apresentar na forma livre e em fosfolipídios e glicolipídios. Aproximadamente 94% da gordura de aveia é composta por ácidos graxos, enquanto que nos outros cereais essa porção é de apenas 72% (PAUL; SOUTHGATE, 1978). No geral, o ácido graxo em maior quantidade presente nos cereais é o linoleico poliinsaturado, seguido do ácido oleico monoinsaturado e o do palmítico saturado. Na aveia, os ácidos graxos que impactam positivamente na necessidade nutricionais, são o ácido linoleico e o linolênico (WEBSTER; WOOD, 2011).

Como já mencionado o componente principal da fibra solúvel de aveia é a β -glucana, podendo variar a quantidade de 2 a 8%. Essa fibra é responsável por vários efeitos fisiológicos benéficos à saúde, entre os principais estão a capacidade de redução do colesterol plasmático e da doença cardíaca. Também foram observados efeitos benéficos na parte gastrointestinal, como por exemplo o retardo do esvaziamento gástrico e aumento da saciedade, devido a diminuição de resposta da glicose pós-prandial (MALKKI; VIRTANEN, 2001).

3.1.7 Resistência ao Acamamento de Aveia

O acamamento é um fator que interfere diretamente no rendimento dos grãos de aveia. Existem dois tipos de acamamento: do colmo, onde a base do caule é dobrada ou

quebrada, e o acamamento de raízes, em que a raiz é deslocada do solo. Em ambientes temperados, esse fenômeno ocorre como resultado de uma falha estrutural no colmo (SILVEIRA, 2020).

Um fator importante para o acamamento resistir ao vento e à força das chuvas, é o caule se encontrar horizontalmente ao chão. O elevado fornecimento de nutrientes em combinação com altos rendimentos, bem como outras condições como, população elevada das plantas, solos não consolidados e sementeira precoce, auxilia no aumento do acamamento (BERRY et al., 2004). De acordo com alguns autores, quanto mais alta a palha, menor será a força necessária para derrubar a cultura. Esse fator é importante, pois as culturas acamadas tem como características a colheita lenta, rendimento e qualidade baixa, em alguns casos, se tornam inviáveis realizar a colheita (WEBSTER, 2016).

Apesar do progresso na redução das alturas das plantas, alguns ambientes férteis, como no caso da Europa Ocidental, diversos genótipos altos são descartados. No Reino Unido, a variedade de aveia mais cultivada no inverno desde a década de 90, era a Gerald. Essa cultivar possui palha pequena e curto crescimento vegetativo, por isso seu desenvolvimento teve sucesso na região (WEBSTER, 2016).

A resistência ao acamamento também pode ser influenciada por dois fatores: pelas propriedades cilíndricas, como a largura das paredes, e pelas características radiculares como o tamanho da placa da radícula e a profundidade das raízes (BERRY et al., 2004).

Para reduzir de forma significativa a altura das plantas, alguns genes, denominados anões, foram utilizados. As primeiras variedades de cereais da Europa que incorporaram esses genes foram Milford e S172. Essas variedades originaram outra nos Estados Unidos, também muito resistente ao acamamento (VALENTINE et al., 2003).

A constante procura por espécies com baixo acamamento, tem outros benefícios, além dos já citados. Essas espécies permitem que o rendimento dos grãos aumente por meio de taxas mais elevadas de fertilizantes nitrogenados, além de atingir altos níveis de proteínas, variando de 113 a 141 g/kg de matéria seca (WADE; MAUNSELL, 2004)

3.2 CONTAMINANTES DE AVEIA

O crescimento de fungos produtores de micotoxinas pode ocorrer em uma grande variedade de substratos e sob diversas condições de a umidade, temperatura e pH, podendo ser encontrados em várias partes do mundo, ou seja, os grãos podem ser contaminados em praticamente todas as etapas de pré e pós colheita (SCUSSEL, 2002).

A maior parte das micotoxinas são produzidas pelos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As micotoxinas produzidas antes e imediatamente após a colheita são patogênicas do gênero *Fusarium*, enquanto a do *Aspergillus* e *Penicillium* normalmente são encontradas durante a secagem e armazenamento como contaminantes, por isso são conhecidos como fungos de armazenamento (SWEENEY; DOBSON, 1998).

Por isso tecnologias aplicadas em agroindústrias e nas propriedades rurais, com ênfase na pós-colheita, são temas fundamentais de pesquisas (GUTKOSKI, 2000). Nesse sentido, um estudo preditivo de armazenamento seguro é capaz de evitar uma perda deteriorante significativa dos grãos, prologando as características qualitativas desejáveis na pós colheita (FLEURAT-LESSARD, 2002).

3.2.1 Micotoxinas

O termo micotoxinas deriva da palavra grega *Mikes*, que significa fungo e da palavra latina *Toxicum* que significa veneno, ou seja, micotoxina é a toxina produzida por fungos (SCUSSEL, 1998). O desenvolvimento das micotoxinas depende do tipo de alimento, bem como das variações climáticas, condições de colheita e/ou armazenagem.

Embora centenas de micotoxinas sejam conhecidas, destacam-se cerca de 30 devido à toxicidade e ampla ocorrência em alimento, além de termorresistência, persistindo ao processo industrial (EFSA, 2009). A ocorrência do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* em cereais está diretamente relacionada à contaminação, além de causar importantes danos fitossanitários (AYDIN; UGUR; DEMIREL, 2008; ZAIED et al., 2012). As toxinas relevantes em cereais são tricotecenos (principalmente desoxinivalenol - DON, nivalenol - NIV, toxina T-2 e HT-2), além de zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), fumonisinas e aflatoxinas (JUAN; RITIENI; MANES, 2012; PLEADIN et al., 2012; ROOHI; AZIZI; HASHEMI, 2012). Para a aveia, as principais que podem ser encontradas são DON, zearalenona (ZEA) e aflatoxinas (AFLs) (SCUSSEL; BEBER; TONON, 2011).

A ocorrência de micotoxinas está relacionada com a contaminação fúngica presente em produtos agrícolas, alimentos e rações ao longo de toda cadeia produtiva, i.e., desde o campo até a fase de industrialização. Temperatura, umidade e características bioquímicas dos produtos são os fatores mais relevantes, no entanto, a integridade física da matriz alimentar é de fundamental importância, uma vez que lesões mecânicas provocadas por insetos ou, no processamento tornam as matrizes alimentares susceptíveis a proliferação de fungos. A principal via de exposição humana é a ingestão de alimentos contaminados, sendo as vias

dérmicas e respiratórias também relevantes. A contaminação por alimentos pode ocorrer de forma direta, pela ingestão de produtos agrícolas contaminados ou indiretamente, por meio da ingestão de produtos derivados de animais intoxicados com ração contaminada (BENNETT; KLICH, 2003). A produção de micotoxinas depende essencialmente de quatro fatores: (a) toxigenicidade dos fungos, devido a diferença na capacidade de produção entre as espécies; (b) tipo de substratos, pois alguns produtos são mais susceptíveis à contaminação por certos tipos de fungos; (c) temperatura, fator mais importante para o crescimento de fungos e subsequente produção de micotoxinas. A temperatura ótima para produção de micotoxinas varia de acordo com a espécie fúngica e o tipo de micotoxina, existindo uma temperatura ótima de crescimento e produção de toxina para cada espécie fúngica; e (d) umidade, fator de controle para prevenção do crescimento fúngico e produção de toxinas (ONO et al, 2012).

Considerando que a presença de fungos em produtos agrícolas é inevitável e determinadas espécies são capazes de crescer e produzir toxinas no meio em que são encontradas, as micotoxinas em alimentos tornaram-se motivo de constante preocupação para produtores, processadores de grãos, criadores de animais e profissionais da área da saúde (ONO et al, 2012). Por outro lado, também é essencial a introdução de processos de detoxificação capazes de degradar/ transformar em análogos de menor toxicidade.

3.2.1.1 Desoxinivalenol – DON

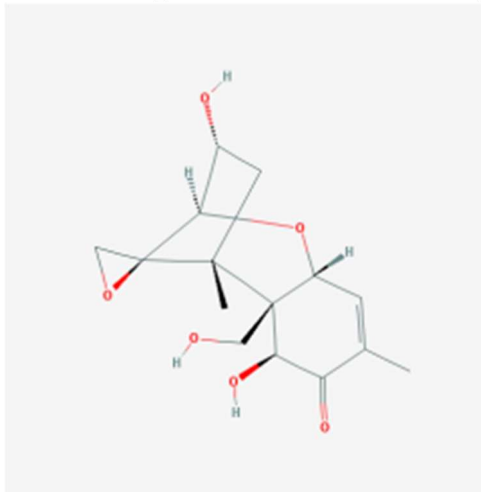
Desoxinivalenol (vomitoxina) é uma toxina produzida por diversas espécies de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Phomopsis*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichothecium*, *Trichoderma* entre outros (BENNETT; KLICH, 2003, MURPHY et al., 2006).

Quimicamente, a vomitoxina é denominada como desoxinivalenol (DON) e pertencente ao grupo de toxinas conhecidas como tricotecenos (LÁZZARI, 1993). É uma micotoxina do tipo B dos tricotecenos produzida pelas espécies de *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. avenaceum*, entre outras espécies. Ambas espécies precisam de temperaturas ótimas para crescimento (25°C e 21°C) e isso provavelmente afeta a distribuição geográfica. Esta toxina é resistente ao processo de moagem e aquecimento e, por isso, entra na cadeia alimentar de animais e humanos diretamente. É uma das micotoxinas consideradas mais importantes dos cereais, e são encontradas em todo o mundo como contaminantes de trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e milho (MOSS, 2002).

Os principais efeitos toxigênicos de DON quando em doses baixas são diminuição de crescimento e anorexia, enquanto doses elevadas induzem vômitos, efeitos

imunotóxicos e mudanças neuroquímicas no cérebro (WIJNANDS; VAN LEUSDEN, 2000). Efeitos tóxicos em animais têm sido bem documentados e focalizam principalmente o sistema imunológico e o trato gastrointestinal. Doses agudas são caracterizadas por efeitos como diarreia, vômito, leucocitose, hemorragia, choque circulatório, podendo levar a morte. As doses crônicas são caracterizadas por recusa alimentar, redução do ganho de peso e na absorção de nutrientes, além das alterações neuroendócrinas e imunológicas (LARSEN et al., 2004; PESTKA; SMOLINSKI, 2005). Estudo tem demonstrado que o DON induz ao estresse oxidativo em ratos dependendo da dose utilizada (MISHRA, 2013; MISHRA et al., 2014) e que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode estar associada à desregulação do sistema imunológico induzido por DON. Isso porque, o sistema imunológico é sensível ao DON e pode ser tanto estimulado, quanto suprimido, dependendo da dose e da frequência de exposição (PESTKA, 2010). A Figura 3 representa a estrutura química do DON.

Figura 3 - Estrutura química desoxinivalenol ($C_{15}H_{20}O_6$)

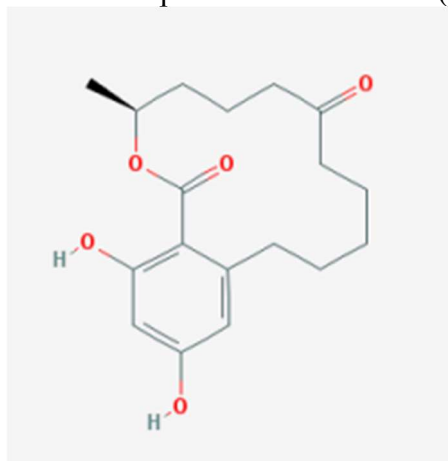


Fonte: PubChem (2018).

3.2.1.2 Zearalenona – ZEA

A zearalenona (ZEA) (Figura 4) é um composto químico, ou melhor um hormônio estrogênico, produzido por diversas espécies de *Fusarium* (*F. roseus*, *F. tricinctum* e *F. moniliforme*) (LÁZZARI, 1993). A zearalenona, juntamente com os tricotecenos, a moniliformina e o butenolideno são produzidos por espécies de *Fusarium* sob espécies de *F. roseum* (*gramineareum*), *F. roseum culmorum*, *F. roseum equiseti*, *F. roseum gibbosum*, *F. roseum avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporium*, *F. lateritium* e *F. moniliforme*. Portanto, todos estes fungos produzem zearalenona e tricotecenos.

Figura 4 - Estrutura química zearealenona (C₁₈H₂₄O₅)



Fonte: PubChem (2018).

Quanto aos fatores que favorecem a produção destes fungos e suas toxinas, ao contrário dos outros tipos de fungos, a produção da toxina não ocorre na sua temperatura ótima de crescimento, nem nas temperaturas próximas. *Fusarium* cresce na faixa de entre 0 e 40°C, sendo que sua temperatura ótima é de 20-25°C. Contudo, a toxina é produzida em temperaturas baixas. Para a produção de zearalenona a temperatura é 12 °C (SCUSSEL, 1998). A micotoxicose causada pela zearalenona, devido a estes sintomas, é chamada de hiperestrogenismo (SCUSSEL, 1998). Portanto, a ZEA pode ser considerada um composto estável, não se degradando em altas temperaturas durante as etapas de processamento ou de armazenamento do produto (BENNETT; KLICH, 2003).

3.2.1.3 Aflatoxinas – AFLs

As aflatoxinas são caracterizadas pela ligação dihidrofurano ou tetrahydrofurano fundido a um anel de cumarina. Há mais de 20 derivados isolados de AFLs produzidos por várias espécies de fungos, sendo que as mais importantes são produzidas por *A. flavus*, que produz AFB1 e AFB2 e *A. Parasiticus*, que produz AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. Estas AFLs, assim como muitos outros compostos heterocíclicos, fluorescem e são distinguidos por suas propriedades de fluorescência. Ambos AFB1 e AFB2 formam fluorescência azul e AFG1 e AFG2 formam fluorescência verde-amarelada sob luz ultravioleta (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Esses fungos sobrevivem em uma ampla gama de ambientes e podem ser encontrados no solo, em restos de plantas e animais, e em grãos e sementes. Estes dois fungos são responsáveis pela deterioração dos grãos armazenados em todo o mundo, sendo o *A. Flavus*

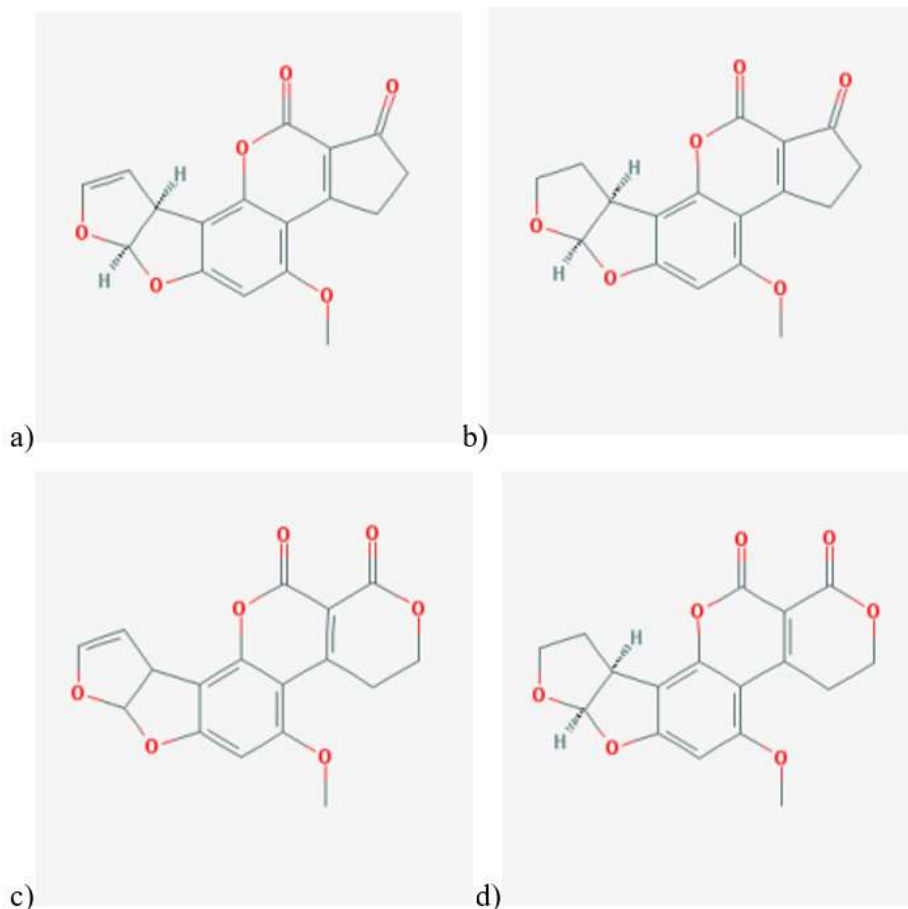
a principal causa de contaminação por AFLs no período pré-colheita de diversas culturas (HUSSEIN; BRASEL, 2001; LIU; GAO; YU, 2006).

A toxicidade das AFLs decresce na seguinte ordem: AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 (SCUSSEL, 2002). Entre as aflatoxinas, AFB1 é a forma mais tóxica para os mamíferos e apresenta propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas, é classificada no grupo classe 1 da IARC e causa danos tais como hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunossupressão e carcinoma hepático (IARC, 1993; REDDY, 2008). As aflatoxinas são um grupo de metabólitos tóxicos produzidos durante o estágio de esporulação dos fungos saprófitos *Aspergillus flavus* e *Arpergillus parasiticus* (LÁZZARI, 1993).

As aflatoxinas são um grupo de metabólitos tóxicos produzidos durante o estágio de esporulação dos fungos saprófitos *Aspergillus flavus* e *Arpergillus parasiticus* (LÁZZARI, 1993).

As aflatoxinas fluorescem fortemente em presença de luz ultravioleta o que permite a checagem rápida de lotes de produtos agrícolas suspeitos de contaminação. A fluorescência é indicação direta de que o fungo *Aspergillus flavus* está presente. Quanto maior for o número de grãos ou partículas com fluorescência, maior é a possibilidade das aflatoxinas estarem presentes. A presença de aflatoxinas em um determinado produto é usualmente associada com a má secagem e condições de armazenamento, porém, elas podem ser produzidas antes da colheita (LÁZZARI, 1993). As estruturas químicas das aflatoxinas estão representadas na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura química das Aflatoxinas: a) Aflatoxina B1 ($C_{17}H_{12}O_6$); b) Aflatoxina B2 ($C_{17}H_{14}O_6$); c) Aflatoxina G1 ($C_{17}H_{12}O_7$); d) Aflatoxina G2 ($C_{17}H_{14}O_7$)



Fonte: PubChem (2018).

3.2.1.4 Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas

Os fungos toxigênicos podem crescer tanto no campo, durante a colheita e a estocagem, devido à vários fatores, sendo estes denominados fatores intrínsecos (quando inerentes ao substrato) e fatores extrínsecos (quando inerentes às condições que envolvem o substrato). Os fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas são classificados em três categorias: fatores físicos, químicos e biológicos (SCUSSEL, 1998), os quais são: umidade relativa, conteúdo de umidade, temperatura, luz, danos mecânicos, microclima (atmosfera), fungicidas, composição do substrato, competição microbiológica (interação microbiana), linhagem do fungo contaminante.

Os mais importantes dentre eles, que levam ao desenvolvimento dos fungos são: temperatura, umidade relativa, conteúdo de umidade, linhagem do fungo contaminante e

competição microbiana (SCUSSEL, 1998). A umidade relativa é a umidade de equilíbrio entre o ambiente e o produto.

Dependendo da umidade presente no alimento e da umidade presente no ambiente, haverá ganho ou perda de umidade do produto, favorecendo ou impedindo a proliferação de fungos. A umidade relativa mínima onde fungos crescem é de 70%; e a umidade relativa ótima é de 80-85%, contudo eles também podem crescer a UR de 90-100% (SCUSSEL, 1998).

3.2.2 Defensivos Agrícolas

Para prevenir ou reduzir perdas na agricultura e melhorar a qualidade dos grãos, o uso de agrotóxicos é reconhecido como importante para a produção de alimentos. A utilização de agrotóxicos na cultura proporciona vantagens, tais como o aumento da eficiência, rentabilidade da produção e qualidade de cereais, no entanto, por outro lado, leva à contaminação da produção agrícola, a água, ar e solo (FERNANDEZ-ALVAREZ et al., 2008). Por isso, para alimentos de alta qualidade, além do controle de fungos e micotoxinas, os resíduos de agrotóxicos nos alimentos também devem ser monitorados. O uso incorreto e a exposição destes compostos podem contaminar o meio ambiente e a saúde dos homens e animais. A ingestão de alimentos é uma fonte toxicológica de exposição aos agrotóxicos cerca de 105 vezes maior que a ingestão de água pelos seres humanos (MARGNI et al., 2002). Devido ao nível de exposição do homem a estes compostos, podem ocorrer efeitos adversos como: dores de cabeça, náusea, distúrbios endócrinos e até câncer (COHEN, 2007).

A produção industrial de agrotóxicos é de 2,5 a 10⁹ kg ao ano (CAJKA et al., 2008; KOVALCZUK et al., 2008). De acordo com os dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresentados em 2009, o Brasil é o maior mercado consumidor de agrotóxicos no mundo, com 86% do uso destes produtos na América Latina, sendo o principal destino de agrotóxicos proibidos no exterior (BRASIL, 2009). Para melhor controle da exposição humana aos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos, as agências reguladoras de vários países têm criado programas de monitoramento (SKRBIĆ; PREDOJEVIĆ, 2008).

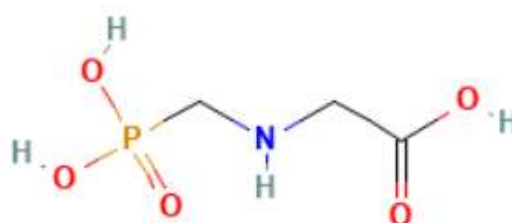
No Brasil, a ANVISA criou em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com o objetivo de monitorar e adotar medidas de controle em relação aos níveis de resíduos de agrotóxicos, já que dados da Anvisa revelam que 15% dos alimentos consumidos pelos brasileiros apresentam taxas de resíduos de agrotóxicos em um nível prejudicial à saúde (BRASIL, 2003; BRASIL,

2009). As análises do PARA avaliam a quantidade de resíduo legalmente aceita dentro dos limites máximos de resíduos (LMR) na cultura e o uso indevido de agrotóxicos não permitidos (BRASIL, 2003).

O glifosato é o ingrediente ativo em produtos herbicidas, como o RoundUp™. Os produtos de glifosato são um dos herbicidas mais amplamente usados em fazendas, jardins e gramados. Esses produtos geralmente contêm glifosato em combinação com outros ingredientes que ajudam a melhorar a absorção do glifosato na planta. Formulações à base de glifosato (GBFs) são facilmente compradas na maioria das lojas. Esses produtos podem ter diferentes combinações de outros ingredientes ou diferentes concentrações de glifosato (PUBCHEM,2023).

O glifosato (Figura 6) é um composto organofosforado sintético que bloqueia a atividade da enolpiruvilxiqumato-3-fosfato (EPSP) sintase e é usado como pesticida de amplo espectro. É caracterizado como um sólido ou pó cristalino volátil, moderadamente tóxico, incolor e inodoro, e a exposição ocorre por inalação, ingestão ou contato (PUBCHEM, et al., 2023).

Figura 6 - Estrutura química glifosato (C₃H₈NO₅P)



Fonte: PubChem (2023).

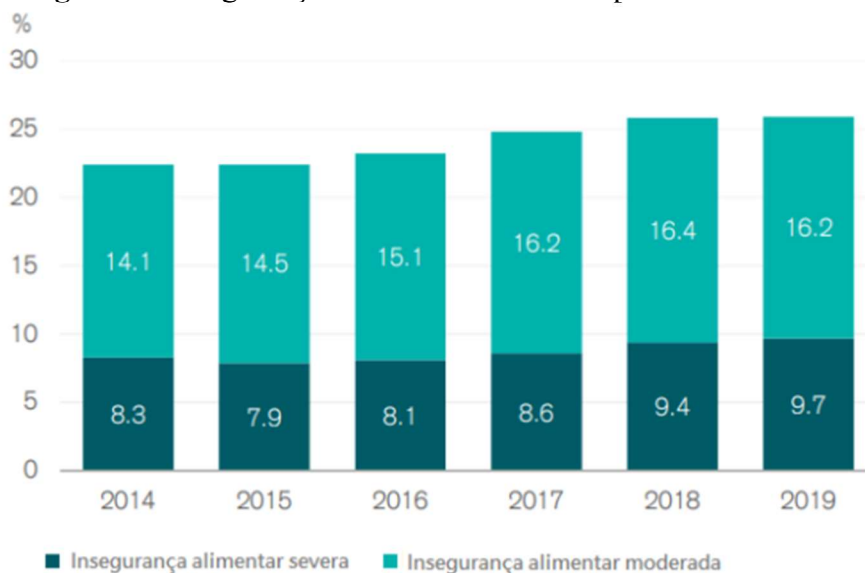
O glifosato tem fórmula molecular C₃ H₈ NO₅ P (m.m. = 169,1 g/ mol). Em condições ambientais, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12 g/L a 25 °C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. Glifosato funde a 200 °C, possui densidade aparente de 0,5 g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60 °C (AMARANTE JUNIOR, 2002).

3.3 TENDÊNCIA DO MERCADO *PLANT-BASED*

Foi realizado uma projeção do crescimento populacional mundial para 2050 e o mundo deverá alimentar aproximadamente 9,8 bilhões de pessoas, em paralelo, a produção

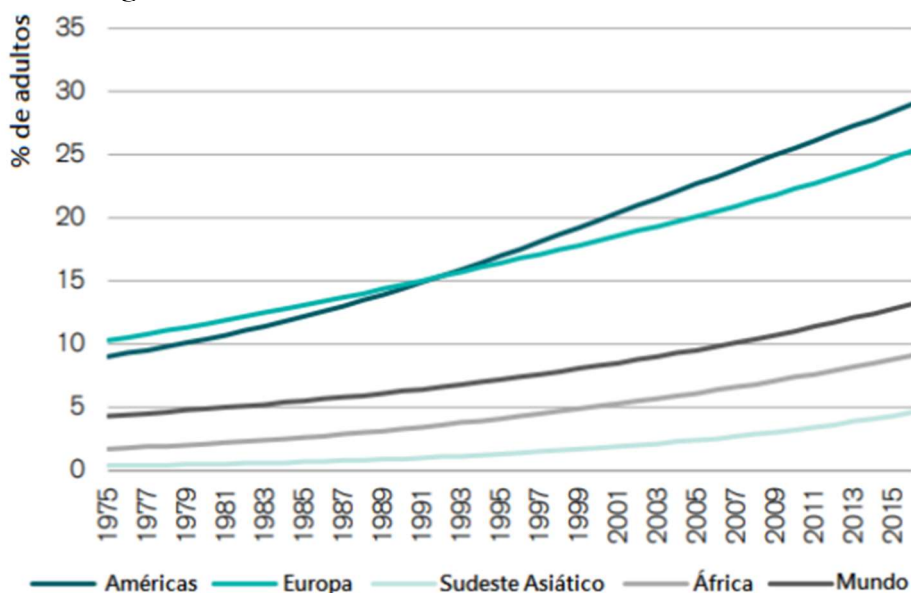
de alimento terá um crescimento de mais de 50% (ONU, 2019). Conseqüentemente, os casos de insegurança alimentar e a população obesa continuará em crescimento, como mostra os gráficos de tendências (Figura 7 e 8) realizados até a última década.

Figura 7 - Insegurança alimentar mundial no período de 2014 a 2019



Fonte: Adaptado de WHO (2016); Credit Suisse Research (2021).

Figura 8 - Número de obesos no mundo entre 1975 a 2015



Fonte: Adaptado de WHO (2016); Credit Suisse Research (2021).

De acordo com alguns pesquisadores, o avanço na produção de alimentos para 2050 resultará em grandes impactos ambientais. Além do viés ambiental, essa situação também é preocupante em relação às questões sociais, visto que o número de pessoas em condições de desnutrição é de cerca de 899 milhões, e 70% desse grupo, tem suas moradias localizadas em

áreas muito vulneráveis com risco iminente de desastre naturais, resultado das mudanças climáticas (FAO, 2017).

Avaliando essa tendência, a produção de proteínas também deve crescer até 50%, visto que a desnutrição tem como origem, além da desigualdade na distribuição de alimentos, o baixo consumo proteico, sendo necessário, portanto, sistemas alimentares mais sustentáveis e igualitários capazes de suprir a necessidade de proteínas dos indivíduos (PYETT et al., 2019).

Em 2018, a *Plant Based Food Association* demonstrou que as vendas na indústria *Plant-based* aumentaram 20% em relação a 2017. No ano seguinte, foram apresentadas as tendências e, novamente, os produtos *Plant-based* se destacaram com o maior crescimento. Esse aumento foi motivado pela adoção de um estilo de vida mais saudável, pela grande procura por alimentos sem glúten e sem lactose, e pela aderência a dietas vegetarianas e veganas.

Em um relatório emitido pela *Global Plant-based Food Ingredients Market*, em 2019, esse segmento foi avaliado em 11056 milhões de dólares, com perspectiva de aumento para 21351,9 milhões de dólares em 2026. O mesmo relatório indicou que a Europa deteve o título da região que mais vendeu, chegando a 35% das vendas, seguido da América do Norte com 32%, em terceiro lugar com 25% está a Ásia, e as demais regiões, juntas, venderam cerca de 9% (MACEDO, 2021).

3.4 BEBIDA VEGETAL

Um dos alimentos mais completos e nutritivos para consumo humano, composto por gordura, açúcares, proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais, é o leite de vaca (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020). Mesmo assim, há uma forte tendência mundial dos consumidores em buscar produtos ou empresas que alegam preocupação ambiental produzindo alimentos de forma sustentável e com qualidade nutricional (MCCLEMENTS; NEWMAN; MCCLEMENTS, 2019). Também, observa-se a crescente quantidade de pessoas que estão aderindo ao vegetarianismo e veganismo (PAUL et al., 2019). Atrelado à essa tendência, encontra-se o alto índice de pessoas com problemas de saúde envolvendo hábitos alimentares irregulares e os que possuem alguma alergia ou intolerância alimentar, como no caso dos intolerantes à lactose. Isso tem estimulado pesquisadores a avançarem os estudos nesta área buscando soluções para esse impasse, e o desenvolvimento de bebidas não alcoólicas, semelhante ao leite, à base de grãos, tem sido uma opção de inovação desde a última década (VENTURINI FILHO, 2010; OLIVEIRA et. al., 2018).

Uma pesquisa realizada por Morrison (2022), revelou que os produtos alternativos lácteos ocupam o maior espaço na categoria *plant-based* com o leite liderando o primeiro lugar. Atualmente, é possível encontrar uma grande variedade de bebidas vegetais que apresentam um aspecto semelhante ao leite de vaca, no entanto algumas características como odor, sabor e composição ainda são muito diferentes.

Um estudo realizado em 2007, revelou que o extrato hidrossolúvel de soja, popularmente conhecido como “leite de soja” teve um crescimento de 124 milhões no consumo mundial quando comparado ao ano de 2002 (CARVALHO et al., 2011). Recentemente, os dados foram atualizados revelando uma queda de 19% na venda das bebidas à base de soja no ano de 2018, quando comparada com o ano anterior. Uma das justificativas desse declínio se dá pelo fato de associarem o grão de soja com práticas que agridem o meio ambiente, contradizendo a causa defendida pela maioria dos consumidores desse tipo de produto, que priorizam a sustentabilidade. Outra causa provável deve-se ao fato do sabor não ser muito agradável, pois, nesse período, outras bebidas com matérias-primas diferentes e aspecto mais cremoso e adocicado, foram surgindo, permitindo a comparação e a substituição da bebida soja (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2019).

Existem vários outros extratos vegetais, além da soja, que estão sendo usados como substitutos do leite. A bebida à base de amêndoas, por exemplo, popular nos países mediterrâneos, foi muito utilizada na Idade Média para a produção de manteiga e queijo, visto que o leite de vaca era muito perecível devido às condições higiênico-sanitárias e de armazenamento da época. Em relação ao valor nutricional das amêndoas, destaca-se presença de vitamina E, manganês, magnésio, cobre, fosfato, fibra, riboflavina, ácidos graxos insaturados e proteínas, além de reduzir a taxa de glicemia e ter boa biodisponibilidade de α -tocoferol, composto responsável pela redução da oxidação de LDL (lipoproteína de baixa densidade) (FASOLI et al, 2011). Os macronutrientes, os carboidratos e as gorduras representam cerca de 23% e 35%, respectivamente, sendo o teor lipídico constituído principalmente pelas gorduras monoinsaturadas (PAUL et al., 2019).

Entretanto, a amêndoas pertence ao grupo de alimentos que causam reações adversas, sendo restrito o seu consumo (TIWARI et al, 2010). Segundo Roder, Vieths e Holzhauser (2011), 1,15% da população estadunidense possui alergia à essa oleaginosa, com forte tendência de crescimento entre as crianças. Isso faz com que a possibilidade do extrato de amêndoas ser usado como substituto do leite, reduza.

Em compensação, as bebidas à base de arroz vêm ganhando destaque em pesquisas científicas, com foco principal no desenvolvimento de fórmulas hidrolisadas para o

público infantil alérgico ao leite de vaca. A fórmula infantil hidrolisada de arroz foi testada e aceita por mais de 90% das crianças alérgicas ao leite de vaca, com idade média de 4,3 meses (RECHE et al, 2010). No entanto, apesar da bebida não desencadear reações alérgicas, Faccin et al. (2009) alerta para sua limitação devido ao baixo teor de proteínas e elevado teor de carboidratos quando comparada com as outras bebidas vegetais. Ele também aponta que esse tipo de bebida requer atenção quanto ao uso de agrotóxicos e ao armazenamento pós processamento, pois há grandes chances de desenvolver riscos químicos e microbiológicos.

Ao avaliar esse mercado de modo geral, houve um crescimento de 51,5% no ano de 2018. Nessa porcentagem, foi significativo principalmente para as bebidas elaboradas à base de amêndoas, coco, arroz e aveia (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2019). De acordo com pesquisas realizadas por Sterna, Zute e Brunava (2016) a bebida de aveia se destaca quando comparado o conteúdo nutricional com outros cereais como soja, coco e amêndoas, fornecendo um ótimo perfil de ácidos graxos insaturados e fibras alimentares.

Entre as fibras presentes na aveia, a β -glucana, fibra solúvel que ajuda no sistema gastrointestinal, representa cerca de 3,9 a 7,5% da massa seca. Essa riqueza em β -glucana, contribui para a redução da absorção de colesterol, pois a fibra é responsável pela formação de um gel espesso que liga se às moléculas de colesterol (PAUL et al., 2019). Assim como o leite de vaca, o extrato de aveia possui metade do conteúdo calórico composto por proteína e gordura.

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal de algumas fontes de extrato vegetal.

Tabela 1 - Composição centesimal de fontes de extrato vegetal

Extratos vegetais	Composição centesimal (g/100 mL)				
	Umidade	Proteínas	Lipídios	Carboidratos totais	Cinzas
Amêndoas	93,725 ± 0,001	1,35 ± 0,03	3,695 ± 0,001	0,993 ± 0,001	0,23 ± 0,01
Castanha de caju	95,075 ± 0,001	0,863 ± 0,001	1,985 ± 0,001	1,920 ± 0,001	0,13 ± 0,02
Coco	93,725 ± 0,006	0,415 ± 0,001	4,633 ± 0,001	1,353 ± 0,006	0,22 ± 0,01
Aveia	91,275 ± 0,001	0,927 ± 0,001	0,055 ± 0,000	7,653 ± 0,001	0,095 ± 0,001
Amendoim	90,275 ± 0,003	2,667 ± 0,001	5,493 ± 0,002	5,493 ± 0,002	0,228 ± 0,002

Fonte: Bayer (2019).

3.4.1 Processamento da Bebida Vegetal

A fabricação de bebidas à base de vegetais é uma técnica antiga, antes do século XIII (AIDOO et al., 2010). Sua produção é feita através da mistura de cereais,

leguminosas, oleaginosas e até pseudocereais; água, óleo, cloreto de sódio e/ou alguns aditivos alimentares, como corantes, aromatizantes e estabilizantes e são frequentemente submetidos a tratamentos enzimáticos. São, portanto, caracterizados por emulsões de bebidas termodinamicamente instáveis (GHARIBZAHEDI et al, 2012).

Hoje em dia, as melhores características sensoriais dos extratos vegetais, deve-se às inovações tecnológicas aplicadas nas indústrias de alimentos, permitindo a aceitabilidade da bebida com adição de ingredientes e aditivos que proporcionam sabor e aroma agradáveis que são inerentes da matéria-prima utilizada, agradáveis (RODRIGUES, 2003).

Não há um procedimento correto quanto ao processamento dos extratos vegetais, pois é variável de acordo com a matéria-prima escolhida. Contudo, tem-se algumas etapas padrão durante o processamento. Primeiramente, ocorre a moagem e maceração, em seguida o extrato passa pela filtração para a retirada de impurezas maiores e partes insolúveis. Na sequência, os demais ingredientes como agentes estabilizantes, aromas e açúcares, vão sendo adicionados (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020).

A eficiência da extração, está diretamente ligada ao rendimento do produto, e para melhorar este processo, alguns tratamentos podem ser aplicados como pH, temperatura e aplicação de enzimas. O aumento do pH por meio da adição de bicarbonato de sódio, com posterior neutralização, ajuda na extração da maior parte das proteínas. Para uma melhor extração de gordura, é necessário alterar o tratamento térmico, elevando a temperatura, porém essa modificação reduz a solubilidade das proteínas. Enquanto que as enzimas são utilizadas como um facilitador no processo de hidrólise parcial das proteínas e polissacarídeos, além de melhorar algumas características sensoriais, principalmente por conferir um sabor mais adocicado sem acrescentar açúcares (MAKINEN et al., 2016).

O extrato vegetal é dividido em fase líquida e fase sólida, sendo necessário a adição de estabilizantes ou hidrocolóides para manter a emulsão dessas fases estáveis. Outra opção para melhorar a estabilidade e, conseqüentemente, auxiliar na redução do tamanho de partículas, é a aplicação de pressão na etapa de homogeneização (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2020).

3.5 APLICAÇÃO DE OZÔNIO EM CEREAIS

Uma vez que o grão pode apresentar contaminação por micotoxinas, alguns métodos de descontaminação podem ser aplicados objetivando a degradação dessas substâncias. Métodos alternativos como o controle biológico e microbiológico, radiação

ionizante, micro-ondas e ozonização, capazes de destruir ou remover a toxina em níveis aceitáveis, têm sido foco de diversas pesquisas. Tais metodologias, embora sejam consideradas promissoras, ainda necessitam de estudos para aplicação em larga escala, principalmente referentes à eficácia, custos empregados e alterações das características químicas, nutricionais e tecnológicas dos alimentos processados (TROMBETE, 2016).

A aplicação de ozônio (O_3) no processamento de alimentos é considerada uma tecnologia emergente perante o efeito de degradação de micotoxinas, devido a alta capacidade oxidante, como também o poder de reduzir ou eliminar microrganismos nos alimentos, sendo essa tecnologia reconhecida pelo FDA (Food and Drug Administration – US) (ALWI; ALI, 2014; KYING e ALI, 2015). A alta capacidade oxidante é responsável por promover a degradação molecular das micotoxinas e, a eficácia de tal processo depende de alguns fatores, tais como o tipo de alimento, a concentração do O_3 e o tempo de exposição (DIAO et al., 2012; LUO et al., 2014a; LUO et al., 2014b).

A ozonização gasosa é comumente utilizada em pesquisas para armazenamento de cereais. O O_3 injetado em silo de armazenamento reage rapidamente com a massa de grãos, tendo rápida decomposição. Após a saturação parcial da massa e com um maior tempo de exposição, o O_3 atravessa livremente pelos grãos, podendo ser detectado na saída no sistema (MENDEZ et al., 2003). A reação do O_3 com a massa de grãos depende de determinados fatores, com ênfase na quantidade de grãos, a concentração do O_3 e o tempo de exposição do alimento ao processo (TIWARI et al., 2010).

As principais aplicações do processamento de alimentos com o O_3 têm sido o controle de pragas durante o armazenamento (SOUSA et al., 2008), eliminação de fungos (WU et al., 2007), degradação de micotoxinas (LI; GUAN; BIAN, 2014; MOHAMMADI KOUCHESFAHANI et al., 2015) e degradação de resíduos de pesticidas (FAN et al., 2015).

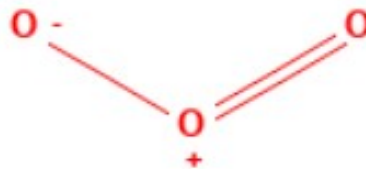
Como o O_3 não deixa nenhum resíduo no alimento tratado, não existe necessidade de aeração após o tratamento. Por essa razão e, também, pelos excelentes resultados promovidos pela ozonização na melhoria da segurança do alimento, a ozonização é considerada uma “alternativa verde” para melhoria da qualidade dos alimentos (GREENE; GUZEL-SEYDIM; SEYDIM, 2012).

3.5.1 Descontaminação Química Através da Aplicação do Gás Ozônio

O ozônio é um alótropo triatômico (O_3) composto por três átomos de oxigênio que se formam quando as moléculas de oxigênio se rompem devido à radiação ultravioleta e os

átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio. Devido à maior estabilidade do oxigênio, a molécula de O_3 sofre um processo de dissociação espontânea ao longo do tempo para formar novamente o oxigênio (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991). A decomposição não produz substâncias nocivas, pois é convertida espontaneamente em O_2 . Por ser instável, necessita ser produzido no local de sua aplicação, reduzindo assim os custos e riscos associados ao seu transporte e armazenamento (ARMOR, 1999; TATAPUDI; FENTON, 1994).

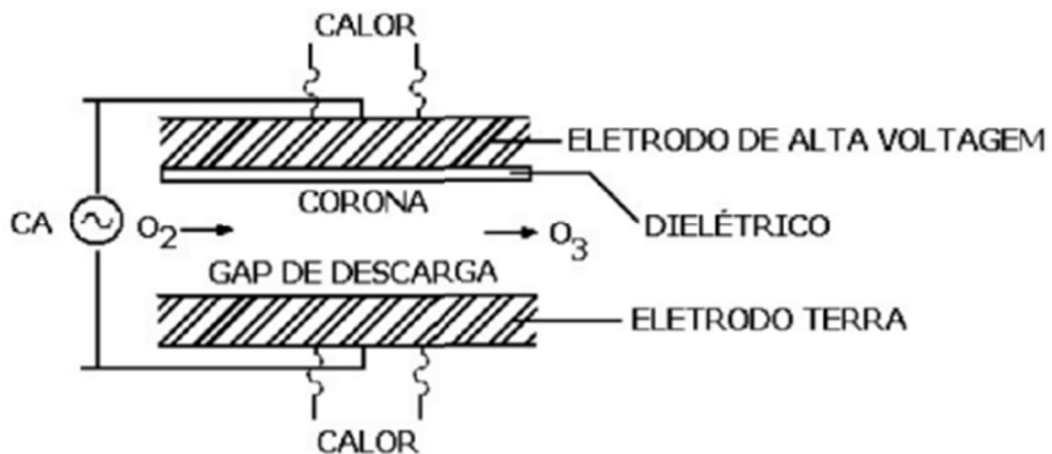
Figura 9 - Estrutura química do ozônio (O_3)



Fonte: PubChem (2023).

A produção comercial do ozônio é realizada pelo processo de descarga elétrica, também chamado de corona (USEPA, 1999). O processo consiste em dois eletrodos submetidos a uma alta diferença de potencial (cerca de 1000 V). O_3 é produzido pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos. Quando os elétrons têm energia suficiente para dissociar a molécula de O_2 , iniciam-se as colisões, resultando na dissociação do O_2 e na subsequente formação do O_3 , conforme mostra a Figura 9 (USEPA, 1999).

Figura 10 - Gerador de ozônio tipo descarga de corona



Fonte: USEPA (1999).

No processo de descarga de corona, o ar seco ou gás oxigênio é alimentado através de uma abertura entre dois eletrodos, separados por um material dielétrico. Uma forte descarga elétrica é aplicada em seguida, produzindo elétrons livres que causam a dissociação de moléculas de oxigênio para a forma atômica. Quando o oxigênio atômico colide com o oxigênio molecular, o ozônio é formado (CARLINS E CLARK, 1982). A concentração de ozônio produzido neste sistema depende da tensão, corrente, frequência, material dielétrico, folga de descarga, pressão absoluta dentro da descarga, e concentração de oxigênio no gás que passa pelos eletrodos (HORVÁTH; BILITZKY; HUTTNER, 1985). Geradores de ozônio de descarga corona de alta eficiência podem produzir até 14% (massa base) de ozônio na mistura de gás oxigênio disponível atualmente. O nitrogênio e a umidade no ar combinados com o ozônio, podem causar ácido nítrico que causa corrosão e danos ao gerador (HORVÁTH; BILITZKY; HUTTNER, 1985). É mais econômico produzir ozônio a partir de oxigênio do que o ar (GEERING, 1999).

O ozônio é um gás altamente corrosivo, portanto, o equipamento de processamento deve ser feito de materiais compatíveis com ozônio, tais como aço inoxidável 316 e Teflon para manter a funcionalidade do processo e segurança dos operadores (CHAWLA et al, 2012).

A ozonização de grãos também pode ser realizada através da água ozonizada, como por exemplo em alimentos que necessitam de uma etapa de umidificação dos grãos antes do processo de moagem (IBANOĞLU, 2001).

Ozônio é um poderoso agente oxidante e desinfetante (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004; KEELS et al., 2001; MCKENZIE et al., 1998; MENDEZ et al., 2003) capaz de participar de um grande número de reações com compostos orgânicos e inorgânicos (ALMEIDA; ASSALIN; ROSA, 2004; KUNZ; PERALTAZAMORA, 2002). Apesar de reagir com a maioria dos compostos contendo ligações duplas, como C=C, C=N, N=N, etc., não reage com grupos funcionais contendo ligações simples, como C-C, C-O, O-H, etc (ALMEIDA; ASSALIN; ROSA, 2004; GOGATE; PANDIT, 2004). O gás O₃ é um poderoso germicida, usado em engenharia sanitária para desinfetar a água potável e remover odores e sabores indesejados. É também um gás oxidante com diversas aplicações na indústria alimentícia devido às suas vantagens na tecnologia de preservação.

O O₃ foi reconhecido como seguro em 1997, sendo que em 26 de junho de 2001, o FDA publicou uma determinação oficial sobre a utilização do O₃ admissível como um agente antimicrobiano para o tratamento, armazenamento e processamento de alimentos em gás

e uma fase aquosa em contato direto com os alimentos, incluindo as matérias-primas, além de frutas e hortaliças minimamente processadas (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004). O O_3 já se mostrou eficaz contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias (KIM; YOUSEF, 2000; SHARMA et al., 2002; XU, 1999), fungos (PALOU et al., 2002; PEREZ et al., 1999) vírus e protozoários (CULLEN et al., 2009; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; RESTAINO et al., 1995). Além disso, também tem potencial para matar pragas de armazenagem (KELLS et al., 2001; MENDEZ et al., 2003), degradar micotoxinas (CULLEN et al., 2009), agrotóxicos e resíduos químicos (HWANG; CASH; ZABIK, 2001).

A eficácia do ozônio depende de vários fatores, incluindo a concentração do próprio composto utilizado, as características de cada alimento e os fatores ambientais (temperatura e umidade) que contêm O_3 . O excesso de O_3 é rapidamente degradado para produzir O_2 , não deixando resíduos nos alimentos (NAITO; TAKAHARA, 2006). Surgiu como uma alternativa potencial que oferece os benefícios de melhorar a qualidade e a produção de alimentos.

A ação do O_3 para redução dos compostos químicos, tais como as micotoxinas e os agrotóxicos, pode levar à formação de subprodutos das reações de degradação, resultante da ozonólise. No entanto, a toxicidade de muitos destes subprodutos, tem sido reduzida quando comparada ao composto original. O O_3 pode degradar totalmente o composto ou causar modificações químicas, reduzindo sua atividade biológica, isto irá depender da estrutura química a ser degradada (CULLEN et al., 2009; DIAO; HOU; DONG, 2013; MCKENZIE et al., 1997; TIWARI et al., 2010). Nas micotoxinas, tais como AFLs, o O_3 reage com a dupla ligação C_8, C_9 do anel furano da AFB1 através do ataque letrofilico com base no mecanismo de Criegee, e desta forma origina produtos intermediários. A destruição desta dupla ligação do C_8 e C_9 do anel furano significada que a toxicidade foi reduzida ou mesmo desapareceu (MCKENZIE et al., 1997).

3.5.2 Aplicações de Ozônio para Redução de Micotoxinas em Alimentos

Cada dia mais consumidores estão conscientes e preocupados com a segurança dos alimentos que consomem, bem como dos riscos associados com a contaminação por microrganismos e substâncias tóxicas (KHER et al., 2013). A presença de contaminantes nos alimentos, como micotoxinas, tem se destacado em termos de saúde pública e segurança do alimento.

A produção de micotoxinas depende das condições ambientais durante o crescimento da planta e durante o armazenamento do alimento, podendo ser difícil o controle total das condições. Assim, a presença das micotoxinas no produto final é muitas vezes inevitável (STOEV, 2015). Outro fator que dificulta a prevenção de tal contaminação é o fato de serem substâncias muito estáveis aos tradicionais processamentos que são aplicados nas matérias primas alimentares. Dessa forma, se a matéria-prima estiver contaminada, as micotoxinas irão também estar presente nos alimentos processados (EFSA, 2013; TIBOLA et al., 2015).

Estudos recentes mostraram que a ozonização pode ser usada para descontaminar alimentos com micotoxinas, principalmente em vegetais frescos, frutas e cereais. O ozônio molecular (O_3) ou os radicais hidroxila resultantes, especialmente em água ozonizada, reagem com tais contaminantes para acelerar sua decomposição e formar produtos de baixo peso molecular, reduzir ou eliminar a atividade biológica dessas substâncias com relação à toxicidade (IKEHATA et al., 2006; DIAO et al., 2012; LUO et al., 2014a).

Quando o O_3 é aplicado em baixas concentrações durante o armazenamento de frutas e cereais por um longo período de tempo ocorre a inibição do desenvolvimento de esporos fúngicos, prevenindo dessa forma a formação das micotoxinas (FELIZIANI; ROMANAZZI; SMILANICK, 2014; HANSEN; HANSEN; VAGN, 2013). Entretanto, tais efeitos dependem do fungo envolvido, do estágio de crescimento, da concentração de O_3 e do tempo de exposição (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2010). Por outro lado, para que seja promovida a degradação molecular das micotoxinas, altas concentrações de O_3 são necessárias. A concentração, tempo de exposição, tipo de alimento, teor de umidade, forma de aplicação (gasosa ou aquosa), dentre outros fatores, também afetam diretamente a eficácia da descontaminação. Como efeitos secundários da descontaminação, a ozonização pode promover alterações positivas na qualidade do alimento, tais como, aumento no volume de pães e bolos ou aumento na força e claridade de farinhas (CABALLERO; GÓMEZ; ROSELL, 2007). Entretanto, alterações negativas também podem ocorrer, tais como oxidação lipídica, alterações nas características sensoriais, perda de cor, degradação de compostos fenólicos e algumas vitaminas, dentre outras (PATIL et al., 2010; GABLER et al., 2010). Tais alterações negativas devem ser estudadas para que se conheça as limitações dessa tecnologia.

Desde 2001, o FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) reconheceu o O_3 como uma substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para tratamento e armazenamento de alimentos e água (FDA, 2001). A vantagem de usar O_3 para descontaminação de alimentos em relação a outros oxidantes é que sua produção e aplicação são ambientalmente seguras e

não deixam resíduos nos alimentos, pois se dissociam em oxigênio. O O₃ é, portanto, reconhecido como uma 'tecnologia verde' (O'DONNELL et al., 2012; GREENE; GUZEL-SEYDIM; SEYDIM, 2012).

3.5.3 Aplicação do Ozônio (O₃) na Redução de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

Resíduos de agrotóxicos são quaisquer substâncias presentes nos alimentos, resultantes do uso de agrotóxicos, incluindo seus metabólitos, produtos de reação e outras impurezas, e que apresentem relevância toxicológica (BRASIL, 1998). Agrotóxicos são usados na agricultura para aumentar a produtividade das culturas através da proteção contra doenças e pragas. Entretanto, os agrotóxicos devem ser aplicados em acordo com as Boas Práticas Agrícolas (BPA) e os níveis de tais substâncias presente no alimento para consumo devem estar abaixo do LMP (Limite máximo permitido). Os LMPs para resíduos de agrotóxicos diferem a nível mundial, já que os diferentes países usam diferentes critérios para a definição de normas regulatórias (EFSA, 2015; HANDFORD; ELLIOTT; CAMPBELL, 2015).

Atualmente, o uso global de agrotóxicos, de aproximadamente dois milhões de toneladas por ano (DE et al., 2014), somado ao constante aumento da resistência das pragas e doenças, tem gerado preocupação em relação a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos (LIU et al., 2015). O impacto na saúde humana devido ao uso dos agrotóxicos na agricultura tem aumentado nos últimos anos, devido as evidências dos efeitos tóxicos de tais substâncias e da alta exposição humana, tendo como consequência a ocorrência de diversas doenças crônicas, tais como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e desordens do sistema reprodutivo (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; PARRÓN et al., 2014). Tal contaminação é especialmente preocupante para crianças devido à baixa capacidade de detoxificação e a alta ingestão de alimentos por Kg de peso corpóreo (LOMBARD, 2014).

Alimentos que contenham resíduos de agrotóxicos são fontes diretas de exposição para ser humano e, mesmo que alguns processos industriais reduzam a concentração de tais substâncias, tais como a remoção de casca e cozimento dos alimentos, esses resíduos podem permanecer no produto final, representando um risco à saúde se ingeridos em altas concentrações, ou durante longo período de tempo (KAUSHIK; SATYA; NAIK, 2009). Os limites máximos permitidos (LMP) para resíduos de pesticidas em alimentos são regulamentados por diversos países, no entanto não existem normas harmonizadas a nível global (MALIK, BLASCO; PICÓ, 2010). De forma geral, os países desenvolvidos possuem legislações mais restritivas do que os países em desenvolvimento e tal diferença pode ser

considerada uma barreira técnica para comercialização e para a proteção da saúde pública (HANDFORD; ELLIOTT; CAMPBELL, 2015).

Nos últimos anos, novos métodos analíticos, tal como a espectrometria de massas, têm sido de grande importância na identificação e quantificação de tais substâncias em uma grande variedade de matrizes alimentícias (MALIK, BLASCO; PICÓ, 2010; ROMERO-GONZÁLEZ, 2015). Através de tais métodos, os resíduos de agrotóxicos também têm sido identificados em sangue humano, urina, leite materno e cabelo por diversos autores, indicando uma alta exposição humana em nível mundial (EL-MORSI; RAHMAN, 2012; DEWAN et al., 2013; YUSA et al., 2015).

O número de estudos investigando o potencial do uso da ozonização na redução de resíduos de agrotóxicos em alimentos tem aumentado na última década, especialmente envolvendo o uso de água ozonizada para lavar vegetais e da ozonização gasosa para o tratamento de cereais. O princípio da degradação de tais resíduos pode ser explicado pelo efeito oxidante do O_3 na molécula dos agrotóxicos, onde através de reações seletivas (via direta), especialmente as envolvendo as duplas ligações de hidrocarbonetos, ou reações não seletivas (via indireta), tais as que envolvem radicais de alto potencial oxidante que atacam moléculas orgânicas e inorgânicas, degradam as moléculas de agrotóxicos, eliminando seu potencial tóxico (IKEHATA; NAGHASHKAR; GAMAL, 2006; ORMAD et al., 2008).

A ozonização aplicada em alimentos, ao contrário da usada para tratamento de água, possui a limitação de não poder ser drástica devido às alterações na qualidade do alimento. Conseqüentemente, a otimização das condições de descontaminação deve ser estudada para cada alimento e para cada grupo de agrotóxico (TROMBETE, 2016).

As culturas agrícolas podem não ser comercializadas quando contêm pesticidas que excedam o limite residual (YAMAGUCHI, 2006). Além disso, os resíduos de pesticidas alimentares têm efeitos tóxicos à saúde humana e animal. Portanto, o desenvolvimento de novas metodologias para eliminar os pesticidas residuais têm sido estudadas (IKEHATA; GAMAL EL-DIN, 2005a, 2005b, 2006; GABLER et al., 2010; IKEURA et al., 2011; KUSVURAN et al., 2012; IKEURA et al., 2013). Nesse sentido, o tratamento com ozônio pode ser considerado uma estratégia emergente.

3.5.4 Aplicações de Ozônio para Redução de Microrganismos

A presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é denominada de contaminação microbiológica, na qual inclui bactérias, fungos, leveduras, protozoários e vírus.

A contaminação microbiológica dos alimentos tornou-se um problema na maioria das indústrias de alimentos. Embora as estratégias de higiene sejam mantidas nas indústrias, é difícil eliminar completamente a contaminação. Os microrganismos patogênicos podem causar várias doenças, como botulismo, intoxicação alimentar e outras infecções entéricas, produzindo metabólitos tóxicos (BRAUN, 2011).

O crescente interesse em novos sistemas de processamento e preservação de alimentos é impulsionado por vários fatores, incluindo (a) a preferência do consumidor por alimento processado livre de conservantes químicos; (b) recente publicidade altamente divulgada sobre surtos de doenças transmitidas por alimentos causadas por agentes patogênicos como as *Salmonelas* sp., *Escherichia coli* entero hemorrágica, e *Listeria monocytogenes*; e (c) a aprovação de novas legislações de segurança dos alimentos nos EUA e outros países (por exemplo FDA). Consistente com estes desenvolvimentos, os processadores de alimentos estão em busca de agentes antimicrobianos mais potentes (CHAWLA et al, 2012).

O ozônio tem sido aplicado de forma eficaz na água potável desde 1906. É o desinfetante oxidante mais forte que pode ser usado no processamento de alimentos. Com isso, várias empresas pequenas já têm incorporado o ozônio em suas linhas de processamento. O ozônio pode ser adaptado para operações de processamento de alimentos existentes com poucas modificações. No entanto, há preocupações sobre os custos e riscos associados ao uso de ozônio nos alimentos em processamento (CHAWLA et al, 2012).

O ozônio tem um amplo espectro antimicrobiano. Sua eficácia foi demonstrada contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, esporos bacterianos, fungos, vírus e protozoários. Assim, a maioria dos microrganismos são sensíveis ao ozônio, o que sugere que as células possuem vários locais para ação e reação do ozônio, levando à letalidade celular. Um dos locais propostos de interação ozônio são os lipídios insaturados da membrana da célula membrana (CHAWLA et al, 2012).

O₃ é um poderoso agente antimicrobiano devido a uma potente capacidade de oxidação (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001) e, adicionalmente, sofre auto decomposição para oxigênio molecular sem deixar resíduos de alimentos. Por exemplo, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA classificou o O₃ como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) para ser usado em água engarrafada e no processamento de alimentos (GRAHAM, 1997). Além disso, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 1994) reconhece as características potentes de desinfetantes de O₃.

3.5.5 Produção Industrial de Ozônio e Legislação Para o Uso no Processamento de Alimentos

A produção do O_3 deve ocorrer no local onde será realizada a ozonização e seu uso deve ser realizado imediatamente após produzido, devido sua instabilidade e rápida dissociação em O_2 . Quando utilizado em estudos para descontaminação de alimentos, o O_3 têm sido gerado predominantemente por descarga de corona. Nesse tipo de ozonizador as moléculas de O_2 são expostas a uma alta descarga elétrica, capaz de dissociar o O_2 em oxigênio atômico, com conseqüente formação de O_3 (WCBBC, 2006). Através do método de descarga de corona é possível obter altas concentrações de ozônio por litro de ar ambiente ou de oxigênio industrial a baixo custo, entretanto, a radiação UV também pode ser utilizada para produzir O_3 , mas, com menor concentração e menores rendimentos de produção (TAPP; RICE, 2012).

O O_3 pode ser aplicado na forma gasosa diretamente no alimento, como ocorre na ozonização de grãos de cereais, ou, também pode ser borbulhado em água para a produção da água ozonizada, a qual é principalmente utilizada para ozonização de matérias primas que necessitam de um processo de higienização durante o processamento, tais como frutas e hortaliças (COELHO et al., 2015).

Na forma gasosa e em presença de alimentos, o tempo de meia vida do O_3 é de poucas horas, no entanto, em ar seco a 0 % de umidade pode atingir estabilidade de até 25 h (McCLURKIN; MAIER; ILELEJI., 2013). Quando borbulhado em água, o O_3 se dissolve parcialmente, formando radicais hidroxil (-OH) que podem oxidar os contaminantes com mais eficácia do que o O_3 (TAKAHASHI; CHIBA, 2007). A água ozonizada pode ser utilizada para lavar diversos tipos de alimentos, principalmente vegetais, mas também alguns tipos de cereais que necessitam de uma etapa de acondicionamento em alta umidade antes do processo de moagem, como os grãos de trigo (IBANOĞLU, 2001).

Os geradores de ozônio MyOzone® são equipamentos eletroeletrônicos projetados para aplicações industriais que necessitam grandes quantidades de ozônio em altas concentrações. O equipamento converte o oxigênio diatômico (O_2) em oxigênio triatômico (O_3) também conhecido por ozônio. A transformação ocorre quando o oxigênio passa através de um reator, conhecido como célula de geração de ozônio, onde existe a Descarga por Geração de Plasma. Este tipo de descarga é produzido ao se aplicar uma alta tensão elétrica entre dois eletrodos paralelos em quartzo, tendo entre eles um dielétrico e um espaço livre, por onde flui o oxigênio. Neste espaço livre é produzido o plasma, onde são gerados uma grande quantidade de elétrons com energia suficiente para produzir a quebra molecular do oxigênio (O_2), formando

o ozônio (O_3). O controle de potência é realizado de forma digital através de microcontrolador incorporado ao equipamento (MyOzone, 2023).



Fonte: MyOzone (2023).

Não existe uma concentração limite para o uso do O_3 em alimentos e sua concentração deve ser de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) da indústria alimentícia. A Conferência Governamental Americana de Higienistas Industriais (ACGIH) definiu o limite de $0,2 \text{ mg de } O_3/m^3$ para uma exposição de 8h de trabalho/dia (FDA, 2014), enquanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda $0,1 \text{ mg}/m^3$ para um regime de 8h de trabalho/dia (WHO, 2006). O ozônio é altamente tóxico por inalação ou pelo contato de líquido com a pele, olhos ou membranas mucosas. É capaz de causar dano pulmonar agudo a crônico, queimaduras e morte ou lesão permanente. O ozônio pode ser tóxico a uma concentração de 100 ppm durante 1 minuto. O ozônio é capaz de causar morte por edema pulmonar, aumenta a sensibilidade dos pulmões, aumenta a suscetibilidade e a gravidade das infecções bacterianas e virais no pulmão (PUBCHEM, 2018).

Para o uso seguro do gás O_3 na indústria alimentícia, é necessário conhecer as normas regulamentadoras que tratam dos limites máximos permitidos de concentração e período de exposição ao gás. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 15, Portaria nº 3.214/78 estabelece que o limite de exposição ao ozônio pelos trabalhadores seja de 0,08 ppm para uma jornada de trabalho de 48h semanais (BRASIL, 1978). Nos Estados Unidos, os limites permitidos de concentração e período de exposição ao ozônio é de 0,1 ppm por até 8h por dia (CFR, 1997).

CAPÍTULO 1 - SAFETY EMPHASIZED ON MICROBIAL, MYCOTOXIN AND GLYPHOSATE IN OATS INTENDED FOR VEGETABLE-BASED BEVERAGE INGREDIENT

ABSTRACT: Oat (*Avena sativa* L.) is the most consumed cereal as whole grain with valuable healthy nutritional content worldwide, where the Brazilian ranking in South America's first position accounts for 95% in national production, concentrated in southern Brazil. Considering that mycotoxins and glyphosate have been the topic in concern, the occurrence of deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA) and total aflatoxin (AFL) along with glyphosate residues were evaluated in 615 post-hulled oat grain of major producer region (South Brazil) from 2019 to 2021 crop by rapid sensitive enzyme-linked immunosorbent assays - ELISA. From the 615 samples, 229 were analyzed for DON, 194 were analyzed for ZEA and 61 were analyzed for AFL. The reliability of analytical analysis was standardized by periodical inter-laboratory validation and participation in proficiency tests. Although it was observed the occurrence of DON in 82% (188 samples), ZEA in 52% (100 samples), and AFL in 61% (37 samples) of the analyzed samples, the contamination level in all of them was lower than Brazilian guideline limit of 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for DON, 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for ZEA, and 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFL. Glyphosate contamination was not detected in 195 of 376 analyzed samples (52%), 141 samples (37%) showed glyphosate content below the Brazilian legal limit (0.05 mg.kg^{-1} , Regulation N° 1421/2021), and 40 samples (11%) presented glyphosate level higher than such limit. The study also evaluated the microbial contamination in 563 oat-based beverage samples. It was observed that the contamination levels were above the Brazilian legal limits in 35 samples (6%) for *Enterobacteriaceae* (limit $1.0 \cdot 10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$), 70 samples (12%) for yeast and mold (limit $1.0 \cdot 10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$), and 35 samples (6%) for *Bacillus cereus* (limit $5.0 \cdot 10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$). *Salmonella* was absent in all analyzes samples. Samples (n = 319) were also analyzed regarding mesophilic aerobic contamination and 42% (133 samples) presented a contamination level $< 1.0 \cdot 10^1 \text{ UFC.g}^{-1}$, 40% (127 samples) presented a contamination level between $1.0 \cdot 10^2 - 9.9 \cdot 10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$, 15% (48 samples) presented a contamination level $\geq 1.0 \cdot 10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$, and 3% (11 samples) presented uncountable results. The mycotoxins as well as glyphosate contamination data indicated that an effective control procedure settled in the basis of oat agroindustry is possible in Brazil. Although several countries have strict control regulations, mycotoxins and pesticides contamination still occurred from time to time. More research is suggested to focus on detecting glyphosate residues in cereals, notably in oats, and comparing with the current maximum limits and in regard to the effect of glyphosate applications on grain quality. Such understanding about contamination, as well as characteristic of microbial profile in food byproducts basis will be essential regarding development of new innovative products targeted on vegetable-based beverage. I.e., incentivize the local typically established dry cereal grain agroindustry intended for further advance thorough application of reliable assembled knowledge in improving derived foodstuffs.

Keywords: deoxynivalenol; aflatoxins; zearalenone; pesticides; cereals, oat-based beverage.

1 INTRODUCTION

Oat (*Avena sativa* L.) of the family Gramineae (Poaceae) is cultivated predominantly in temperate climate regions worldwide. Brazil is the first producer in South America, and fifth in

world, with increasing productivity (14%), area (18%) and production (14%) from 2020-2021, with estimates of 1,143 tons in 2022; Paraná and Rio Grande do Sul states in Southern Brazil accounting for 95% production (CONAB, 2022). Such expanding in the last years has been due to its recommended consumption as whole grain cereal, including bran, and derived products, in consequence of high macronutrient composition with health benefits: lipids with high unsaturation degree (e.g. oleic and linoleic acids), good dietary fiber (about 10–12%) with high content of β -glucan and essential amino acids containing proteins (Halima et al., 2015; Daou et al., 2012; Brindzova et al. 2008; Gulvady et al., 2013). Beta-glucans are the main soluble dietary fiber, which promotes prebiotic activity of beneficial microorganisms in intestine colon, and improving cholesterol levels (Butt et al., 2008; Gulvady et al., 2013).

Besides the importance of oats for human consumption and as a raw material for animal feed, the oats, like other cereals, are susceptible to pathogenic fungal infections, mainly from the *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* and *Penicillium* genera. These fungal species are capable to grown the crops in the field or the grains during the storage and produce toxic secondary metabolites known as mycotoxins, which constitutes a risk for human and animal health apart from deteriorating the product and worldwide economic damage.

The occurrence of mycotoxins in oats has been surveyed in European countries and several studies reported a mycotoxin occurrence in oats products in Europe (Luo et al., 2021), such as Norway (Hofgaard et al., 2016), Sweden (Fredlund et al., 2013), Finland (Hietaniemi et al., 2016), UK (Edwards et al., 2009), Ireland (De Colli et al., 2021), Germany (Gottschalk et al., 2007), Switzerland (Schoneberg et al., 2018), Denmark (Rasmussen et al., 2012) and Spain (Tarazona et al., 2021).

In oats, the largest proportion of the mycotoxins is in the hulls. When, de-hulling, removing hulls (glumes and husk) from the kernels before further processing into oat flakes and other products is an efficient method to reduce the mycotoxin content of oats (Ivanova et al., 2017; Schwake-Anduschus et al., 2010). On the other hand, cleaning and size-sorting of raw grain, normally performed as a first step to remove dust, weed seeds, chaff/straw pieces and small, lightweight and damaged kernels before further processing can reduce the content of mycotoxins, although variable effects have been reported (Brodal et al., 2020).

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin of trichothecene group mainly produced by *Fusarium graminearum* species complex and *Fusarium culmorum* (Eckard et al., 2011; Marin et al., 2013). It is a toxin with a high incidence in cereals and cereal products (Reddy et al., 2010; Wu et al., 2007). and has high cytotoxicity and immunosuppressive properties, usually causing acute and potential chronic toxic effects on humans and animals, like nausea, vomiting,

abdominal pain, diarrhea, dizziness, headache (Pietsch et al., 2014; Shar et al., 2014; Yang et al., 2014).

Zearalenone (ZEA) is another frequently detected mycotoxin also synthesized by *Fusarium* fungi like *F. graminearum* or *F. culmorum*, and it usually co-occurs with DON. ZEA contamination is mainly observed in maize, but wheat, barley, sorghum, rye and oats are also potential hosts. In general, ZEA shows little acute toxicity to animals and chickens are more tolerant to this toxin (FinkGremmels and Malekinejad, 2007). Due to its structural similarity to estradiol, ZEA can chronically affect the reproductive performance of female animals (Binder, 2007).

In addition to *Fusarium* species toxins commonly found in cereals, notably in oats, Aflatoxins (AFL) is the most notorious one due to its current high adverse effects on human and animal health. The major aflatoxins consist of aflatoxin B1, B2, G1 and G2, and they are mainly synthesized by *Aspergillus flavus* or *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxin B1 (AB1) is listed as a severe carcinogen by World Health Organization (WHO). Aflatoxins have been observed to be immunosuppressive, teratogenic and mutagenic to animals. In addition, AFL can impair the intestines and decrease the feed intake of animals and animals' growth performance which have been supported by several studies (Bailey et al., 2006; Dersjant-Li et al., 2003; Han et al., 2008).

Besides toxic effects and high occurrence, regular monitoring and surveillance of these mycotoxins are important and maximum levels in food commodities have been established by different national and international regulations to protect consumers (BRASIL, 2022; EC, 2006). Co-occurrence of mycotoxins has been reported in cereals, with two or more mycotoxins at the same time (Baydar et al., 2015; Ghali et al., 2008) and mycotoxins presence cannot occur in a small portion from the lot analyzed and its sampling is very important step to obtain a real contamination and representative result from a major lot.

Furthermore, the occurrence of mycotoxins in oat, the agrochemical contaminants as glyphosate has been increasing in oat products. Glyphosate (GLY), N-phosphonomethyl glycine, is the most frequently used herbicide worldwide to provides control of annual and perennial weeds, to promote and accelerate crop dry down, and used as a pre-harvest desiccant on cereal crops such as oats and wheat (Benbrook, 2016; Bresnahan et al., 2003). Glyphosate is an enzyme inhibitor that stops the activity of the enzyme 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). This enzyme is naturally produced and utilized to synthesize proteins needed for plant growth (Dill et al., 2010). Currently, it is recommended that glyphosate be applied when kernel moisture content is 30% or less (Darwent et al., 1994). The

effect of glyphosate applied on wheat quality has recently been studied (Malalgoda, et al., 2020), but there has been limited studies related to the effect of glyphosate application on safety and quality of oats and their products.

The exposure risks of glyphosate on human health are currently being debated. Glyphosate is known to rapidly convert to aminomethylphosphonic acid (AMPA), its primary metabolite, from biotic or abiotic degradation in soils, which may also be toxic to humans even at low mass fractions (Grandcoin, Piel, & Baurès, 2017). The International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs Programme valued the carcinogenic hazard for the herbicide glyphosate and concluded that glyphosate was a probable human carcinogen. However, the U.S. EPA and European Food Safety Authority (EFSA) both considered glyphosate unlikely to pose the carcinogenic hazard to humans due to the lack of human evidence to classify glyphosate as a potential carcinogen (Portier et al., 2016). In addition, World Health Organization (WHO) concluded that the pesticide glyphosate is ‘unlikely to induce a carcinogenic risk to humans from exposure through the diet’. Besides this controversial, regular monitoring and surveillance of glyphosate are important and maximum levels in food commodities have been established by different national and international regulations.

Such understanding about contamination, as well as characteristic of microbial profile in food byproducts basis will be essential regarding development of new innovative products targeted on vegetable based beverage. I.e., incentivize the local typically established dry cereal grain agroindustry intended for further advance thorough application of reliable assembled knowledge in improving derived foodstuffs.

In this context, the aim of this study was to evaluate the presence of mycotoxins – deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA) and aflatoxin (AFL) – and glyphosate residues in oats samples from the main oat producer region (South of Brazil – Parana, Rio Grande do Sul e Santa Catarina States) along three sequential crops (2019, 2020 and 2021), in addition to evaluate the microbial contamination of oat-based beverage samples, thus demonstrating the importance of their monitoring, aiming at human and animal health.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and chemicals

The Veratox® DON-HS quantitative kit (product id #8332, Neogen Corporation, Lansing, USA) with 5 deoxynivalenol standards (DON concentration at 0, 25, 50, 100 and 250

$\mu\text{g.kg}^{-1}$), solution of DON HRP conjugate (horseradish peroxidase – HRP enzyme) solution of DON-K-Blue® substrate and solution of Red Stop®. The Veratox® ZEA quantitative kit (product id #8110, Neogen Corporation, Lansing, USA) with 5 zearalenone standards (ZEA concentration at 0, 25, 75, 150 and 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), solution of ZEA HRP conjugate, solution of ZEA-K-Blue® substrate and solution of Red Stop®. The Veratox® AFL quantitative kit (product id #8030, Neogen Corporation, Lansing, USA) with 4 aflatoxins standards (AFL concentration at 0, 5, 15 and 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), solution of AFL HRP conjugate, solution of AFL-K-Blue® substrate and solution of Red Stop®. HPLC grade methanol (99,9%) for ZEA and AFL extraction were supplied from Merck (USA).

The kit ELISA for glyphosate determination (Eurofins Abraxis, Part Number 500086, USA) with 5 standards (GLY concentration at 0.075, 0.20, 0.5, 1.0 and 4.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), glyphosate standard diluent, glyphosate assay buffer, derivatization reagent diluent, glyphosate antibody solution, glyphosate conjugate solution, color substrate solution (TMB), wash buffer solution, and stop solution.

The plates AC Petrifilm™, YM Petrifilm™, EC Petrifilm™, and *Enterobacteriaceae* count Petrifilm™ used for the microbial count of mesophilic aerobic, yeast and mold, total coliforms and *E. coli*, and *Enterobacteriaceae* were provided by 3M (Saint paul, USA). The VIDAS® SLM kit for *Salmonella* analysis was provided by Biomérieux (Marcy-l'Étoile, France). The standards and solutions from manufactures kits were purchased ready-to-use, and no preparation and dilution were required for analysis.

2.2 Oat grain and oat-based beverage samples

A total of 615 oat grain samples (*Avena sativa* cultivar IPR Afrodite) were collected in three sequential harvesting seasons – 2019, 2020 and 2021 – in the southern region of Brazil, being the majority of the samples cultivated in Paraná State, followed by the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Oat samples were leaved to the food company SL Alimentos (Mauá da Serra, Paraná, Brazil), responsible for cereal industrial processing. The sampling was done by collecting the 1 kg oat samples (raw material) at the receiving process, the amount of collect varied according to the size of the batch (tons). After the collection, the samples were homogenized and quartered for following analysis. Mycotoxin analysis was done for every silo of samples (silos storage capacity: 4 silos with a capacity of 4,000 TON and 14 silos with a capacity of 700 TON), while glyfosate analysis was done for each individual sample received.

The oat samples were monitored for the presence of food contaminants, which 239 samples from the silo were evaluated concerning the mycotoxins contamination (DON, ZEA and AFL) and 376 samples regarding the glyphosate contamination (GLY). The oat grain samples used in the present study were mechanically hulled (Codema, model LH5095) using 50.0 g of sample during 5 min. The hulled oats samples (500 g) were ground in a mill until all particles could pass through a mesh of 0.850 mm. After homogenization, the working samples (100 g) were withdrawn and placed in hermetically sealed containers, protected from light, and stored at -18 °C until analysis.

The oat-based beverage composed of oat flour, water and amylolytic enzymes was produced by SL Alimentos (Mauá da Serra, Brazil). The beverage production process consists of enzymatic reaction with specific time and temperature, followed by removal of particles, pasteurization, cooling and packing. A total of 563 oat-based beverage samples were produced between January and October of 2022 (however, the oat flour utilized in this process was from the 2021 harvest), these samples were monitored for the presence of *Enterobacteriaceae* (microbial contamination), yeast and mold, *Bacillus cereus*, and, *Salmonella*. In addition, 319 samples were monitored for mesophilic aerobic contamination. The sampling was done collecting one sample from each batch of the final product. Samples (100mL each) were collected with sterile pipettes of one batch corresponding 4000 L (total of 4 rentanks corresponding 1000L each), homogenized and placed in a sterile plastic bottle.

2.3 Extraction

Contaminant analysis is usually performed through specific extraction procedures followed by liquid chromatography methods coupled with ultraviolet, photo diode array, fluorescence or mass spectrometry. Such methodologies, although efficient at detecting low contamination levels, are often time-consuming and high cost. Recently, a variety of rapid methods have been proposed for analyses to simplify the sample preparation and obtain a result in shorter time, as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA- direct competitive), which was used for determination of DON, ZEA, AFL and GLY (Supplementary material S1 e S2) in this study.

2.3.1 Deoxynivalenol (DON)

A 5.0 (± 0.1) g sample portion were mixed with 25 mL of distilled water. After vortex-mixing (Vortex genie 1, Scientific Industries, USA) for 20 seconds, the samples were shaken at 350 rpm for 5 min (± 30 seconds) a horizontal shaker (Labortechnik K5501, IKA, Germany). Then the samples were centrifuged at 4000 rpm for 5 min (Hearaeus Megafuge1.0, Thermo Scientific, USA). The supernatant solution was filtered using a 597 1/2 filtre and the filtrate was used for DON analysis in Veratox HS method.

2.3.2 Zearalenone (ZEA)

A 5.0 (± 0.1) g sample portion were mixed with 25 mL of solution of Methanol:distilled water (70:30, v/v). After hand-mixing for 3 minutes, the samples were shaken at 350 rpm for 2 min a horizontal shaker (Labortechnik K5501, IKA, Germany). Then the samples were filtered using a paper filter and the filtrate was diluted in distilled water (1 mL of filtered samples and 4 mL of distilled water) for ZEN analysis in Veratox method.

2.3.3 Aflatoxins (AFL)

A 5.0 (± 0.1) g sample portion were mixed with 25 mL of solution of Methanol:distilled water (70:30, v/v). After hand-mixing, the samples were shaken at 240 rpm for 3 min a horizontal shaker (Labortechnik K5501, IKA, Germany). Then the samples were filtered using a qualitative paper filter and the filtrate was used for AFL analysis in Veratox method.

2.3.4 Glyphosate (GLY)

A 0.5 (± 0.01) g sample portion were mixed with 10 mL of distilled water. After vortex-mixing for 15 seconds, the samples were shaken for 10 min a horizontal shaker (Labortechnik K5501, IKA, Germany). The samples were kept at room temperature for 2 minutes. Then 2 mL of supernatant were transferred to a centrifuge tube. After centrifugation for 5 min at 8000 x g, 200 μ L of supernatant was mixed with 800 μ L of Glyphosate diluent. Before ELISA analysis, the derivatization of the samples was performed with the addition of 100 μ L of derivatization reagent diluent in the tube with 250 μ L sample solution and 1 mL of glyphosate assay buffer,

followed by mixing in vortex for 30 seconds and incubation at room temperature during 10 minutes.

2.4 Enzyme immunoassay (competitive direct cd - ELISA)

2.4.1 ELISA for mycotoxins

Test procedure of direct enzyme immunoassay (ELISA) for all mycotoxins (DON, ZEA and AFL) is similar with only little differences in time of incubation (detailed flowchart of the analysis can be find in the Supplementary material). A 100 μL of conjugated solution was added to each red-marked well, followed by 100 μL of extracted sample or standards controls. After mixing with micropipette, 100 μL of this solution (conjugated and extracted sample) was transferred to the clear antibody wells. The plate was incubated at room temperature (18-30 °C; 10, 5 and 2 minutes for DON, ZEN and AFL, respectively), sliding the microwell holder back and forth gently for the first seconds (20, 10 and 30 seconds for DON, ZEA and AFL, respectively). After incubation period, the contents of the antibody wells were shaken out and washed them with 300 μL of distilled water (five times). Then the remaining water was tapped out on an absorbent paper towel. 100 μL of substrate K-Blue® from the reagent boat were transferred to the antibody wells and the plate was incubated at room temperature (18-30°C; 10, 5 and 3 minutes for DON, ZEA and AFL, respectively), sliding the microwell holder back and forth gently for the first seconds (20, 10 and 30 seconds for DON, ZEA and AFL, respectively). After 100 μL of Red Stop solution from reagent boat was added into the antibody wells and mix by sliding back and forth on a flat surface. The bottom of the microwells was wiped with a dry cloth and the wells were placed at microwell reader (Neogen, USA) to perform the read at 650 nm. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the methods are presented in Table 1.

Table 1. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the methods used for the analyses of mycotoxins and glyphosate.

Analysis	LOD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
DON	35	70
ZEN	10	25
AFL	1.4	5
GLY	5	7.5

2.4.2 cd-ELISA for glyphosate

For the competitive direct enzyme immunoassay (cd-ELISA) for glyphosate determination, 50µL of derivatized extract samples were added into each well, followed by 50µL of glyphosate antibody solution. The plate was incubated at room temperature (18-30°C) for 30 minutes, sliding the microwell holder back and forth gently for the first 30 seconds. Then 50µL of enzyme conjugate solution were transferred to the antibody wells and the plate was incubated at room temperature (18-30°C) for 60 minutes, sliding the microwell holder back and forth gently for the first 30 seconds. After incubation period, the contents of the wells were shaken out and washed them with 250µL of wash buffer (three times). Then the remaining buffer was tapped out on an absorbent paper towel. 150µL of substrate color solution were transferred to the wells and the plate was incubated at room temperature (18-30°C) for 30 minutes, sliding the microwell holder back and forth gently for the first seconds. After 100µL of Stop solution was added into the wells and mix by sliding back and forth on a flat surface. The bottom of the microwells was wiped with a dry cloth and the wells were placed at microwell reader to perform the read at 450nm. The detailed flowchart of the analysis can be find in the Supplementary material. The limits of detection (LoD) and quantification (LoQ) of glyphosate are presented in Table 1.

2.5 Quality control for analysis

In addition to internal quality control using spiked samples, the laboratory applied to the external evaluation (proficiency test - Fapas®) organized by Fera Science (Tulln, Austria), for mycotoxins in 2019, 2020 and 2021. Also for glyphosate method, the inter-laboratory precision was calculated from the results generated by the analysis in our laboratory and in an external laboratory accredited by INMETRO (8 samples for glyphosate analysis).

2.6 Microbial analysis

The microbial contamination of oat-based beverage samples was evaluated regarding mesophilic aerobic, yeast and mold, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* spp. For the microbiological analyses, 25 g of each sample were diluted in 225 mL of peptone water and homogenized for 1 min. The mesophilic aerobic analyses were performed according to the AOAC 990.12 method (Association of Official Agricultural Chemists), the yeast and mold

analyses were performed according to OMA #997.02 method, the *Enterobacteriaceae* analyses were performed according to method AOAC 2003.01 all of them using commercial Petrifilm™ plates (3M, Saint Paul, USA). The *Bacillus cereus* analysis were performed according to method ISO 7932:2004. The *Salmonella* spp. was analyzed by the ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) technique using the VIDAS® system (Marcy-l'Étoile, France), according to the validated method ISO 16140.

2.7 Proficiency tests

For quality control laboratories, it is necessary to have external references analyses to evaluate and demonstrate the reliability of the analytical results. Thus, the participation in proficiency tests/interlaboratory studies of external providers is of most importance to ensure the quality of the results issued. The proficiency tests (P tests) are annually performed for the for mycotoxins detection through the FAPAS provider. For the microbial analyses, proficiency tests are performed twice per year though the LGC provider. SL Alimentos participate in proficiency tests programs since 2012 and obtained proficient results for all parameters evaluated.

2.8 Statistical analysis

The data generated from the mycotoxins and glyphosate contamination levels in oat samples were evaluated by graphic distribution and variance analysis (ANOVA) between years, followed by Tukey's test at 5% probability using Statistica Software, version 10 (Dell Statistica, Tulsa, OK, USA). Pearson's correlation analysis was applied to determine the linear association between the results from the laboratories ($p < 0.05$) and performed in the R statistical software (R Core Team, 2021).

3 RESULTS AND DISCUSSION

This study analyzed 615 oat grain samples from South region of Brazil along three sequential crops – 2019, 2020 and 2021 – to investigate the impact of contamination levels on exposure risk of consumers regarding the guideline limits as well as the safety implication of

oat products to the consumer population from the major national oat production. In addition, the procedure for control of cereal contaminants adopted by this food is discussed.

3.1 Interlaboratory comparison

The performance of internal methods to determine the concentration of mycotoxins was evaluated by its participation in proficiency tests (FAPAS) for mycotoxins in cereals during the three years (2019, 2020 and 2021) organized by Fera Science. The results for deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins were satisfactory for all tests. All Z scores obtained were less than 2 for these proficiency test, proving the suitability of these rapid methods for the determination of mycotoxins in oats.

Concerning the glyphosate methodology, eight oat samples with different concentration level of glyphosate were analyzed by internal method and by the external laboratory INMETRO accredited to confirm the accuracy and the precision of proposed method. The external laboratory used a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) system for the pesticides analysis.

Glyphosate results showed positive correlation between the two laboratories. The coefficient of correlation (Pearson) was of 0.999 (Figure 1). Therefore, the internal method showed to be sensitive, precise and accurate for determination of glyphosate with a performance similar to an accredited laboratory.

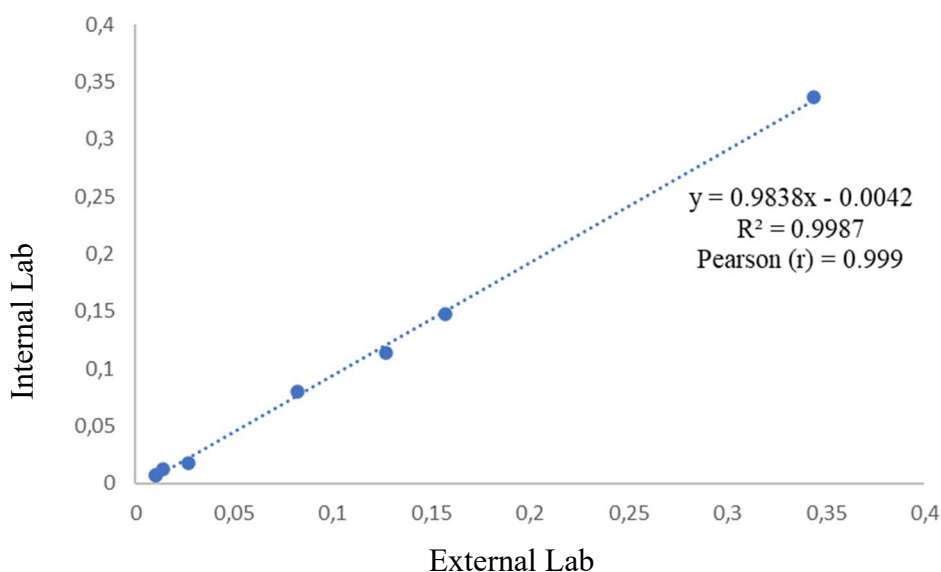


Figure 1. Positive correlation for glyphosate analysis in oat samples

3.2 Monitoring of total mycotoxin contamination in oat grain

The summary of oat grain samples analyzed for each mycotoxin as well as the percentage of samples contaminated is described in Table 2. A total of 239 oats samples were evaluated regarding mycotoxins contamination, which 229 analysis of DON, 194 analysis of ZEA and 61 analysis of AFL. The presence of mycotoxin was detected in major part of analyzed oats samples, of which 82% of DON, 52% of ZEA, and 61% of AFL. In spite of the large presence of mycotoxins detected in the oat samples, 100% of them presented concentrations of each mycotoxin under the Brazilian legal limits (1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for DON, 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for ZEA and 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFL, RDC 722/2022 and IN 160/2022).

In this study, the co-occurrence of mycotoxins was observed in 85% of oats samples, with two or more mycotoxins at the same sample. Some molds can produce more than one toxin, while some mycotoxins can be produced by more than one fungal species. Consequently, when contamination occurs, often more than one toxin is produced and has been reported in other studies in cereals (Baydar et al., 2015; Ghali et al., 2008). Tarazona et al. (2021) observed the occurrence of the studied mycotoxins in 100 oat grain samples during the period 2015–2019 and reported that 31% of the samples presented some mycotoxins (two to five) co-occurred at quantifiable levels in the same sample.

Table 2. Number of analysis of the hulled oat grain for each mycotoxin and percentage of contaminated samples.

Year	DON	ZEA	AFLA	Total*	Co-occurrence**
2019	95 (91 %)	105 (56 %)	9 (44 %)	105	90%
2020	96 (76 %)	57 (18 %)	19 (53 %)	96	79%
2021	38 (76 %)	32 (97 %)	33 (70 %)	38	86%
Total	229 (82 %)	194 (52 %)	61 (61 %)	239	85%

* Total number of analyzes carried out in each crops, varying the number of samples analyzed for each mycotoxin.

**One or more mycotoxin in the same sample

The relative frequency of DON, ZEA and AFL grouped according to contamination level ranges during the crops seasons (2019, 2020 and 2021) is presented in the Figures 2 to 4. DON was detected in 82% of oat samples (188 samples of 229) and no occurrence of DON was observed in 18% of oat samples (41 samples of 229) along the three years. In 2020 and 2021, the major level of DON contamination was below 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, which is a half the level of Brazilian limit (1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, RDC 722/2022 and IN 160/2022). DON content decreased from

2019 to 2021, which is demonstrated by the decreasing number of samples with DON concentration at 100-500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (40 to 10 samples). In summary, during the three years evaluated, the DON concentration in most of contaminated samples was below 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, which is considered a safe level for human consumption of oat products.

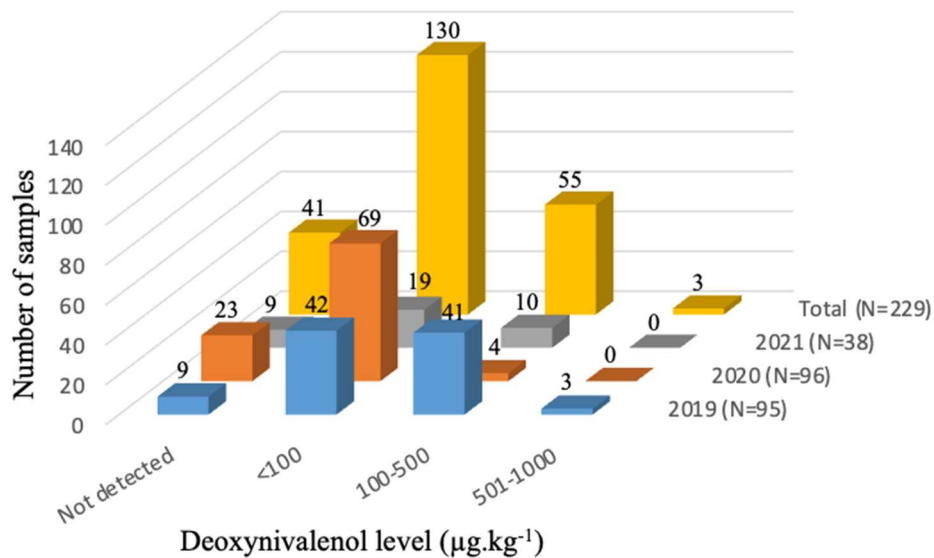


Figure 2. Distribution of DON levels in oat samples along three sequential harvesting seasons in south region of Brazil.

*Different numbers of samples per harvest were analyzed due to the volume of raw material received, as well as the batch closing ratio per raw material silo

Several studies reported DON contamination in oats samples. Islam et al. (2021) observed that DON was one of the most prevalent mycotoxins in oat (168 commercial oat fields in Canada, during 2016–2018), mainly associated with the infection caused by *F. graminearum*, which was also demonstrated by Gräfenhan et al. (2013). Vidal et al. (2013) reported that the DON content in wheat bran (62% positive detection rate and 6174 $\mu\text{g/kg}$ maximum concentration) was higher than in oat bran samples (17% positive detection rate and 276 $\mu\text{g/kg}$ maximum concentration) for human consumption purchased in stores and supermarkets. Meyer et al. surveyed the DON content from the 2013 to 2019 harvest years in Europe and observed that the incidence of DON reached over 90% in four out of seven years. Van der Fels-Klerx et al. (2012) reported DON incidences of 65% and 74% in oats from Finland and Sweden in 1999 and 2009, respectively.

In our study, ZEA was detected in 52% of oat samples (100 samples of 194) and 99% of oat samples analyzed (193 samples) showed ZEA contamination level below 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$,

which is a half the level of Brazilian limit ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$, RDC 722/2022 and IN 160/2022). The ZEN content observed for the samples collected in 2021 was between $10\text{-}50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for the most samples, which differs from the data collected in 2019 and 2020, when the ZEA values found for the major part of oat samples were below $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Pleadin et al. (2013) also showed that ZEN detected in positive samples presented low concentration ($4\text{--}43 \mu\text{g.kg}^{-1}$) in oat samples in Croatia. Rai et al (2018) reported that 84% of oat samples collected from India were found to be positive for ZEA ($5.31\text{--}389 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

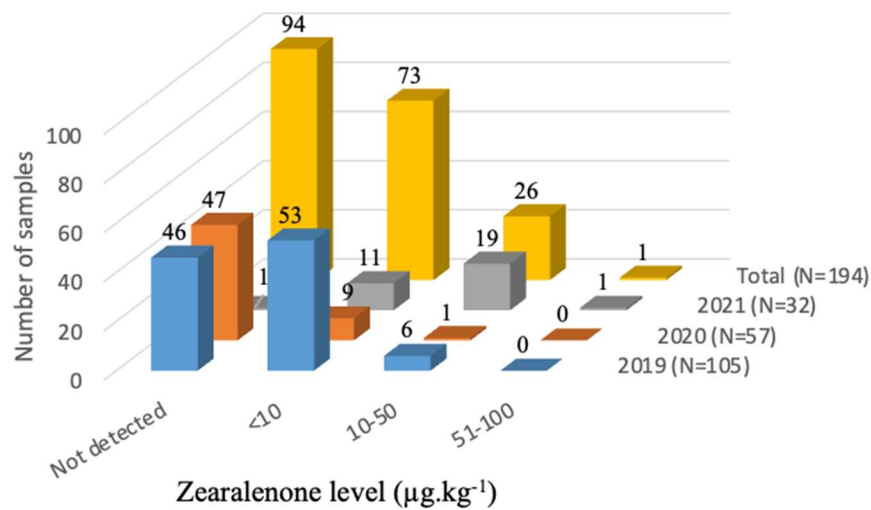


Figure 3. Distribution of ZEA levels in oat samples along three sequential harvesting seasons in south region of Brazil.

Figure 4 shows that AFL was found in 61% of oat samples (37 samples of 61) and 100% of oat samples analyzed (60 samples) showed AFL contamination below the Brazilian limit level ($5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, RDC 722/2022 and IN 160/2022), where the maximum values found were 1.70 , 2.60 and $3.20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ in 2019, 2020 and 2021, respectively. Tarazona et al. (2021) evaluated the incidence of mycotoxins in unprocessed oats in several regions of Spain from 2015 to 2019, where ZEA, followed by HT2, DON, and T2, in this order, were the most frequently detected mycotoxins, and AFL were also detected.

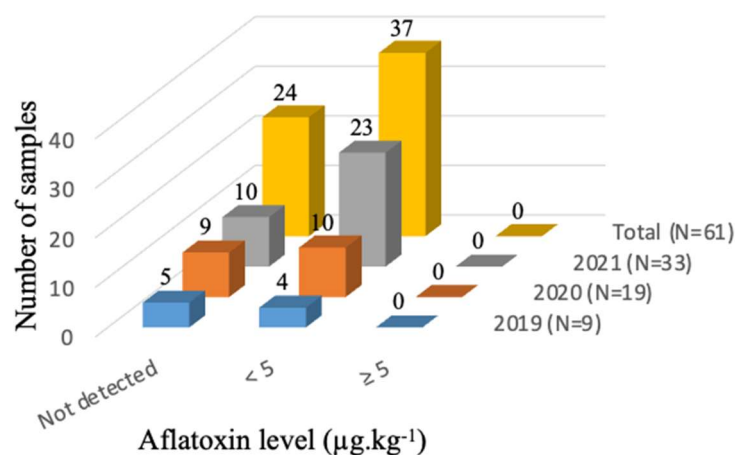


Figure 4. Distribution of AFL levels in oat samples along three sequential harvesting seasons in south region of Brazil

Some studies reported that T2/HT2 toxins were frequently found in the oats in Europe (Schöneberg et al., 2018; Kiş et al., 2020; Nathanail et al., 2015) and the levels of T2 and HT2 were higher in oats than in other cereals, like barley or wheat (Hofgaard et al., 2016; Edwards et al., 2012). T2 toxin is a trichothecene compound and is the most toxic mycotoxin among the trichothecene toxins (Yang et al., 2020), produced mainly by *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* (Marin et al., 2013; Torp & Langseth, 1999), which are species not common in Brazil.

Commercial processing of oats has been reported to reduce the content of mycotoxins. DON, T2 and HT2 content were reduced by 80%–95%, with the major reduction occurring during de-hulling (Ivanova et al., 2017; Schwake-Anduschus et al., 2010). Brodal et al (2020) showed that by removing the small kernel fraction from the grain, the content of *Fusarium* mycotoxins was considerably reduced. Also the most notable effects were seen on the concentrations of T2/HT2 toxins, which were reduced by 56% and 32% in samples from 2015 and 2018 respectively, and 24% in the DON concentrations for samples from 2018. These results show the importance of the industrial processing for the control to mycotoxins in oat products.

3.3 Glyphosate contamination in oats

The distribution of glyphosate contamination in oat samples from South region of Brazil along three sequential crops (2019, 2020 and 2021) is presented in the Figure 4. The glyphosate

analysis in SL Alimentos industry started at end of 2019, and the control of this pesticides increased in the last years in face of the growing importance of this contaminant in food for human consumption and the establishment of legal limit for this pesticide in oat. No occurrence of glyphosate contamination was observed in 57 oat samples in 2020 (68%) and in 138 samples in 2021 (48%). Still 14% (12 of 84 samples) and 44% (129 of 290 samples) of oat samples in 2020 and 2021, respectively, showed glyphosate results under the Brazilian legal limit (0.05 mg.kg⁻¹, RDC N° 1421/2021). However, 15 samples from 2020 (18%) and 23 samples from 2021 (8%) showed glyphosate content above the Brazilian legal limit (0.05 mg.kg⁻¹, RDC N° 1421/2021). This high level of glyphosate contamination in oat samples decreased 10% from 2020 to 2021.

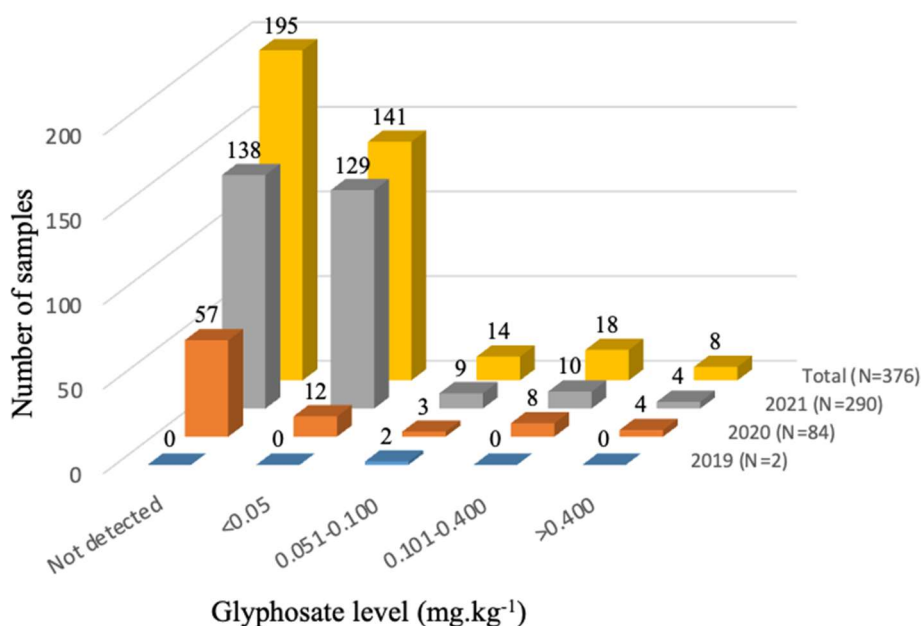


Figure 5. Distribution of glyphosate levels in oat samples along three sequential harvesting seasons in south region of Brazil. *In the 2019 harvest, we have only 2 samples analyzed, as it was the year that we started internal monitoring by batch in the industry's premises.

Table 3 summarizes the glyphosate contamination according to Brazilian legal limit (0.05 mg.kg⁻¹, RE N° 1421/2021). In general, from 2019 to 2021, 89% of oat samples (336 samples) analyzed showed glyphosate contamination under legal limit, but 11% presented glyphosate level above the legal limit (40 samples). In SL industry, when the glyphosate analysis is performed before the entrance of oat batches to factory and the oat sample presents glyphosate contamination above legal limit, the batches are returned to the producers according

to commercial contract. On the other hand, if the analysis is performed after the entrance of the batch to the factory, the batches are separated in a specific garner to avoid the mixture with batches with low level of glyphosate, and their use in the process is did after glyphosate analysis.

Table 3. Number of oat samples from glyphosate contamination according to Brazilian legal limit.

Year	$\leq 0.05 \text{ mg.kg}^{-1}$	$> 0.05 \text{ mg.kg}^{-1}$	Total
2019	0 (0 %)	2 (100 %)	2 (100 %)
2020	69 (82 %)	15 (18 %)	84 (100 %)
2021	267 (92 %)	23 (8 %)	290 (100 %)
Total	336 (89 %)	40 (11 %)	376 (100 %)

EFSA (2015) evaluated 232 oats samples in 2013 where 17 different pesticides were detected, which the most frequently found pesticides were chlormequat (62 % of the tested samples) and glyphosate (44 % of the samples). Glyphosate levels were also found in oat samples from Canadian retail market between 2015 and 2017 at levels between 0.006 mg/kg and 3.1 mg/kg (Kolakowski et al., 2020). Cruz and Murray (2021) detected glyphosate in all thirteen oat samples from EUA, with the maximum value (1.1 mg.kg^{-1}) obtained from one of the conventional instant oatmeal sample. Vegi et al. (2021) evaluated the impact of glyphosate applied pre-harvest on oat from EUA kernel quality and concluded that the pre-harvest glyphosate treatment was not found to be detrimental to final oat quality if it is applied at the recommended timing when the oat crop has reached physiological maturity. Alahmed and S. Simsek (2020) observed that the application of glyphosate at the soft dough stage had an impact on the physicochemical characteristics (solubility, viscosity, molecular weights) and content of β -glucan in oats from EUA, and recommended farmers to apply glyphosate at the low moisture stage (hard dough) or thereafter.

Storage has been reported to influence the herbicide and pesticide residues in food product, however there is lack of research pertaining specifically to glyphosate residues during grain storages. Many studies have analyzed and reported glyphosates removal or degradation as correlated to post-harvest processing by means of washing or wet cleaning, peeling/de-husking/de-hulling/shelling, milling, storage and through heat applications such as cooking and baking (Randhawa, Ahmed and Javed, 2014). Theoretically, the reduction of herbicide in washing or wet cleaning is primarily dependent on the residual glyphosate being dissolved in water or by dipping in chemical solvents such as detergents, alkalis, or acids (Holland et al.,

1994). Removal of the outer layers of grains through peeling, de-husking, de-hulling, shelling or trimming has also been considered as an effective way to reduce herbicide residues (Uygun et al., 2005; Balinova, Mladenova and Obretenchev, 2006). Regardless, data remains inconsistent and more research focused on glyphosate degradation during grain storage and processing after harvesting in oat grains is needed.

3.4 Microbial evaluation of oat-based beverage

The oat-based beverages were evaluated regarding the microbial contamination by *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, yeast and mold, *Salmonella*, which limit levels are defined by the Brazilian normative RDC n°724/2022 and IN n° 161/2022 (Item 12, letter 'e'). All the 563 evaluated samples were absent of *Salmonella*. The occurrence of samples contaminated by *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, and yeast and mold is presented in Table 4. For both *Enterobacteriaceae* and yeast and mold contamination, the Brazilian legal limit is $1 \cdot 10^2$ UFC.mL⁻¹ (IN n° 161/2022). From the analyzed samples, only 6% (35 of 563 samples) presented *Enterobacteriaceae* contamination levels above the Brazilian legal limit, and 12% (70 of 563 samples) presented yeast and mold contamination above the limit. For *Bacillus cereus*, 6% (35 of 563 samples) of the analyzed samples presented contamination level above the Brazilian legal limit of $5 \cdot 10^2$ UFC.mL⁻¹ (IN n° 161/2022). Although the mesophilic aerobic analysis is not mandatory according the Brazilian normative, this analysis was performed in 319 samples because the presence of mesophilic aerobic contamination is a good indicative of other microbial contamination as well. From the analyzed samples, 42% (133 samples) presented a contamination level $< 1.0 \cdot 10^1$ UFC.mL⁻¹, 40% (127 samples) presented a contamination level between $1.0 \cdot 10^2 - 9.9 \cdot 10^2$, UFC.mL⁻¹, 15% (48 samples) presented a contamination level $\geq 1.0 \cdot 10^3$ UFC.mL⁻¹, and 3% (11 samples) presented uncountable results.

Table 4. Number of oat-based beverage samples contaminated by *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, yeast and mold and *Salmonella* according to Brazilian legal limits.

Microbial	Limits for <i>Enterobacteriaceae</i> and Yest and mold *		Limit for <i>Bacillus cereus</i> **		Limit for <i>Salmonella</i>
	$\leq 1.0 \cdot 10^2$	$> 1.0 \cdot 10^2$	$\leq 5.0 \cdot 10^2$	$> 5.0 \cdot 10^2$	Absent in 25mL
<i>Enterobacteriaceae</i>	528 (94%)	35 (6%)			
Yeast and mold	493 (88%)	70 (12%)			
<i>Bacillus cereus</i>			528 (94%)	35 (6%)	
<i>Salmonella</i>					563 (100%)

* Limits expressed as UFC.mL⁻¹, of sample according to IN n° 161/2022 (Brasil, 2022).

**Limits expressed as UFC.mL⁻¹, of sample according to IN n° 161/2022 (Brasil, 2022).

4 CONCLUSION

The contaminants in food related to mycotoxins and pesticides occurrence is becoming more and more serious. In oats grains, the level of mycotoxin concentration is below the legal limit for all mycotoxins studied (DON, ZEN and AFL), these results indicated a control effective concerning the mycotoxin contamination in the oat production in Brazil. However, regarding the glyphosate contamination, 11% of samples show residues above the Brazilian legal limit (0.05 mg.kg⁻¹). Glyphosate has been widely applied in grain crops for weed control and desiccation and due to the increased use, glyphosate residues on the crops have aroused health concerns to consumption and physical exposure to glyphosate. More research is suggested to focus on detecting glyphosate residues in cereals, notably in oats, and comparing with the current maximum limits and in regard to the effect of glyphosate applications on grain quality.

Regarding the microbial analyses in oat based beverage, it was observed that the contamination levels were above the Brazilian legal limits in 35 samples (6%) for *Enterobacteriaceae* (limit $1.0 \cdot 10^2$ UFC.mL⁻¹), 70 samples (12%) for yeast and mold (limit $1.0 \cdot 10^2$ UFC.mL⁻¹), and 35 samples (6%) for *Bacillus cereus* (limit $5.0 \cdot 10^2$ UFC.g⁻¹). *Salmonella* was absent in all analyzes samples. For mesophilic aerobic contamination, 82% (260 samples) of the samples presented contamination level $< 1.0 \cdot 10^3$ UFC.g⁻¹.

Although several countries have strict control regulations, mycotoxins and pesticides contamination still occurred from time to time. Therefore, the strict monitoring, application of good practices along the production chain and establishing of control system has been important in order to mitigate the contaminants residue in oats grains.

Climatic conditions during planting and harvesting can interfere with the rate of mycotoxin and glyphosate contamination, since crops with high rainfall favor the growth of fungi due to high humidity, which can trigger the growth of mycotoxins and can stimulate producers to use pre-harvest desiccants.

REFERENCES

- Alahmed, A. and Simsek, S. (2020). Pre-harvest glyphosate application effects on properties of β -glucan from oat groats. *Journal of Cereal Science*, v. 96, 103119.
- Bailey, C.A., Latimer, G.W., Barr, A.C., Wigle, W.L., Haq, A.U., Balthrop, J.E., Kubena, L.F. (2006). Efficacy of montmorillonite clay (NovaSil PLUS) for protecting fullterm broilers from aflatoxicosis. *J. Appl. Poult. Res.* 15, 198–206
- Balinova, A., Mladenova, R., Obretenchev, D. (2006). Effect of grain storage and processing on chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl residues in post-harvest-treated wheat with regard to baby food safety requirements. *Food Additives & Contaminants*, 23(4), 391–397.
- Baydar, T., Engin, A. B., Girgin, G., Aydin, S., Sahin, G. (2005). Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 193-197.
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28, 1. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Binder, E.M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133, 149–166.
- BRASIL (2021). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE n. 1421, de 12 de abril de 2021. Monografia de Ingredientes Ativos de Agrotóxicos definindo LMR de glifosato em determinadas culturas como aveia. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- BRASIL (2022a). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 722, de 1 de julho de 2022. Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para contaminantes em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- BRASIL (2022b). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa n. 160, de 1 de julho de 2022. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF.
- BRASIL (2022c). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa n. 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

- Bresnahan, G. A., Manthey, F. A., Howatt, K. A., Chakraborty, M. (2003). Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4004–4007.
- Brindzova, L., Čertik, M., Rapta, P., Zalibera, M., Mikulajova, A., Takacsova, M. (2008). Antioxidant activity, β -glucan and lipid contents of oat varieties. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 163-173.
- Brodal, G., Aamori, H. U., Almvik, M., Hofgaard, I. S. (2020) Removal of Small Kernels Reduces the Content of Fusarium Mycotoxins in Oat Grain. *Toxins* 2020, 12, 346; doi:10.3390/toxins12050346.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R., Butt, M. S. (2008). Oat: Unique among the cereals. *European Journal of Nutrition*, 47, 68–79. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0698-7>.
- Companhia Nacional de Abastecimento (2022). Séries Históricas das Safras – Aveia. Available on <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/901-aveia>. Access on 06 october 2022.
- Cruz, M. J., Murray, J. A. (2021) Determination of glyphosate and AMPA in oat products for the selection of candidate reference materials, *Food Chemistry*, v.342,128213.
- Daou, C., Zhang, H. (2012). Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 11 (4), 355–365.
- Darwent, A. L., Kirkland, K. J., Townley-Smith, L., Harker, K. N., Cessna, A. J., Lukow, O. M., & Lefkovitch, L. P. (1994). Effect of preharvest applications of glyphosate on the drying, yield and quality of wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 74, 2218–2230. <https://doi.org/10.4141/cjps94-046>.
- De Colli, L.; De Ruyck, K.; Abdallah, M.F.; Finnan, J.; Mullins, E.; Kildea, S.; Spink, J.; Elliott, C.; Danaher, M. (2021). Natural co-occurrence of multiple mycotoxins in unprocessed oats grown in Ireland with various production systems. *Toxins*, 13, 188.
- Dersjant-Li, Y., Verstegen, M. W. A., Gerrits, W. J. J. (2003). The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.* 16, 223–239.
- Dill, G. M., Sammons, R. D., Feng, P. C. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., et al. (2010). Glyphosate: Discovery, development, applications, and properties. In V. K. Nandula (Ed.). *Glyphosate resistance in crops and weeds*, p. 1–33.
- Eckard, S., Wettstein, F.E., Forrer, H.R., Vogelgsang, S. (2011). Incidence of fusarium species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* 3, 949–967
- Edwards, S.G. (2009). Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional oats. *Food Addit. Contam.*, 26, 1063–1069
- Edwards, S.G.; Imathiu, S.M.; Ray, R.V.; Back, M.; Hare, M.C. (2012). Molecular studies to identify the Fusarium species responsible for HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oats. *Int. J. Food Microbiol.*, 156, 168–175.

EFSA (2015) European Food Safety Authority. The 2013 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 2015;13(3):4038, 169 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4038.

EC (2006). European Commission. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5–24.

Fink-Gremmels, J.; Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137 (3), 326–341.

Fredlund, E.; Gidlund, A.; Sulyok, M.; Börjesson, T.; Krska, R.; Olsen, M.; Lindblad, M. (2013). Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats—Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 167, 276–283.

Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedili. (2008). A. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian foods. *Food Control*, 19, 921-924.

Grafenhan, T.; Patrick, S.K.; Roscoe, M.; Trelka, R.; Gaba, D.; Chan, J.M.; McKendry, T.; Clear, R.M.; Tittlemier, S.A. (2013). *Fusarium* damage in cereal grains from Western Canada. 1. Phylogenetic analysis of moniliformin-producing *Fusarium* species and their natural occurrence in mycotoxin-contaminated wheat, oats, and rye. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 5425–5437. [CrossRef]

Grandcoin, A., Piel, S., & Baurès, E. (2017). AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. *Water Research*, 117, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055>.

Gottschalk, C.; Barthel, J.; Engelhardt, G.; Bauer, J.; Meyer, K. (2007). Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 1547–1553.

Gulvady, A.A., Brown, R.C., Bell, J.A. (2013). Nutritional comparison of oats and other commonly consumed whole grains. In: Chu, Y. (Ed.), *Oats Nutrition and Technology*. John Wiley & Sons Ltd, Hoboken, NJ, p. 71–93.

Halima, N. B.; Saad, R. B.; Khemakhem, B.; Fendri, M.; Abdelkafi, S. (2015). Oat (*Avena Sativa L.*): Oil and Nutrient Compounds Valorization for Potential Use in Industrial Applications. *J. Oleo Science*, 64 (9), 915–932.

Han, X.Y., Huang, Q.C., Li, W.F., Jiang, J.F., Xu, Z.R. (2008). Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B1 levels. *Livest. Sci.* 119, 216–220.

Hietaniemi, V.; Ramo, S.; Yli-Mattila, T.; Jestoi, M.; Peltonen, S.; Kartio, M.; Sievilainen, E.; Koivisto, T.; Parikka, P. (2016). Updated survey of *Fusarium* species and toxins in Finnish cereal grains. *Food Addit. Contam. Part A*, 33, 831–848

Hofgaard, I.S.; Aamot, H.U.; Torp, T.; Jestoi, M.; Lattanzio, V.M.T.; Klemsdal, S.S.; Waalwijk, C.; Van der Lee, T.; Brodal, G. (2016). Associations between *Fusarium* species and mycotoxins in oats and spring wheat from farmers' fields in Norway over a six-year period. *World Mycotoxin Journal*, 9, 365–378.

- Holland, P. T., Hamilton, D., Ohlin, B., Skidmore, M. W. (1994). Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 335–356.
- Islam, M. N., Tabassum, M., Banik, M., Daayf, F., Fernando, W.G.D., Harris, L.J., Sura, S., Wang, X. (2021) Naturally Occurring Fusarium Species and Mycotoxins in Oat Grains from Manitoba, Canada *Toxins* 2021, 13, 670. <https://doi.org/10.3390/toxins13090670>.
- Ivanova, L.; Sahlström, S.; Rud, I.; Uhlig, S.; Fæste, C.K.; Eriksen, G.S.; Divon, H.H. (2017). Effect of primary processing on the distribution of free and modified Fusarium mycotoxins in naturally contaminated oats. *World Mycotoxin Journal*, 10, 73–88.
- Kiř, M., Milořević, S., Vulić, A., Herceg, Z., Vukuřić, T., & Pleadin, J. (2020). Efficacy of low pressure DBD plasma in the reduction of T-2 and HT-2 toxin in oat flour. *Food Chemistry*, 316, 126372.
- Kolakowski, B. M., Miller, L., Murray, A., Leclair, A., Bietlot, H., & van de Riet, J. M. (2020). Analysis of glyphosate residues in foods from the Canadian Retail Markets between 2015 and 2017. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(18), 5201–5211. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07819>.
- Luo, S., Du, H., Kebede, H, Lui, Y., Xing, F. (2021). Contamination status of major mycotoxins in agricultural product and food stuff in Europe *Food Control* 127, 108120.
- Malalgoda, M., Ohm, J. B., Ransom, J. K., Green, A., Howatt, K., Simsek, S. (2020). Pre-harvest glyphosate application during wheat cultivation: Effects on wheat starch physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 503–511. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06456>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- Meyer, J. C., Hennies, I., Wessels, D., Schwarz, K. (2021) Survey of mycotoxins in milling oats dedicated for food purposes between 2013 and 2019 by LC–MS/ MS. *Food Additives & Contaminants: Part A* <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1950931>
- Nathanail, A. V., Syvřahuoko, J., Malachovřa, A., Jestoi, M., Varga, E., Michlmayr, H., et al. (2015). Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(16), 4745–4755.
- Pietsch, C., Schulz, C., Rovira, P., Kloas, W., & Burkhardt-Holm, P. (2014). Organ damage and hepatic lipid accumulation in carp (*Cyprinus carpio* L.) after feed-borne exposure to the mycotoxin, deoxynivalenol (DON). *Toxins*, 6(2), 756–778.
- Pleadin, J., Vahćić, N., Perćsi, N., Sevelj, ř D., Markov, K., Frece, J. (2013). Fusarium mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*, 32 (1), 49–54.
- Portier, C. J., Armstrong, B. K., Baguley, B. C., Baur, X., Belyaev, I., Bellé, R., et al. (2016). Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the international agency for research on cancer (IARC) and the european food safety authority (EFSA). *Journal of Epidemiology & Community Health*, 70(8), 741–745.

Rai A, Dixit S, Singh SP et al. (2018). Presence of zearalenone in cereal grains and its exposure risk assessment in Indian population. *Journal of Food Science* 83, 3126- 3133.

Randhawa, M. A., Ahmed, A., Javed, M. S. (2014). Wheat contaminants (pesticides) and their dissipation during processing. In R. R. Watson, V. R. Preedy, & S. Zibadi (Eds.). *Wheat and rice in disease prevention and health* (pp. 263–277). London: Academic Press.

Rasmussen, P.H.; Nielsen, K.F.; Ghorbani, F.N.; Spliid, H.; Nielsen, G.C.; Jørgensen, L.N. (2012). Occurrence of different trichothecenes and deoxynivalenol-3- β -D-glucoside in naturally and artificially contaminated Danish cereal grains and whole maize plants. *Mycotoxin Res.*, 28, 181–190.

Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29(1), 3–26.

Schöneberg, T.; Jenny, E.; Wettstein, F.E.; Bucheli, T.D.; Mascher, F.; Bertossa, M.; Musa, T.; Seifert, K.; Gräfenhan, T.; Keller, B.; et al. (2018). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Swiss oats—Impact of cropping factors. *Eur. J. Agron.*, 92, 123–132.

Schwake-Anduschus, C.; Langenkämper, G.; Unbehend, G.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Münzing, K. (2010). Occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 toxins in oats from cultivar studies in Germany and degradation of toxins during grain cleaning treatment and food processing. *Food Addit. Contam.*, 27, 1253–1260.

Shar, Z. H., Sumbal, G. A., Sherazi, S. T. H., Bhangar, M. I., & Nizamani, S. M. (2014). Natural co-occurrence of aflatoxins and deoxynivalenol in poultry feed in Pakistan. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 7(3), 162–167.

Tarazona, A., Gómez, J. V., Mateo, F., Jiménez, M., Mateo, E. M. (2021). Potential Health Risk Associated with Mycotoxins in Oat Grains Consumed in Spain. *Toxins* 2021, 13, 421. <https://doi.org/10.3390/toxins13060421>.

Torp, M., & Langseth, W. (1999). Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. *Mycopathologia*, 147(2), 89–96.

Uygun, U., Koksel, H., Atli, A. (2005). Residue levels of malathion and its metabolites and fenitrothion in post-harvest treated wheat during storage, milling and baking. *Food Chemistry*, 92, 643–647.

Van der Fels-Klerx, H.J., Klemsdal, S., Hietaniemi, V., Lindblad, M., Ioannou-Kakouri, E., van Asselt, E.D. (2012). Mycotoxin contamination of cereal grain commodities in relation to climate in North West Europe. *Food Addit Contam Part A*. 29 (10):1581–1592. doi:10.1080/19440049.2012.689996.

Vegi, A., Stebbins, B.R., Ransom, J.K., Simsek, S. (2021). Impact of glyphosate applied preharvest on oat kernel quality. *Cereal Chemistry*: 2021; 00; 01-12.

Vidal, A., Marín, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013). Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 133–138.

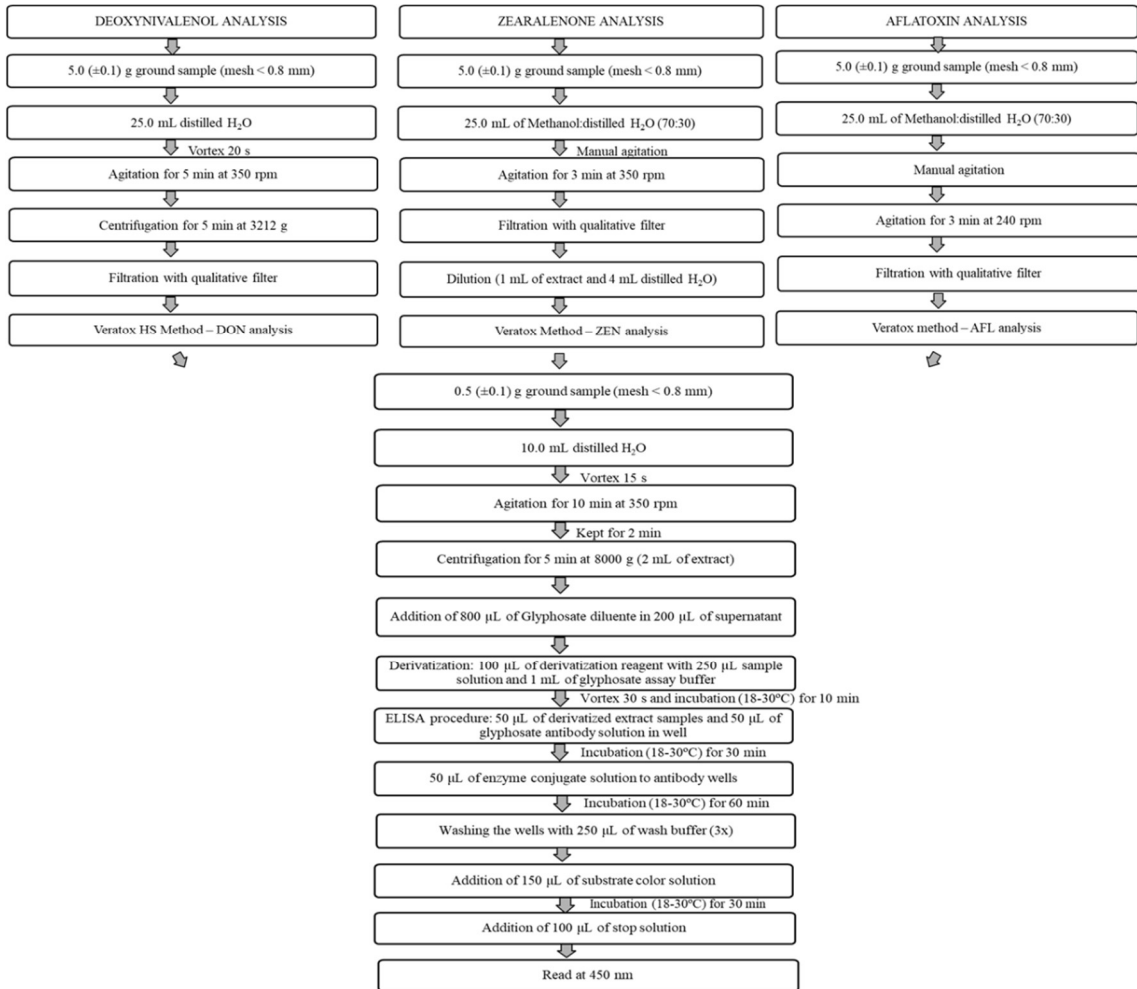
Wu, X., Murphy, P., Cunnick, J., Hendrich, S. (2007). Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1846–1855.

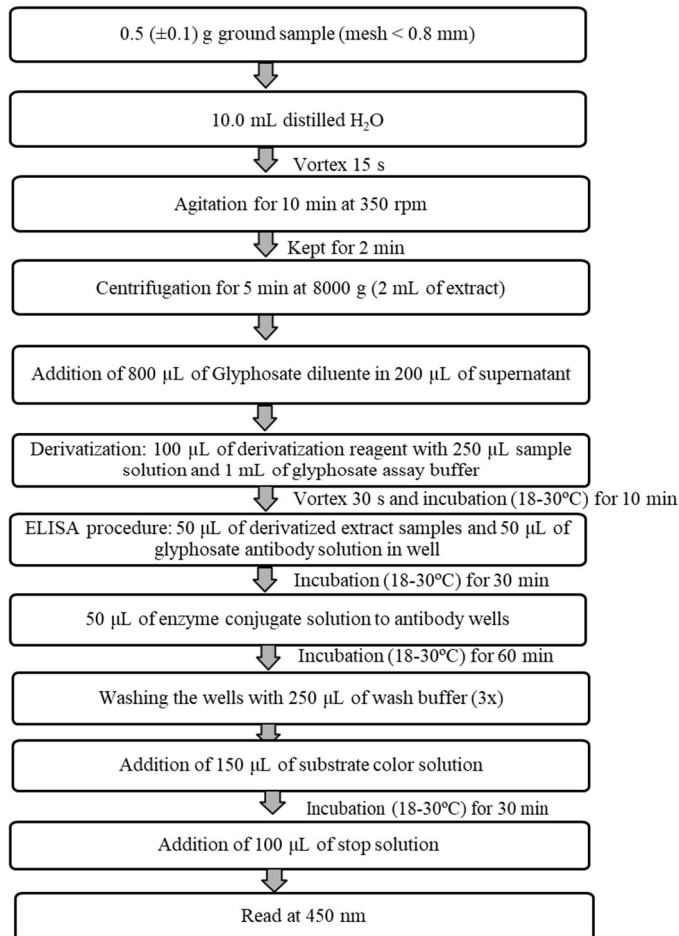
Yang, X., Liu, P., Cui, Y., Xiao, B., Liu, M., Song, M., et al. (2020). Review of the reproductive toxicity of T-2 toxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(3), 727–734.

Yang, W., Yu, M., Fu, J., Bao, W., Wang, D., Hao, L., et al. (2014). Deoxynivalenol induced oxidative stress and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 383–396.

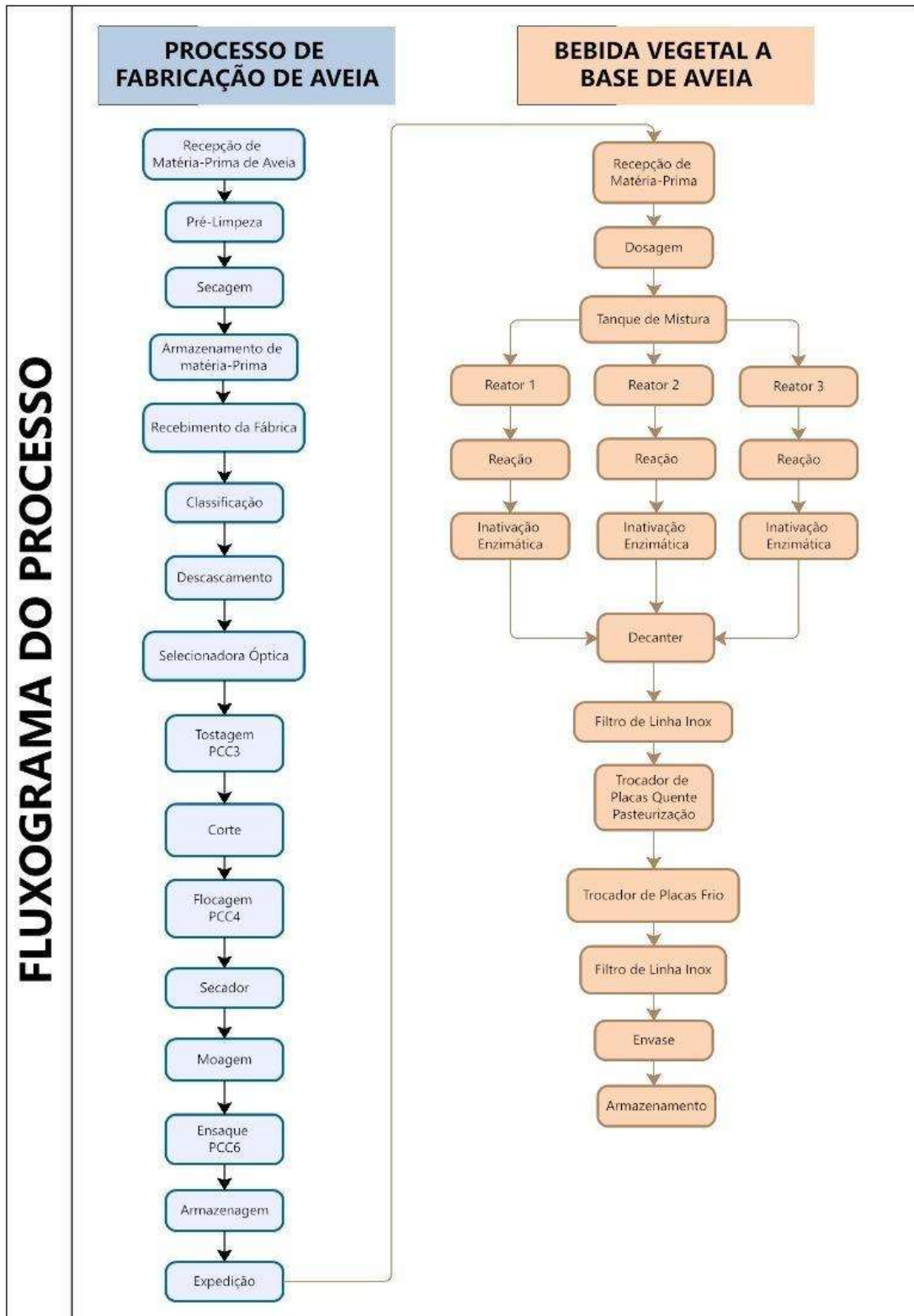
SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1: Procedures for mycotoxins determination



S2: Procedure for glyphosate determination

S3: Oat and vegetable-based beverage processing flowchart



CAPÍTULO 2 – OZONE IN DETOXIFICATION (MYCOTOXINS AND GLYPHOSATE) AND MICROBIAL DECONTAMINATION IN INNOVATIVE OAT-BASED BEVERAGE PRODUCING PLANT

ABSTRACT: The increasing awareness concerning healthy functional food has stimulated the ingestion of oat derived products as flour, flakes, bran, and purified β -glucan. The recent trend in application of oat flour has been the innovative oat-based beverages to attend the practice of vegetable-based non-dairy milk alternatives. The study contributes to assure the safety of such contamination susceptible beverages incorporated into classical dry-cereal plant system in agroindustry, where the ozone (O_3) treatment would be an useful rapid decontamination strategy. The O_3 was tested as an alternative to reduce the microbiological contamination, mycotoxins (deoxynivalenol-DON, Zearalenone-ZEA, aflatoxin-AFLA), and glyphosate in crude oat flour material as well as in final developed beverage, which was also evaluated for physic-chemical, viscosity, and color characteristics. The effect of O_3 treatment concerning concentration (20mg/L to 60mg/L), and exposure-time (15min to 45min) were evaluated by 2^2 - factorial design, using naturally contaminated samples. The reliability of analytical analysis was standardized by periodical inter-laboratory validation. *Salmonella*, *Bacillus cereus*, and *Enterobacteriaceae* contamination in crude oat-flour samples were lower than guideline established by Brazilian legislation (non-detectable/25g; $<1.0 \times 10^3$ UFC/g; $<1.0 \times 10^2$ UFC/g, respectively), which were non-affected by O_3 treatment ($p > 0.05$). Nevertheless, the O_3 treatment decreased the total plate count - TPC (Treatment-1 and 2) and yeast & mold count, which were reduced up to 1-log cycle ($p < 0.05$). The aflatoxin and zearalenone contaminations were lower than limit of quantification (AFL LOQ 5 μ g/kg, ZEA LOQ 25 μ g/kg); however, O_3 treatment reduced DON level in 10%, when compared with original crude-material ($p < 0.05$). The glyphosate level was reduced in 21% ($p > 0.05$) limit (from 460.1 to 363.3 μ g/kg), but it was still above the recommended. Concerning O_3 treatment in oat-based beverages, the trend in decreasing microbiological count (TPC from 1.0×10^3 UFC/g to 1.6×10^2 UFC/g) was non-significant ($p > 0.05$). The O_3 -treatment condition of oat-based beverages in this experimental study non-affected the physical-chemical, rheological and color characteristics of the final product, which enables promising application mainly with adequate microbial contaminant decreasing without affecting the nutritional and sensory characteristics.

Keywords: oat; vegetable beverage; ozone; microbial contaminant; mycotoxins; glyphosate.

1 INTRODUCTION

Oat is one of the main multiple-nutrient rich cereal, where the high demand for healthy functional ingredients stimulated the agroindustry to achieve the innovative formulas, involving novel food-processing techniques. It is characterized by rich carbohydrates - starch (53-66%), protein (9-20%), and dietary fiber (3-11%), and minor compounds as vitamins and minerals (Hahn et al., 1990). A well-balanced nutritional

profile of oat grain is also linked with prominent high content of β -glucan coupled with low glycemic starch, in addition to high essential amino acids, unsaturated fatty acids, and phenolic compounds (Mao et al., 2022). The main positive benefit is the β -glucan that is important for maintenance of normal blood LDL-cholesterol level, where the European Food Safety Authority recommended a minimum intake of 3 g per day (EFSA, 2009; Patra et al., 2022).

The nutritional property of oat-based food depends on grain section ingested, as well as the processing method. Currently, the major oat products include flakes, flour, bran, and purified β -glucan, where the flour can be obtained by milling hulled oat, or grinding flakes (Menon et al., 2016; Mao et al., 2022). Recent trend in consumption of non-dairy alternatives evidences the interest in plant-basis, stimulating production of oat-based beverages (Moretto et al., 2021). Such beverages have been the popular trend in Europe and North America, whose projection will double in 2023 (Martínez-Padilla et al., 2020).

Strong trend looks for companies claiming environmental concern in producing food with sustainable approach are connected with nutritional quality worldwide (MCCLEMENTS; NEWMAN; MCCLEMENTS, 2019). Besides the market segmented targeted on intolerance of milk, allergy, lactose or cow milk proteins, plant-based beverages have become an attractive food for healthy sustainable options nowadays (Lynch et al., 2018; Sethi et al., 2016). Increasing of vegetarianism and veganism also encouraged the research in innovative option for non-alcoholic milk analogous based in grain since the last decade (VENTURINI FILHO, 2010; OLIVEIRA et al., 2017; PAUL et al., 2019).

However, grains are highly fungi susceptible, which triggers production of non-easily controlled mycotoxins of low mass molecular secondary metabolites with serious impact in human and animals health (Kabak, 2009; Levinskaitė and Vaičekauskytė, 2022). Considering the ideal humidity and temperature associated with specific substrate and stress, the fungi / mycotoxins contamination in grain involves since field, handling, processing, transportation, packaging, and/or storage (Leyva Salas et al., 2017). Its relevance in cereals industry are targeted on different genus involved in production of trichothecenes (deoxynivalenol – DON, nivalenol – NIV, toxin T-2 and HT-2), zearalenone (ZEA), ochratoxin-A (OTA), fumonisins and aflatoxins (AFL) as well (EFSA, 2009; Juan et al., 2012; Pleadin et al., 2012; Roohi et al., 2012; Zaided et al., 2012).

The dehulling / milling process can reduce the mycotoxin in flour, as high level remains in bran due to prevalence in grain surface. Nevertheless, it is unable to guarantee the complete elimination, as well as are the traditional bakery, pasta, cooking, extrusion or frying processes (Castells et al., 2005; Brera et al., 2013; Giménez et al., 2013; Zhang and Wang, 2014; Tibola et al., 2015).

Ozone has been a strong oxidant emerging in food safety within eco-friendly and cost-effective non-thermal processing recognized as a green technology (Zhu, 2018; Sivaranjani et al., 2021). The major advantage is the automatic decomposition of any excessive ozone in oxygen without need to remove gas from product, listing it as “Generally Recognized As Safe” - GRAS for food matrix disinfection (Obadi et al., 2018). The main applications are decontamination of foodstuffs to improve the microbiological safety and qualitative shelf-life, managing of storage pests and mycotoxin degradation (Sivaranjani et al., 2021). However, O₃ residual sub-products in processed food should be a further concern in the future should be study.

This work evaluated the effect of gaseous O₃ treatment in microbiological contamination, mycotoxins and pesticide – glyphosate levels in initial crude oat flour material, and thereafter in final developed oat-based beverage, which was also checked for physic-chemical, rheological and color properties. Instead of time-consuming and high cost residues analysis based on liquid chromatography, the rapid and simplified real-time analyses based in enzyme-linked immunosorbent assays was applied for determination of DON, ZEN, AFL, as well as the GLY – glyphosate monitoring, and gluten analysis.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Reagents and chemicals

The Veratox[®] DON-HS quantitative kit (product id #8332, Neogen Corporation, Lansing, USA) contained 5 deoxynivalenol standards (DON at 0, 25, 50, 100 and 250 µg/kg), DON HRP conjugate (horseradish peroxidase – HRP enzyme), DON-K-Blue[®] substrate (tetramethylbenzidine - TMB and hydrogen peroxide (H₂O₂)) and Red Stop[®] solution (Sodium fluoride); the Veratox[®] ZEN quantitative kit (product id #8110 Neogen Corporation, Lansing, USA) contained 5 zearalenone standards (ZEN at 0, 25, 75, 150 and 500 µg/kg), ZEN HRP conjugate (horseradish peroxidase – HRP enzyme), ZEN-K-Blue[®] substrate (Dimethyl sulfoxide and hydrogen peroxide) and Red Stop[®] (Sodium fluoride)

solution; Veratox[®] AFL quantitative kit (product id #8030, Neogen Corporation, Lansing, USA) contained 4 aflatoxins standards (AFL at 0, 5, 15 and 50 µg/kg), AFL HRP conjugate (horseradish peroxidase – HRP enzyme), AFL-K-Blue[®] substrate (2-Pyrrolidinone and hydrogen peroxide) and Red Stop[®] (Sodium fluoride) solution (Neogen Corporation, Lansing, USA). HPLC grade methanol (99.9%) for ZEN and AFL extraction were Merck (USA).

The ELISA kit for glyphosate analysis (Part Number 500205) contained 5 standards (GLY at 0.075, 0.20, 0.5, 1.0 and 4.0 µg/kg), glyphosate diluent, assay buffer, derivatization reagent diluent, primary antibody, glyphosate conjugate, color substrate (TMB), washing buffer, and stop solution (Eurofins Abraxis, Warminster, USA).

The Ridascreen[®] Total gluten kit (R7041) contained buffer (guanidine chloride), 6 standard concentrations (0, 5, 10, 20, 40, and 80 mg/kg), washing buffer, conjugate (ethanediol and reaction mixture consisting of 5-chloro-2-methyl-2isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1); Bayport process (>- 92%), substrate (citric acid), and stop solution (sulfuric acid 2.5-5.0%), and the cocktail solution patented (R7016) (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

The plates AC Petrifilm[™], YM Petrifilm[™], EC Petrifilm[™], and *Enterobacteriaceae* count Petrifilm[™] were for microbial count concerning mesophilic aerobic, yeast and mold, total coliforms and *E. coli*, and *Enterobacteriaceae*, respectively (3M, Saint Paul, USA). The VIDAS[®] SLM kit for *Salmonella* analysis was purchased from Biomérieux (Marcy-l'Étoile, France). The standards and solutions from manufactures kits were purchased ready-to-use, and no preparation and dilution were required for analysis.

2.2 Samples

2.2.1 Oat flour

Oat flour (*Avena sativa* L. cultivar IPR Afrodite, 2022 crop of the Paraná state, Brazil), and oat-based beverage samples were kindly provided by SL Alimentos Company, an agroindustry in the county of Mauá da Serra, Paraná state-Brazil. This agroindustry receives oat from all Southern Brazil to process and produce the oat flakes, quick cooking oat flakes, oat bran, oat flour, extruded products, and other whole cereals with rice, barley, rye and wheat.

Oat flour has been the final product in manufacturing stage, which involved the steps: reception of raw material in delivery post, cleaning, classification, husking, steam treatment, cutting, flocking, grinding, and packing in 1.0 ton each bag (Supplementary material S1: flowchart oat process).

A total of 26 samples of oat flour (3.0 Kg each) were randomly collected during the filling process of 1.0-ton bag, which extended for approximately 40 min. The 26 samples were immediately analyzed for mycotoxins (DON, ZEA and AFL) and glyphosate in the internal laboratory of the SL Alimentos company. One sample with naturally contaminants presence that was the most value found was selected for O₃ treatment experiment. Among analysis carried out (mycotoxins, glyphosate, gluten and microbiology), only glyphosate showed contamination over than maximal tolerable established by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) of the Brazilian Ministry of Health, which was settled at 50 µg.kg⁻¹. Concerning other parameters, although showing contaminant levels lower than recommended limits, the values were enough for proceeding the O₃ treatment tests.

Some samples showed contamination values below the limits of the legislation, but still, it was decided to continue the experiments in order to verify the effect of ozone on low levels of contamination, and also to target the baby food market, in which the recommended limits are below the limits proposed by current legislation.

The crude hulled oats were ground to 20 mesh, homogenized, working samples were withdrawn and placed in hermetically sealed containers (sealed plastic packaging) and stored at -18 °C until analysis.

2.2.2 Oat-based beverage

The oat-based beverage was prepared by mixing oat flour, water and amylolytic enzymes composed by a set of fungal amylolytic active on α-1,4 linkage (260 AGU/g, Novozymes, Krogshøjvej, Denmark) for 30 min reaction at 85°C. The mixture was decanted, filtered, pasteurized, and the final product was packed and stored in refrigeration chamber at – 5°C to 5°C (12m x 2,5m x 2,5m).

Samples (1000mL each) were collected with sterile pipettes of one batch corresponding 4000 L (total of 4 rentanks corresponding 1000L each), homogenized and placed in a sterile plastic bottle. One sample (1000 mL) showing positive for contaminants concerning microbial counting (total plate count and yeast and moulds) and gluten (RDC n°727/2022, ANVISA) was selected to be submitted for O₃ treatment tests. The sample was

homogenized, (1000mL) packed in sealed packaging and stored at $<5^{\circ}\text{C}$ (Refrigerator TF42 Model, Eletrolux, Brasil).

2.3 Experimental Design

The sample preparation (oat flour and oat-based beverage), application of O_3 treatment described in experimental design as well as the real-time analysis concerning mycotoxins, glyphosate, gluten (immunoassay, rapid d-ELISA), physicochemical and microbiology, quality control procedures were carried out *in loco* involving the industrial section of the SL Alimentos Company.

The crude oat flour (80 g in duplicate) and oat-based beverage (50 g in duplicate) were exposed to O_3 treatment at different concentrations (20 mg/L, 40 mg/L and 60 mg/L) and time (15, 30, and 45 min). After O_3 exposure, the samples in each treatment were analyzed in duplicate, and the data were compared with control without O_3 treatment.

The experimental design was carried out using a 2^2 factorial with a central point. 2 levels (-1/+1) were used, considering 0 as the central point associated with 2 variable factors (concentration and time), as shown in the table below:

Table 1. Experimental design: 2^2 factorial (2 levels and 2 variables corresponding concentration and time).

Treatment	O_3 (mg/L)	Time (min)
1	-1 (20)	-1 (15)
2	-1 (20)	+1 (45)
3	+1 (60)	-1 (15)
4	+1 (60)	+1 (45)
5	0 (40)	0 (30)
6	0 (40)	0 (30)
7	0 (40)	0 (30)

2.4 Ozone treatment

The O_3 was generated in industrial ozone generator (M 10i, myOZONE, Jaguariúna, Brazil) using oxygen (O_2 , 99.99%, White Martins, Brazil). The samples (80 g of oat flour or 100 mL of oat-based beverage) were transferred into plastic bag (25 cm \times 35 cm), and air was removed (vacuum pump, connect myOZONE, Jaguariúna, Brazil).

Then, the O₃ was introduced through tube (myOZONE), which was generated fixing O₂ flow rate at 2 L/min. The efficiency of O₃ generation was adjusted from 33 to 88% to reach the desired O₃ concentration, which was 20, 40, and 60 mg/L. The sample was maintained in contact with O₃ for 15 and 45 min. After the treatment, the residual O₃ was removed using vacuum pump (M 10i, myOZONE, Jaguariúna, Brazil)

2.5 Mycotoxins and glyphosate analysis (Immunoassay)

2.5.1 Extraction

DON was extracted from 5.0 ± 0.1 g of sample mixing 25 mL of distilled water, vortex-mixed (20 secs, Vortex genie 1, Scientific Industries, USA), shaken at 15 x g (5 min \pm 30 s, horizontal shaker, Labortechnik K5501, IKA, Germany). The extract was centrifuged at 15 x g for 5 min (Hearaeus Megafuge1.0, Thermo Scientific, USA), and the supernatant was filtered (597^{1/2} filter (Germany) DON in filtrate was analyzed by Veratox HS kit.

ZEN was extracted from 5.0 ± 0.1 g of each sample mixing 25 mL of 70% methanol (v/v). After hand-mixing for 3 min, the sample was shaken at 15 x g for 2 min (horizontal shaker, Labortechnik K5501, IKA, Germany). The extract was filtered through paper filter (Germany), and the filtrate was diluted in distilled water (1 mL of filtrate with 4 mL of distilled water) and ZEN analyzed by Veratox kit.

AFL was extracted from 5.0 ± 0.1 g of each sample mixing 25 mL of 70% methanol (v/v). After hand-mixing, the sample was shaken at 7 x g for 3 min (horizontal shaker, Labortechnik K5501, IKA, Germany). Then the extract was filtered (qualitative paper filter, Germany) and the filtrate was analyzed by Veratox kit.

GLY was extracted from 0.50 ± 0.01 g of sample mixing 10 mL of distilled water. After vortex-mixing for 15 secs, the sample was shaken for 10 min (horizontal shaker (Labortechnik K5501, IKA, Germany). The sample was maintained at room temperature for 2 min. Then 2 mL of supernatant was centrifuged for 5 min at 8000 x g, and 200 μ L of supernatant were mixed with 800 μ L of glyphosate diluent. Prior the d-ELISA analysis, the derivatization was carried out adding 100 μ L of derivatization reagent diluent in tube with 250 μ L of sample solution and 1 mL of glyphosate assay buffer, followed by 30 sec mixing (Vortex 772 model, Fisatom, Brasil), and it was incubated at room temperature for 10 min.

2.5.2 Enzyme immunoassays (d-ELISA)

Similar d-ELISA was carried out for analysis of DON, ZEN and AFL, except the incubation-time.

A 100 μL aliquot of toxin-conjugated solution was added into each reaction-well, followed by 100 μL of sample extract or standard controls, and it was mixed with micropipette. Then 100 μL of mixture (toxin-conjugated + sample extract) was transferred into the antibody wells. The plate was incubated at room temperature (10, 5 and 2 min for DON, ZEN and AFL, respectively), sliding the microwell holder back and forth gently on a flat surface for 10-20 seconds without splashing reagents from the wells. After incubation, the content of antibody well was shaken out and 5-time washed with 300 μL of distilled water. Then, the remaining water was tapped out on absorbent paper towel. Aliquot of 100 μL of substrate K-Blue[®] was transferred into the antibody well and the plate was again incubated at room temperature (10, 5 and 3 min for DON, ZEN and AFL, respectively), and mix by sliding back and forth on a flat surface for 20 seconds. An aliquot of 100 μL of Red Stop[®] solution were added into the antibody well, and mixed by sliding back and forth on a flat surface. The bottom of the microwells was wiped with a dry cloth and the wells were placed at microwell reader (Neogen, USA) to be read at 650 nm. The limit of quantification (LoQ) for DON, ZEA, and AFL is 70, 25, and 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

For the d-ELISA of GLY, 50 μL of derivatized extract samples were added into each well, followed by 50 μL of glyphosate antibody solution. The plate was incubated at room temperature for 30 min, sliding the microwell holder back and forth gently for the first 30 seconds. Then, 50 μL of enzyme conjugate solution were transferred to the antibody wells and the plate was incubated at room temperature for 60 minutes, sliding the microwell holder back and forth gently for the first 30 seconds. After incubation period, the contents of the wells were shaken out and washed them with 250 μL of wash buffer (three times). Then, the remaining buffer was tapped out on an absorbent paper towel. 150 μL of substrate color solution were transferred to the wells and the plate was incubated at room temperature (23 $^{\circ}\text{C}$, 18 to 30 $^{\circ}\text{C}$) for 30 minutes, sliding the microwell holder back and forth gently for the first seconds. After, 100 μL of Stop solution was added into the wells and mixed by sliding back and forth on a flat surface. The bottom of the microwells was wiped with a dry cloth and the wells were placed at microwell reader to be read at 450 nm. The LOQ for GLY was 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2.6 Microbiological analyses

Decrease in microbial contamination was evaluated comparing O₃ treated and control samples carrying out analysis of 25 g of sample diluted in 225 mL of peptone water 0.1% (1.07228.0500 code Merck, Darmstadt, Germany), which was 1 min homogenized for mesophilic aerobic counting (AOAC 990.12, Association Of Official Analytical Collaboration); yeast and mold counting (AOAC #997.02, Association Of Official Analytical Collaboration); *Enterobacteriaceae* analyses (AOAC 2003.01, Association Of Official Analytical Collaboration); *Bacillus cereus* (ISO 7932:2004). *Salmonella* sp. was analyzed according the validated ISO 16140 by ELFA - Enzyme Linked Fluorescent Assay technique, VIDAS[®] system (Marcy-l'Étoile, France).

2.6.1 Proficiency tests (Intra-laboratory and inter-laboratorial validation) Microbial and immunoassays

All the samples were analyzed in the Quality control laboratory of the SL Alimentos Company (Mauá da Serra), through annual participation in international proficiency tests (P tests) for mycotoxins detection (Fapas Company[®] organized by Fera Science - Institute for Agri-Food Research and Innovation – York, UK), and microbial analyses (LGC Group[®] organized by Ukas - United Kingdom Accreditation Service, Chamberhall, UK). The inter-laboratorial validation – proficiency tests have been carried out since 2012.

P tests were performed using codified samples, which were analyzed according to the approved methodology in the internal laboratory test, and the results were submitted/reported on the provider's website.

Once a Proficiency Tests round has closed, the results were analyzed and the assigned value determined for each analyte, according to the criteria provided by the provider. For the purposes of performance assessment for a single round, z and z' scores are interpreted as follows:

z/z' score	Interpretation
$ z \leq 2.00$	Satisfactory result
$2.00 < z \text{ and } < 3.00$	Questionable result
$ z \geq 3.00$	Unsatisfactory result

All homogeneity assessments have been conducted in accordance with the principles stipulated in ISO 13528. For quantitative testing, one-way ANOVA is used to estimate the analytical and sampling variance. For the sample to be considered sufficiently homogeneous for use in the PT scheme, the calculated sampling variance must be less than a critical value calculated according to the procedure described in the ISO 13528 (ISO 13528 (2015); the statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory validation comparison.

2.7 Gluten analysis (Immunoassay)

2.7.1 Extraction

Total of 0.25 ± 0.01 g of sample was hand-mixed with 2.5 mL of cocktail patented, incubated at 50 °C for 40 min, and immediately ice-bath refrigerated to room temperature. Then 7.5 mL of 80% ethanol solution were added, shaken (240 rpm for 60 min, TE 165 model, Tecnal), and it was centrifuged at $1507 \times g$ for 10 min (K14-5000M model, Kasvi). The 80 μ L of supernatant was diluted in 920 μ L of wash buffer (Reaction mixture consisting of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1); Bayport process (>- 92%)

2.7.2 Enzyme immunoassay (d-ELISA)

The d-ELISA was carried out of gluten analysis adding 100 μ L of sample extract and standards into each well and incubated for 30 min at room temperature. After incubation period, the contents of the wells were shaken out and washed them with 250 μ L of wash buffer (three times). Then, 100 μ L of conjugate (ethanediol and reaction mixture consisting of 5-chloro-2-methyl-2hisothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1); Bayport process (>- 92%), were added to each well and incubated for 30 min at room temperature. After incubation period, the contents of the wells were shaken out and washed them with 250 μ L of wash buffer (three times). Then, 50 μ L of substrate (citric acid), and 50 μ L of chemogene (metanol and glycerol) were added to each well and gently mixed. The plate was incubated at room temperature in the dark for 30 min. After, 100 μ L of stop solution (sulfuric acid 2.5-5.0%), was added into the wells and gently mixed. After

30 min of the addition of the stop solution, the wells were placed at microwell reader to be read at 450 nm.

2.8 Physic-chemical and rheological characteristic analysis

The protein content and total soluble solids of the oat-based beverages was determined according to the official methods AACC 46-12 and AACC 44-19, respectively. The dynamic viscosity of the oat-based beverage samples was analyzed in viscosimeter (Bookfield, Middleboro, MA/ EUA) where 150 mL of sample was applied in each run, and it was carried out at a constant speed of 100 rpm using Spindle S63.

2.9 Color analysis

The color analysis of the control and O₃ treated oat-beverage samples was performed with a digital colorimeter (CR 400, Konica Minolta, Japan) using the CIELAB system, L* a* b* scale and light source D65 (observation angle of 10°). The L* luminosity values (varying from 100% white and 0% black), a* (red – green component), and b* (yellow – blue component) were five times for each sample and equipment calibration was performed with white disk. The analyzes were carried out in the laboratory of UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

2.10 Statistical analysis

The effects of the operational conditions of the O₃ treatment were evaluated by 2²-factorial design with triplicate in the central point using the software Minitab 20. The evaluated variables were O₃ concentration (20 – 60 mg/L) and treatment time (30 – 60 min). Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test at a confidence level of 95% were performed.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The effect of rapid de-contamination strategy applying O₃ treatment was evaluated, where the advance should amend innovative safe concerning liquid oat-based beverages, taking to account the practical experience and knowledge of traditional dry-cereal

producing agroindustry. Therefore, the production safety should be assured from dry crude material - oat flour to final perishable/contamination susceptible beverage produced *in loco*, which should keep-up high sensorial quality. I.e., the application of real-time O₃ treatment should be coupled with safety and quality control involving microbiology, reliable real-time analysis (rapid immunoassays for mycotoxins, glyphosate and gluten), as well as the physic-chemical, rheological and color analysis.

3.1 Oat flour

3.1.1 Microbiological analyses

The oat flour was microbiologically characterized at the stage – without (before) and after O₃ treatment regarding total plate count (TPC), yeast and mold count, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* sp. (Table 1). The Brazilian guideline established the microbiological contamination in oat flour as: *Salmonella* (absent in 25 mL), *Bacillus cereus* ($\leq 1.0 \times 10^3$ CFU/mL), and *Enterobacteriaceae* ($\leq 1.0 \times 10^2$ CFU/mL) (IN n° 161/2022, Brasil – Item 19, letter ‘a’). The control without O₃ treatment was in accordance with guideline limits, with non-significant difference ($p > 0.05$) post O₃ treatments, possibly due to low initial contamination. Antimicrobial activity of O₃ could be affected by growth rate as other factors such as microbial strain, cell injury, pH, temperature, humidity, and gaseous or aqueous phase of O₃ (El-Desouky et al., 2012).

Although TPC and yeast and mold (Table 2) counting were non-mandatory in Brazilian legislation (ANVISA, IN n°161/2022), they were carried out as additional quality indicators, i.e., the initial microbial counting in cereal flours can be indicative of possible spoilage, whereas the contamination of yeast and mold in oat flour can trigger mycotoxin production depending on storage condition. The control with initial counting of 8.9×10^3 (TPC) and 2.0×10^3 UFC/mL (yeast and mold) were reduced by O₃ treatment (Table1, $p \leq 0.05$, Supplementary material, Table S2 and S3), confirming the antimicrobial effectiveness - high reactivity of oxidizing free radicals (Brodowska et al., 2018). The main mechanism involved in microbial inactivation are primarily, by oxidation of sulfhydryl and amino acid groups of protein and enzymes; secondly, the oxidation of polyunsaturated fatty acids, which can cause cell disintegration followed by leakage and subsequent cell lysis (Sivaranjani et al., 2021).

In TPC, the O₃ treatment reduced the counting in more than 1-log concerning treatment 1 and 2 (Table 1), although the variables O₃ concentration and treatment time showed non-significant difference ($p>0.05$) at levels evaluated (Table 2). Hu et al. (2020) observed a reduction in TPC of buck wheat-based composite flour by proroguing O₃ treatment, from 3.915 log to 3.185 log after 15 min applying gaseous O₃ at 2.4 g/min. The anti-microbial efficacy depends on experimental conditions and sample intrinsic characteristics, difficulting comparison in different studies (Brodowska et al., 2018).

Table 2: Effect of O₃ treatment in microbiological, mycotoxins, glyphosate, and physic-chemical analyses in crude oat flour, 2²- factorial design.

	TREATMENT							
	1	2	3	4	5	6	7	Control
O ₃ (mg/L)	20 (-1)	20 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	40 (0)	40 (0)	40 (0)	-
Time (min)	15 (-1)	45 (+1)	15 (-1)	45 (+1)	30 (0)	30 (0)	30 (0)	-
Microbiology (CFU/mL)								
Total plate count	9.0 × 10 ² b	6.0 × 10 ² b	1.2 × 10 ³ b	1.7 × 10 ³ b	2.8 × 10 ³ b	1.8 × 10 ³ b	1.8 × 10 ³ b	8.9 × 10 ³ a
Yeast and mold	2.3 × 10 ² b	1.2 × 10 ² c	1.1 × 10 ² c	2.0 × 10 ² b	1.9 × 10 ² b	1.8 × 10 ² b	1.9 × 10 ² b	2.0 × 10 ³ a
<i>Enterobacteriaceae</i>	1.0 × 10 ¹ a	1.0 × 10 ¹ a	2.0 × 10 ¹ a	1.0 × 10 ¹ a	1.0 × 10 ¹ a	2.0 × 10 ¹ a	1.0 × 10 ¹ a	2.0 × 10 ¹ a
<i>Bacillus cereus</i>	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a
<i>Salmonella</i> (in 25 mL)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mycotoxins (µg/kg)								
Aflatoxins *	0.9	0.9	1.2	0.5	0.9	0.8	0.9	0.7
Zearalenone *	0.4	2.1	7.4	4.5	4.9	5.5	3.9	3.9
Deoxynivalenol	237.6 ^{bc}	235.2 ^c	254.4 ^{ab}	266.4 ^a	210.0 ^d	212.8 ^d	212.8 ^d	239.2 ^{bc}
Pesticide (µg/kg)								
Glyphosate	443.3 ^a	410.1 ^a	406.3 ^a	363.3 ^a	414.0 ^a	434.5 ^a	426.0 ^a	460.1 ^a
Physic-chemical (mg/kg)								
Gluten	141.6 ^a	118.0 ^a	115.2 ^a	163.6 ^a	155.4 ^a	132.5 ^a	155.6 ^a	157.7 ^a

Different letters in the same line mean significant difference at 95% confidence level. *Data lower than LOQ (limit of quantification).

DON LOD 35µg/kg LOQ 70µg/kg - ZEA LOD 10µg/kg LOQ 25µg/kg - AFL LOD 1,4µg/kg LOQ 5µg/kg - GLY LOD 5µg/kg LOQ 7,5µg/kg

Limits for *Salmonella* (absent in 25 mL), *Bacillus cereus* (≤ 1.0 × 10³ CFU/mL) and *Enterobacteriaceae* (≤ 1.0 × 10² CFU/mL) (IN n° 161/2022, Brasil – Item 19, letter ‘a’).

Analysis was done in duplicate. ND: Non-detected

Concerning yeast and mold counting, it was also possible to reduce the microbial count in approximately >1 -log in all treatments - 1 to 7 (Table 2), but the interaction between the variables O_3 concentration and treatment time showed significant difference ($p < 0.05$), whereas the linear factors were non-significant ($p > 0.05$) (Table 3). Increasing O_3 concentration and exposure time may increase the microbial reduction (Sivaranjani et al., 2021), but in this study (Table 2), the experiment performed at the highest levels of O_3 concentration and time (60 mg/mL and 45 min, respectively) did not lead to the high reduction of yeast and mold in the oat flour, which was statistically similar to the experiment performed with low O_3 concentration and time (20 mg/L of and 15 min, respectively).

Table 3: Analysis of Variance (ANOVA) for the mesophilic aerobic (TPC) counting in oat flour treated with O_3 .

Source	DF	Adj SS	Adj MS	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value
Model	4	2490476	622619	1.87	0.378
Linear	2	500000	250000	0.75	0.571
O_3 concentration (mg/mL)	1	490000	490000	1.47	0.349
Time (min)	1	10000	10000	0.03	0.878
2-way interactions	1	160000	160000	0.48	0.560
$O_3 \times$ time	1	160000	160000	0.48	0.560
Error	2	666667	333333		
Total	6	3157143			

DF: degree of freedom; Adj SS: adjusted sum of squares; Adj MS: adjusted mean squares.

Table 4: Analysis of Variance (ANOVA) for the yeast and mold counting in oat flour treated with O_3 .

Source	DF	Adj SS	Adj MS	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value
Model	4	11304.8	2826.2	84.79	0.012
Linear	2	500.0	250.0	7.50	0.118
O_3 concentration (mg/mL)	1	400.0	400.0	12.00	0.074
Time (min)	1	100.0	100.0	3.00	0.225
2-way interactions	1	10000.0	10000.0	300.00	0.003
$O_3 \times$ time	1	10000.0	10000.0	300.00	0.003
Error	2	66.7	33.3		
Total	6	11371.4			

DF: degree of freedom; Adj SS: adjusted sum of squares; Adj MS: adjusted mean squares.

Similar with other microorganisms physiology profile, mold species can show different sensitivities to O₃, which depended on several factors (Brodowska et al., 2018; Sivaranjani et al., 2021) and could explain the data of this study. White et al. (2013) demonstrated the genera *Rhizopus* as the less susceptible to O₃ treatment. A comparative study evaluated the effect of gaseous O₃ in growth of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* in cold stored citrus fruit; *P. italicum* was affected by O₃, while *P. digitatum* was resistant (Lluis et al., 2001). Taking to account that the samples in this O₃ treatment may be contaminated by a diversity of mold species with different O₃ sensitivity, it can explain some unexpected result concerning microbial decrease as observed in this study.

Summarizing, the data suggested that significant microbial reduction could be expected, when O₃ was applied in substrate with high microbial load ($p < 0.05$). There was non-significant difference in substrate with low microbial loads, although a reduction trend in microbiological count occurred within the same exponential factor.

3.1.2 Mycotoxins

Despite there is any available technique for complete mycotoxins removing in food and feed, O₃ was reported as promising alternative for mycotoxins degradation (Afsah-Hejri et al., 2020; Mir et al., 2021; Zhu, 2018). The mechanism of mycotoxins degradation is unclear, but probably the oxidizing agents can react with functional groups in molecules changing the structure, as generating lower mass molecular products with reduced toxicity (Afsah-Hejri et al., 2020). The Brazilian legislation set-up the maximum residual limit (MRL) in 5 µg/kg for AFL, 100 µg/kg for ZEA, and 1000 µg/kg for DON (RDC 722/2022 and IN 160/2022). Table 1 shows the mycotoxins in oat flour before and after O₃ treatment. The AFL and ZEA were lower than LOQ of d-ELISA assay of this study, while DON were below the Brazilian MRL in all control and O₃ treated samples.

DON level decreased from 239.2 µg/kg (control) to 210 ± 3 µg/kg in samples corresponding to central point of the experiment at O₃ concentration of 40 mg/L for 30 min, i.e., a degradation rate of 10% ($p < 0.05$). According the analysis of variance at a 95% confidence level (Table 4), the linear effect of O₃ concentration and the interaction effect between O₃ concentration and time were significant ($p < 0.05$). The effect of O₃ treatment in reduction of DON in wheat and corn samples were also reported (Afsah-Hejri et al., 2020; Mir et al., 2021; Sivaranjani et al., 2021; Wang et al., 2016a, 2016b; Zhuang et al., 2020); but no studies were reported in oat.

Zhuang et al. (2020) evaluated O₃ treatments in degradation of DON in *Fusarium*-contaminated wheat; the maximum DON reduction rate of 33.33% was observed in wheat treated with O₃ (60 mg/L) for 120 min. Wang et al. (2016a) subjected whole wheat flour in O₃ treatments under different conditions of O₃ concentration, exposure time, and moisture content; DON reduction was improved increasing O₃ concentration, exposure time, and moisture content, reaching DON reduction from 3.89 mg/kg to 0.83 mg/kg, when the sample with 20.1% of moisture was treated with 100 mg/L of O₃ for 60 min. Wang et al. (2016b) also evaluated the effect of gaseous O₃ in DON reduction of wheat; increasing the exposure time from 30 to 90 min, the DON degradation rate increased from 26.4% to 53.5% using 75 mg/L of O₃.

Table 5: Analysis of Variance (ANOVA) of DON data in oat flour treated with O₃.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	p-value
Model	4	2938.91	734.73	281.15	0.004
Linear	2	599.04	299.52	114.61	0.009
O ₃ concentration (mg/mL)	1	576.00	576.00	220.41	0.005
Time (min)	1	23.04	23.04	8.82	0.097
2-way interactions	1	51.84	51.84	19.84	0.047
O ₃ × time	1	51.84	51.84	19.84	0.047
Error	2	5.23	2.61		
Total	6	2944.14			

DF: degree of freedom; Adj SS: adjusted sum of squares; Adj MS: adjusted mean squares.

The efficacy of mycotoxins decontamination with O₃ in grain depends on many factors such as O₃ concentration, treatment temperature, time of exposure, O₃ flow rate, moisture, pH, and surface roughness of grain, which difficulted comparison among different studies (Mir et al., 2021). Young et al.(1986; 1986) observed that O₃ treatment reduced DON in corn samples, but not in wheat grains, indicating that the type of grain also impacts the efficacy of O₃ in DON degradation. Such data could explain the lower DON reduction rate observed in oat of present study, when compared with wheat reported in the literature.

The grain moisture content could be a key factor to determine the efficiency of DON reduction in O₃ treatment (Wang et al., 2016a). Increasing moisture could improve the efficiency as water solubilizes O, and increasing grain and O₃ gas contact (Mir et al., 2021). Previous report indicated that wheat grain moisture content around 20% caused the highest DON reduction rates (Wang et al., 2016a; Zhuang et al., 2020). The oat flour in present study showed moisture content

of 8.0%, which may have contributed in lower reduction rates. A previous study that evaluated the reduction of aflatoxin in cottonseed meal by O₃ treatment; meal with 7% moisture yielded only 5% reduction in AFB₁, whereas AFB₁ was completely inactivated in 22% moisture (Dwarakan et al., 1968). Therefore, the O₃ efficacy concerning DON reduction in our oat study could be improved by increasing moisture content.

3.1.3 Glyphosate

Currently, O₃ treatment has emerged as a promising technology to degrade pesticide residues in food, with main mechanism involving direct oxidation by oxygen atoms, and indirect oxidation by hydroxyl radicals (Wang et al., 2019; Feng et al., 2020). GLY is the most widely used broad-spectrum herbicides worldwide, which can be associated with some adversity in plant, animal, microorganism, and human. Brazilian legislation established a MRL of 50 µg/kg for GLY in grain (Brasil, RE N° 1421/2021). The Table 6 shows that GLY level of 460.1 µg/kg in control oat was reduced to 363.3 µg/kg when it was treated with 60 mg/L of O₃ for 45 min (21% reduction rate), although of level higher than MRL. According to the ANOVA, Nevertheless, such trend in experimental condition evaluated in this study was without significant difference at 95% confidence level ($p>0.05$).

Similar to observed for the mycotoxins, the pesticides degradation by O₃ in vegetable matrices is improved by higher O₃ concentrations and longer treatment times (Wang et al., 2019), nevertheless, no specific studies reporting the GLY reduction in oat samples was found in the literature. Another important factor to determine the efficacy of O₃ to remove pesticides is the type of food, which is mainly related to the contact area, structure of tissue and compactness; the O₃ trends to be more effective in leafy vegetables than in fruits due to the lower thickness and larger surface area than fruit (Ikeura et al., 2011). In addition, environmental factors, such as temperature, humidity and pH can affect the pesticide degradation rate (Wang et al., 2019).

Table 6: Analysis of Variance (ANOVA) of GLY data in oat flour treated with O₃.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	<i>F</i> -value	<i>p</i> -value
Model	4	3855.53	963.88	9.09	0.102
Linear	2	3207.22	1603.61	15.12	0.062
O ₃ concentration (mg/mL)	1	1755.61	1755.61	16.55	0.055
Time (min)	1	1451.61	1451.61	13.68	0.066
2-way interactions	1	24.01	24.01	0.23	0.681
O ₃ × time	1	24.01	24.01	0.23	0.681
Error	2	212.17	106.08		
Total	6	4067.69			

DF: degree of freedom; Adj SS: adjusted sum of squares; Adj MS: adjusted mean squares.

3.1.4 Gluten evaluation

Gluten is a non-natural component in oat grain. Therefore, its positivity in the oat processing line indicates the undesired cross-contamination with non-oat grain, i.e., the most important indicator of contamination with mainly wheat in special functional food processing. Such cross-contamination can occur at field, as well as in the factory production lines that process multi-grains.

Table 7 compares the gluten content in control and O₃ treated oat flour samples: the residual gluten content ranged between 115.2 and 163.6 mg/kg, but the O₃ treatment had no statistically significant ($p > 0.05$) effect on the gluten content of oat flour samples (Table 6) when compared de standard sample.

Traditionally, wheat gluten proteins are divided into gliadins and glutenins, which are the major contributors of rheological properties in dough (Kieffer et al., 2007). Lee et al. (2017) reported that the wheat flour treated with O₃ for 60 min showed the lowest wet gluten content, whereas Mei et al. (2016) observed a decrease in wet gluten content after 120 min with O₃ treatment, suggesting the damage of gluten structure due to prolonged O₃ exposure, reducing the wet gluten (Lee et al., 2017).

Table 7: Analysis of Variance (ANOVA) of gluten data in oat flour treated with O₃.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-value	p-value
Model	4	1842.13	460.53	2.61	0.296
Linear	2	245.92	122.96	0.70	0.589
O ₃ concentration (mg/mL)	1	92.16	92.16	0.52	0.545
Time (min)	1	153.76	153.76	0.87	0.449
2-way interactions	1	1296.00	1296.00	7.35	0.113
O ₃ × time	1	1296.00	1296.00	7.35	0.113
Error	2	352.59	176.34		
Total	6	2194.81			

DF: degree of freedom; Adj SS: adjusted sum of squares; Adj MS: adjusted mean squares.

3.2 Oat-based beverage

3.2.1 Microbiological analyses

The oat-based beverage samples were microbiologically characterized before and after the O₃ treatment regarding the same analyses performed for oat flour: TPC, yeast and mold, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella* sp. (Table 8). Concerning oat-based beverage, the Brazilian normative establishes the microbiological limits for *Salmonella* (absent in 25 g), *Bacillus cereus* ($\leq 5.0 \times 10^2$ CFU/g), *Enterobacteriaceae* ($\leq 1.0 \times 10^2$ CFU/g), and yeast and mold ($\leq 1.0 \times 10^2$ CFU/g) (IN n° 161/2022, Brasil – Item 12, letter ‘e’). All the samples presented values compliant with the legislation for these required microbiological analyses. The TPC analysis was performed as an additional control; although the TPC count was higher than the other microbiological analyses, the O₃ treatment presented no significant difference ($p > 0.05$). Studies reporting the O₃ treatments applied to oat-based beverage were not found in the literature, but Anam et al., (2020) reported that a 0.57 log reduction of TPC was observed after 5 min of O₃ treatment, but an increase on the microbial population occurred at 10 and 15 min. The ozone gas solubility and diffusivity in liquids is much lower than that in the gas phase, which can decrease the efficacy of O₃ treatments in liquid products (Cullen et al., 2010). The O₃ efficacy is also dependent on the composition of the food products, since the present of organic matter and acidic compounds in the medium make it difficult to predict how O₃ will react (Cullen et al., 2010).

Despite not having statistical evidence of a microbiological reduction, there was a reduction in the microorganism counts (TPC) between the control and the samples treated with O₃.

3.2.2 Physical-chemical, rheological, and color characteristics

Nutritional and sensory properties of processed foods are generally affected by decontamination or sterilization techniques, and numerous studies have reported that O₃ treatments may favorably and unfavorably affect the quality of different types of food products (Brodowska et al., 2018). Thus, the oat-based beverages were characterized regarding the protein, total soluble solids, and residual gluten contents, viscosity, and color (Table 8). These parameters were not significantly affected (p -value > 0.05) by the O₃ treatments used in the present study. The residual gluten content of the oat-based beverage was in the range of 13.2 – 15.6 mg/kg, which was lower than the values reported for the oat flour. These results could explain the lack of significant effect of O₃ treatments, as well as the dilution of oat flour used in the formulation for the manufacture of oat-based beverages. Literature reports that O₃ treatment cause no damage to amino acids and do not deteriorate protein quality (Brodowska et al., 2018), corroborating the results of the present study. The soluble solids of O₃-treated peach juice samples did not present significant difference in the soluble solids content as compared to fresh juice for processing times ranging from 1 to 5 min, but a slight significant decrease was achieved for greater ozone doses (Jaramillo-Sánchez et al., 2018), but in general ozonation of fruit juices is reported to have no effect on the soluble solids content (Cullen et al., 2010). The viscosity of samples ranged from 52.8 to 57.6 cP, complying with the acceptable viscosity values between 25.0 and 75.0 cP. Although higher viscosity values can prevent phase separation of oat-based beverages, the physical appearance of viscous product is not suitable as a thin beverage expected for plant-based beverages (Patra et al., 2022).

Color parameters L*, a*, b* for the control and O₃-treated oat-beverage samples is presented in Table 8. The O₃ treatments had no significant ($p > 0.05$) effect on color parameters of the samples, differently from the observed for O₃-treated fruit juices. Jaramillo-Sánchez et al., (2018) observed that the changes occurred in the L* and a* parameters reflected a slight increasing in browning in ozonized juices, which is an oxidative reaction caused by the oxidation of phenols (Cullen et al., 2010).

Table 8: Effect of O₃ treatment in microbiological, physic-chemical and color analysis in of oat-based beverage, 2²- factorial design.

	TREATMENT							Control
	1	2	3	4	5	6	7	
O ₃ (mg/L)	20 (-1)	20 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	40 (0)	40 (0)	40 (0)	-
Time (min)	15 (-1)	45 (+1)	15 (-1)	45 (+1)	30 (0)	30 (0)	30 (0)	-
Microbiology (CFU/mL)								
Total plate count	3.0 × 10 ² a	3.4 × 10 ³ a	2.3 × 10 ² a	1.6 × 10 ² a	1.7 × 10 ² a	5.8 × 10 ² a	1.9 × 10 ² a	1.0 × 10 ³ a
Yeast and mold	3.6 × 10 ¹	<10	<10	<10	<10	1.0 × 10 ¹	<10	6.0 × 10 ¹
<i>Enterobacteriaceae</i>	<10	1.4 × 10 ¹	<10	<10	<10	1.0 × 10 ¹	<10	<10
<i>Bacillus cereus</i>	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Salmonella</i> (in 25 mL)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Physic-chemical & rheology								
Gluten (mg/kg)	14.2 a	14.6 a	15.0 a	15.6 a	13.6 a	13.2 a	14.3 a	15.3 a
Protein (%)	4.2 a	4.0 a	4.1 a	4.0 a	4.3 a	4.3 a	4.2 a	4.5 a
Total soluble solids (%)	33.1 a	33.1 a	33.2 a	32.7 a	33.1 a	33.2 a	33.1 a	33.0 a
Viscosity (cP)	52.8 a	56.4 a	54.0 a	54.0 a	57.6 a	57.6 a	54.0 a	54.0 a
Color								
L*	69.8 a	68.3 a	70.8 a	70.8 a	70.3 a	68.5 a	68.9 a	70.8 a
a*	1.9 a	1.7 a	2.6 a	2.6 a	2.4 a	2.9 a	2.0 a	2.2 a
b*	23.6 a	22.9 a	25.0 a	24.3 a	24.2 a	23.3 a	23.2 a	24.2 a

Different letters in the same line mean significant difference at 95% confidence level.

Limits for *Salmonella* (absent in 25 g), *Bacillus cereus* ($\leq 5.0 \times 10^2$ CFU/g), *Enterobacteriaceae* ($\leq 1.0 \times 10^2$ CFU/g), and yeast and mold ($\leq 1.0 \times 10^2$ CFU/g) (IN n° 161/2022, Brasil – Item 12, letter ‘e’). Analysis was done in duplicate. ND: Non-detected

4 CONCLUSION

Low contamination in original crude oat dry-flour prior the O₃ treatment - infectious bacterial indicators - *Salmonella*, *Bacillus cereus* & *Enterobacteriaceae*, Total Plate TPC and yeast & molds count, as well as the mycotoxins (AFL, ZEN & DON) can assure the adequacy of safety from early starting step in oat-based perishable liquid processing system. The O₃-treatment could reduce 10% of DON even in oat flour contaminated at level lower than Brazilian MRL. The glyphosate level was higher than MRL, and O₃ treatment reduced in 21% limit (from 460.1 to 363.3 µg/kg), although it was still above the recommended value. The O₃-treated oat-based beverages in this experimental study non-affected the physical-chemical, rheological and color characteristics of the final product. Summarizing, the data indicated the promising potential of O₃ approach at initial dry-stage of crude oat material, mainly targeted on decreasing microbial load without affecting the nutritional and sensory characteristics. Nevertheless, the real operational condition should be optimized to reach the acceptable levels which enables equilibrium between decontamination technique and non-releasing of hazardous O₃ oxidizing sub-products.

REFERENCES

- Afsah-Hejri, L., Hajeb, P., Ehsani, R.J., 2020. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19, 1777–1808. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12594>.
- Anam, C., Perwitasari, A.A., Jannah, H.N., Yaqin, N., Yulianto, E., Sasmita, E., Restiwijaya, M., Kinandana, A.W., Aryanto, F., Nur, M., 2020. Effect of ozone treatment on microbiological and physicochemical properties of soymilk beverage. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 443. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/443/1/012100>
- Brera, C., Peduto, A., Debegnach, F., Pannunzi, E., Prantera, E., Gregori, E., De Giacomo, M., De Santis, B., 2013. Study of the influence of the milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. *Food Control* 32, 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.005>
- Brodowska, A.J., Nowak, A., Śmigielski, K., 2018. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 2176–2201. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1308313>
- Castells, M., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2005. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review. *Food Addit. Contam.* 22, 150–157. <https://doi.org/10.1080/02652030500037969>
- Cullen, P.J., Valdramidis, V.P., Tiwari, B.K., Patil, S., Bourke, P., O'Donnell, C.P., 2010.

Ozone processing for food preservation: An overview on fruit juice treatments. *Ozone Sci. Eng.* 32, 166–179. <https://doi.org/10.1080/01919511003785361>

Dwarakan, C.T., Rayner, E.T., Mann, G.E., Dollear, F.G., 1968. Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 93–95.

EFSA, 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 754, 755, 757, 801, 1465, 2934) and maintenance or achievement of a normal body weight (ID 820, 823) pursuant . *EFSA J.* 7, 1–18. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1254>

El-Desouky, T.A., Sharoba, A.M.A., El-Desouky, A.I., El-Mansy, H.A., 2012. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B1 and *Aspergillus Flavus* fungal. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 02, 1–6. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000128>

Feng, D., Soric, A., Boutin, O., 2020. Treatment technologies and degradation pathways of glyphosate: A critical review. *Sci. Total Environ.* 742, 140559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140559>

Giménez, I., Herrera, M., Escobar, J., Ferruz, E., Lorán, S., Herrera, A., Ariño, A., 2013. Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled germ during wheat milling and analysis of toxin levels in wheat germ and wheat germ oil. *Food Control* 34, 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.033>

Hahn, J.D., Chung, T.K., Baker, D.H., 1990. Nutritive value of oat flour and oat bran. *J. Anim. Sci.* 68, 4253–4260. <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/1990.68124253x>

Hu, J., Li, X., Jing, Y., Hu, X., Ma, Z., Liu, R., Song, G., Zhang, D., 2020. Effect of gaseous ozone treatment on the microbial and physicochemical properties of buckwheat-based composite flour and shelf-life extension of fresh noodles. *J. Cereal Sci.* 95, 103055. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103055>

Ikeura, H., Kobayashi, F., Tamaki, M., 2011. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. *J. Hazard. Mater.* 186, 956–959. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.094>

Jaramillo-Sánchez, G.M., Garcia Loredó, A.B., Gómez, P.L., Alzamora, S.M., 2018. Ozone Processing of Peach Juice: Impact on Physicochemical Parameters, Color, and Viscosity. *Ozone Sci. Eng.* 40, 305–312. <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1417111>

Juan, C., Ritieni, A., Mañes, J., 2012. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 134, 2389–2397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.051>

Kabak, B., 2009. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *J. Sci. Food Agric.* 89, 549–554. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>

Kieffer, R., Schurer, F., Köhler, P., Wieser, H., 2007. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. *J. Cereal Sci.* 45, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.09.008>

Jaramillo-Sánchez, G.M., Garcia Loredó, A.B., Gómez, P.L., Alzamora, S.M., 2018. Ozone.

- Lee, M.J., Kim, M.J., Kwak, H.S., Lim, S.T., Kim, S.S., 2017. Effects of ozone treatment on physicochemical properties of Korean wheat flour. *Food Sci. Biotechnol.* 26, 435–440. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0059-5>
- Levinskaitė, L., Vaičekauskytė, V., 2022. Control of fungi isolated from cereals: variations in the susceptibility of fungal species to essential oils, ozone, and UV-C. *Int. J. Food Sci. Technol.* 57, 6389–6398. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15944>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. *Microorganisms* 5, 1–35. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>
- Lluis, P., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., Monir, M., 2001. Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. *Plant Dis.* 85, 632–638. <https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.6.632>
- Lynch, H., Johnston, C., Wharton, C., 2018. Plant-based diets: Considerations for environmental impact, protein quality, and exercise performance. *Nutrients* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu10121841>
- Mao, H., Xu, M., Ji, J., Zhou, M., Li, H., Wen, Y., Wang, J., Sun, B., 2022. The utilization of oat for the production of wholegrain foods: Processing technology and products. *Food Front.* 3, 28–45. <https://doi.org/10.1002/fft2.120>
- Martínez-Padilla, E., Li, K., Frandsen, H.B., Joehnke, M.S., Vargas-Bello-Pérez, E., Petersen, I.L., 2020. In vitro protein digestibility and fatty acid profile of commercial plant-based milk alternatives. *Foods* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods9121784>
- Mei, J., Liu, G., Huang, X., Ding, W., 2016. Effects of ozone treatment on medium hard wheat (*Triticum aestivum* L.) flour quality and performance in steamed bread making. *CYTA - J. Food* 14, 449–456. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1133714>
- Menon, R., Gonzalez, T., Ferruzzi, M., Jackson, E., Winderl, D., Watson, J., 2016. Chapter one. Oats - from farm to fork, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, pp. 1–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2015.12.001>
- Mir, S.A., Dar, B.N., Shah, M.A., Sofi, S.A., Hamdani, A.M., Oliveira, C.A.F., Hashemi Moosavi, M., Mousavi Khaneghah, A., Sant’Ana, A.S., 2021. Application of new technologies in decontamination of mycotoxins in cereal grains: Challenges, and perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 148, 111976. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111976>
- Moretto, L., Tonolo, F., Folda, A., Scalcon, V., Bindoli, A., Bellamio, M., Feller, E., Rigobello, M.P., 2021. Comparative analysis of the antioxidant capacity and lipid and protein oxidation of soy and oats beverages. *Food Prod. Process. Nutr.* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00046-6>
- Obadi, M., Zhu, K.X., Peng, W., Sulieman, A.A., Mohammed, K., Zhou, H.M., 2018. Effects of ozone treatment on the physicochemical and functional properties of whole grain flour. *J. Cereal Sci.* 81, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.04.008>
- Patra, T., Axel, C., Rinnan, Å., Olsen, K., 2022. The physicochemical stability of oat-based drinks. *J. Cereal Sci.* 104, 103422. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103422>

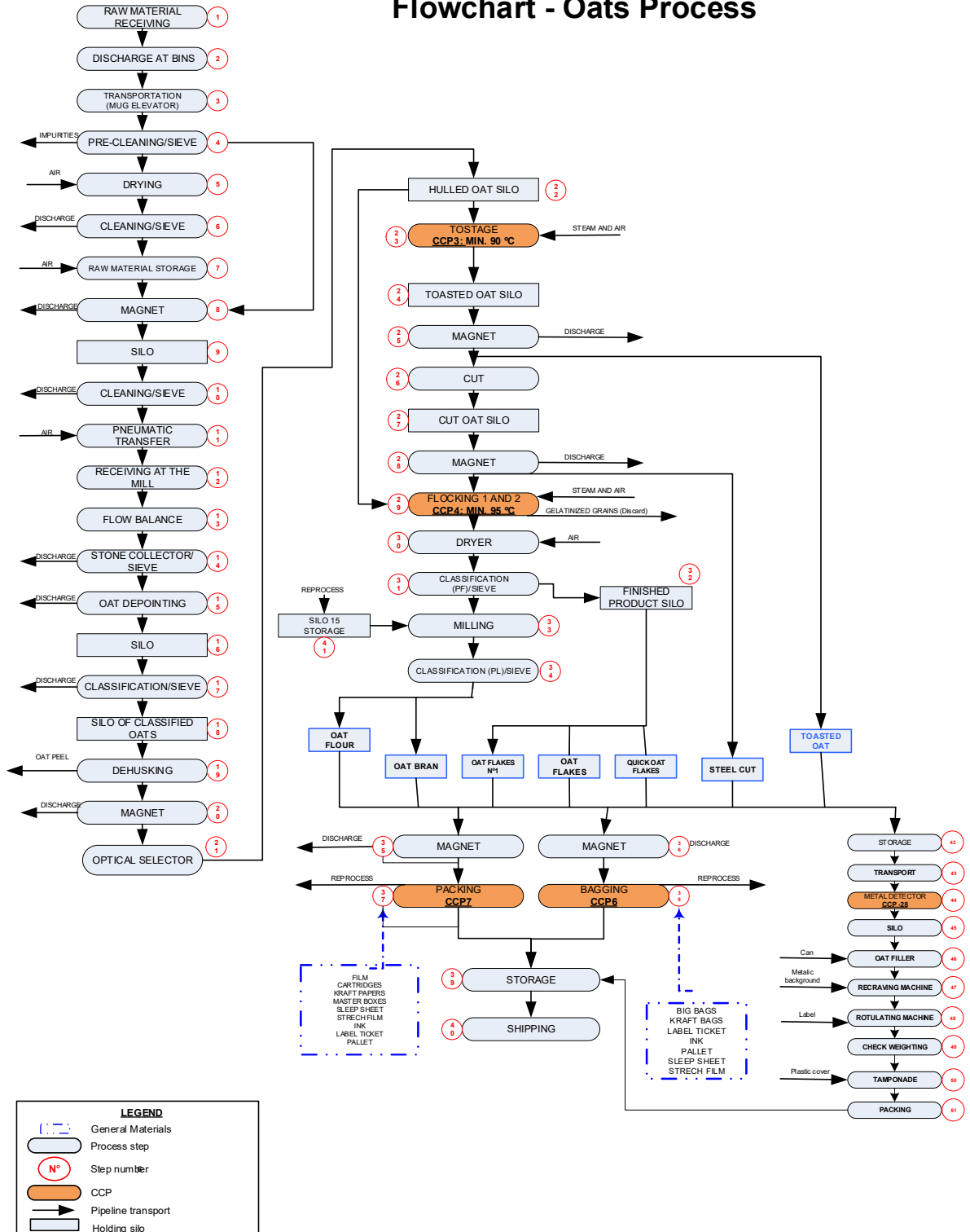
- Pleadin, J., Sokolović, M., Perši, N., Zadavec, M., Jaki, V., Vulić, A., 2012. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control* 28, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.047>
- Roohi, S., Azizi, I.G., Hashemi, M., 2012. Fumonisin contamination based on flour quality used in bakeries and confectioneries in Qaemshahr (city of the Northern Iran). *African J. Microbiol. Res.* 6, 1815–1818. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.1392>
- Sethi, S., Tyagi, S.K., Anurag, R.K., 2016. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *J. Food Sci. Technol.* 53, 3408–3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>
- Sivaranjani, S., Prasath, V.A., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Mousavi Khaneghah, A., 2021. Recent advances in applications of ozone in the cereal industry. *Lwt* 146, 111412. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111412>
- Tibola, C.S., Fernandes, J.M.C., Guarienti, E.M., Nicolau, M., 2015. Distribution of *Fusarium* mycotoxins in wheat milling process. *Food Control* 53, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.012>
- Wang, L., Luo, Y., Luo, X., Wang, R., Li, Yongfu, Li, Yanan, Shao, H., Chen, Z., 2016a. Effect of deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains. *Food Control* 66, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.038>
- Wang, L., Shao, H., Luo, X., Wang, R., Li, Yongfu, Li, Yanan, Luo, Y., Chen, Z., 2016b. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and wheat quality. *PLoS One* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147613>
- Wang, S., Wang, J., Wang, T., Li, C., Wu, Z., 2019. Effects of ozone treatment on pesticide residues in food: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 54, 301–312. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13938>
- White, S.D., Murphy, P.T., Leandro, L.F., Bern, C.J., Beattie, S.E., van Leeuwen, J.H., 2013. Mycoflora of high-moisture maize treated with ozone. *J. Stored Prod. Res.* 55, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2013.08.006>
- Young, J.C., 1986. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated corn by chemical and physical treatment. *J. Agric. Food Chem.* 34, 465–467.
- Young, J.C., Subryan, L.M., Potts, D., McLaren, M.E., Gobran, F.H., 1986. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. *J. Agric. Food Chem.* 34, 461–465
- Zaied, C., Zouaoui, N., Bacha, H., Abid, S., 2012. Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. *Food Control* 28, 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.015>
- Zhang, H., Wang, B., 2014. Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during wheat milling and Chinese steamed bread processing. *Food Control* 44, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.037>
- Zhu, F., 2018. Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chem.* 264, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.047>

Zhuang, K., Zhang, C., Zhang, W., Xu, W., Tao, Q., Wang, G., Wang, Y., Ding, W., 2020. Effect of different ozone treatments on the degradation of deoxynivalenol and flour quality in Fusarium-contaminated wheat. *CYTA - J. Food* 18, 776–784.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1849406>

SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1: Oat processing lowchart

Flowchart - Oats Process



S2: ANOVA – TPC analysis**Analysis of Variance**

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Blocos	5	49852083	9970417	29,91	0,033
Error	2	666667	333333		
Total	7	50518750			

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Blocos	N	Mean	Grouping
6	1	8900	A
5	3	2133	B
4	1	1700	B
3	1	1200	B
1	1	900,0	B
2	1	600,0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

S3: ANOVA – Yeast and moulds analysis**Analysis of Variance**

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Blocos	5	2927883	585577	17567,30	0,000
Error	2	67	33		
Total	7	2927950			

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Blocos	N	Mean	Grouping
6	1	2000	A
1	1	230,0	B
4	1	200,0	B
5	3	186,67	B
2	1	120,0	C
3	1	110,0	C

Means that do not share a letter are significantly different.

4 CONCLUSÃO GERAL

O monitoramento de contaminantes em grãos de aveia demonstrou que o nível de concentração de micotoxinas (DON, ZEA e AFL) está abaixo do limite da legislação brasileira, enquanto a contaminação por glifosato apresentou 11% de resultados acima do limite da legislação brasileira. O glifosato tem sido utilizado nas lavouras para controle de ervas daninhas e dessecação, o que vem despertando preocupações em relação ao residual encontrado em cereais. Portanto, o monitoramento rigoroso, a aplicação de boas práticas agrícolas ao longo da cadeia produtiva e o estabelecimento de sistema de controle tem sido importante para mitigar os resíduos de contaminantes nos grãos de aveia. Mais pesquisas são sugeridas com intuito de avaliar o residual de glifosato agregado em cereais após a colheita.

Em relação a aplicação de ozônio em diferentes tempos e concentrações, pode-se verificar que os resultados microbiológicos (*Salmonella*, *Bacillus cereus* e *Enterobacteriaceae*) das amostras de farinha de aveia não foram significativamente influenciados, enquanto para análise de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras houve redução de 1 log após tratamento com O₃. Para as análises de micotoxinas foi possível observar uma redução de 10% no nível de contaminação de DON e 21% de redução dos níveis de resíduos de glifosato, quando comparado a amostra controle. Esses resultados demonstram o potencial dos tratamentos com O₃ para reduzir os níveis de contaminação das amostras de farinha de aveia, mas as condições operacionais precisam ser otimizadas para atingir maiores níveis de descontaminação.

Para bebida vegetal a base de aveia o tratamento com O₃ não apresentou diferença significativa na redução de microrganismos, entretanto, foi possível observar redução nas contagens microbiológicas de aeróbios mesófilos. De uma maneira geral, pode-se observar que o tratamento com O₃ possui maior efetividade em amostras com maiores níveis de contaminação microbiológica, enquanto que para amostras com menor incidência de contaminação estaticamente não houve diferenças significativas, no entanto, houve redução da carga microbiana. As condições experimentais dos tratamentos com O₃ utilizados no presente estudo não afetaram as características físico-químicas, reológicas e de cor das amostras, possibilitando assim o uso desta técnica para redução da contaminação nas amostras sem afetar as características físico-químicas do produto.

A aplicação de ozônio demonstrou ser promissora para essas matrizes, no entanto, estudos são recomendados para continuidade de avaliação de diferentes interações

entre o tempo e concentração de O₃ que demonstrem resultados em diferentes níveis de contaminação

CONSIDERAÇÕES FUTURAS

As proteínas da aveia são compostas por prolaminas (aveninas) e gluteninas, com isso, originalmente a aveia não contém glúten. No entanto, a mesma é classificada como um cereal que contém glúten devido a contaminação cruzada que pode ocorrer na cadeia de fornecimento de cereais de inverno (trigo, cevada, centeio), envolvendo o campo (plantio de diferentes culturas na mesma fazenda ou fazendas vizinhas), colheita (compartilhamento de máquinas), transporte, e unidades/empresas de recebimento e processamento de cereais, na qual compartilham as mesmas linhas de processamento com outros cereais que contém glúten. Um consolidado programa de gestão de fornecedores e procedimento de limpeza nas unidades processadoras precisam ser implantados para evitar a contaminação cruzada e garantir que não haja presença de glúten na aveia. Conforme constatação nesse estudo, a aplicação do ozônio não interferiu no percentual de proteínas, bem como, não houve redução na concentração de glúten da farinha de aveia e bebida vegetal a base de aveia. Apesar do tratamento com ozônio não ter sido efetivo para redução do contaminante glúten (aplicado para mercado de produtos *glúten free*), o mesmo demonstrou estabilidade na estrutura proteica tornando-se um ponto positivo em relação a manutenção da reologia e composição do produto, como também, diminuindo a probabilidade de desnaturação proteica, alteração dos grupos proteicos e solubilidade. Teoricamente, se esses resultados fossem replicados para os demais cereais (ex. trigo), o tratamento com ozônio não afetaria a rede do glúten, formada por gliadina e glutenina, responsáveis pelas características de extensibilidade e elasticidade, respectivamente.

Os lipídios possuem probabilidade de formação de compostos oxidantes após exposição com ozônio, podendo formar compostos volatéis relacionados a oxidação lipídica. Isso pode variar muito de cada matriz, como também da concentração de lipídios presente nos alimentos, podendo causar alteração no *shelf life*, bem como alteração nas características sensoriais (odor e sabor). A aveia, possui baixa quantidade de lipídios, podendo variar de 4% á 8% dependendo da cultivar.

Após finalização do trabalho, contatou-se a oportunidade de mais pesquisas serem efetuadas sobre interação do ozônio em alimentos. Segue abaixo algumas das possibilidades a serem estudadas:

1. Análise de formação de subprodutos;
2. Efetuar análise de composição dos lipídios antes e após exposição com ozônio, com intuito de verificar formação de compostos oxidantes e validação das características sensoriais;

3. Efetuar análise de fibra alimentar e fibras solúveis (B-glucana), a fim de verificar se o tratamento com ozônio possui alguma interação na oxidação de polissacarídeos da parede celular;
4. Efetuar avaliação da gelatinização do amido da farinha de aveia, a fim de verificar se houve impacto na formação de mingau, capacidade de absorção e viscosidade;
5. Submeter os tratamentos com ozônio, aumentando as variáveis de tempo e concentração, a fim de avaliar maiores níveis de descontaminação, assim como verificação das possíveis alterações e interações das características físico-químicas, reológicas e sensoriais.
6. Inclusão de mais fatores, como temperatura nos testes de aplicação com ozônio, com intuito de verificar se essa variável apresentaria interação com as diferentes concentrações de ozônio;
7. Utilização de análise estatística voltada para resultados microbiológicos, com intuito de otimização dos resultados alcançados;
8. Expandir aplicação de ozônio para outros cereais de inverno, como trigo, cevada e centeio avaliando a redução de contaminantes x manutenção das características reológicas;
9. Efetuar análise sensorial com painelistas treinados na respectiva matriz, com intuito de avaliar a possibilidade de alterações das características sensoriais como sabor, odor e textura após exposição com ozônio.
10. Avaliar se houve interação no tempo de *shelf life* dos produtos, após exposição com ozônio.
11. Efetuar estudo mais abrangente no campo, com intuito de avaliar as concentrações de glifosato em diferentes etapas do plantio, assim como em diferentes regiões/posições do campo/fazenda;

REFERÊNCIAS

- AIDOO, H. et al. Development and characterization of dehydrated peanut–cowpea milk powder for use as a dairy milk substitute in chocolate manufacture. *Food Research International*, Ghana, n° 43, p. 79-85, 2010.
- ARIÑO, A. Distribution of deoxynivalenol and zearalenone in milled germ during wheat milling and analysis of toxin levels in wheat germ and wheat germ oil. *Food Control*, v.34, p.268–273, 2013.
- ALMEIDA, E; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Química Nova*, v. 27, n.5, p. 818-824, 2004.
- ALWI, N. A; ALI, A. Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. *Food Control*, v.46, p.304–311, 2014.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química nova*, v. 25, p. 589-593, 2002.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* v. 103, p. 993-1000, 2002.
- ANDERSSON, A. A. M. et al. Chemical composition and microstructure of two naked waxy barleys. *Journal of Cereal Science*, v. 30, p.183–191, 1999.
- ANKER-NILSSEN, K. et al. Influence of growth temperature on content, viscosity and relative molecular weight of water-soluble β -glucans in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Cereal Science*, v. 48, p. 670-677, 2008.
- ANTONISSEN, G. et al. The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins*, v.6, p.430–452, 2014.
- ARENHARDT, L. G. et al. A contribuição do favorecimento do ano agrícola sobre a eficiência de uso de nitrogênio na produtividade de grãos de aveia e estratégias de melhorias na recomendação. In: XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio grande do Sul. Relatório técnico-científico. Ijuí: 2016
- ARMOR, J.N. Striving for catalytically green processes in the 21 st century. *Applied Catalysis A: General*, v. 189, n.2, p. 153-162, 1999.
- AYDIN A.; UGUR, G.; DEMIREL, S. Total aflatoxin, aflatoxin B1 and ochratoxin A levels in Turkish wheat flour. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.16, n.1, p.48-53, 2008.
- BAIK, B.K; ULLRICH, S.E. Barley for food: characteristics, improvement and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, n. 2, v.48.p. 233-242. 2008.
- BAYER, A. P. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE EXTRATOS VEGETAIS ELABORADOS A PARTIR DE DIFERENTES. 2019. 56 p. Monografia (Bacharelado em Nutrição) – Escola de Nutrição – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

- BENITO-ROMÁN, O; ALONSO, E; LUCAS, S. Optimization of the b-glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, v. 53, p. 271-276. 2011.
- BENNETT, J. W; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n.3, p. 497-516, 2003.
- BERRY, P. M et al . Understanding and reducing lodging in cereals. *Adv. Agron.* 84:217-271, 2004.
- BLAZNIK, U. et al. Consumption of fruits and vegetables and probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate pesticides of schoolchildren in Slovenia. *Public Health Nutrition*, v.20, p.1–7, 2015.
- BOERGER, A. *Investigaciones Agronomicas*. Montevideo: A. Bamiro & Ramos, 1943. v. 3, 1943.
- BORÉM, A; MIRANDA, G. V. *Melhoramento e plantas*. 6. ed. rev. e ampl. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Agrotóxicos: Autoridades trocam experiências sobre regulação. Brasília, 10 de março de 2009. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/100309_1.htm
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC 119 de 19/05/2003. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/119_03rdc.htm
- BRASIL. *Legislação Federal de Agrotóxicos e afim*. Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetaal, 1998.
- BRASIL. Ministério do Trabalho e do Emprego. NR 15 - Atividades e Operações Insalubres, Portaria GM nº 3.214, de 08 de junho de 1978, Diário Oficial da União. 06.07, Brasília/DF, 1978.
- BRAUN, B. M. *Microbiological Contamination: Risk Prevention in Infusion Therapy*, 2011.
- BRENNAN, C.S. Dietary fiber, glycemic response and diabetes. *Mol Nutr Food Res*. v.49, n.6, p.560-70, 2005.
- BRERA, C. et al. Study of the influence of the milling process on the distribution of deoxynivalenol content from the caryopsis to cooked pasta. *Food Control*, v.32, p.309–312, 2013.
- BUTT, M. S et al. Oat: unique among the cereals. *European Journal of Nutrition*, v. 47, n.2, p. 68-79. 2008.

- CABALLERO, P. A; GÓMEZ, M; ROSELL, C. M. Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *European Food Research and Technology*, v.224, p.525–534, 2007.
- CAJKA, T. et al. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruitbased baby food using programmed temperature vaporiser injection– low-pressure gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1186, n.1-2, p. 281- 294, 2008.
- CAMARGO, M. S. Utilização de glifosato na produção de silagem emurhecida de *Brachiaria brizantha*, Stapf. cv. Xaraés. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CARDOZO, T. M; SCHUCH, L. O. B; ROSENTHAL, M. A. Efeito do retardamento da colheita sobre a qualidade fisiológica de sementes de aveiabranca (*Avena sativa* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 24, n. 1, p. 331-338. 2002.
- CARLINS, J. J; CLARK, R. G. Ozone generation by corona discharge in Rice R G and Netzer A. *Handbook of ozone technology and applications*, Vol 1. Ann Arbor, MI, Ann Arbor Science, 41–76, 1982.
- CARVALHO, W. T et al. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE EXTRATOS DE ARROZ INTEGRAL, QUIRERA DE ARROZ E SOJA. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, [s.l.], v. 41, n. 3, p.422-429, 6 jul. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.5216/pat.v41i3.9885>.
- CAST. Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxins: risk in plant and animal systems*. In Task Force Report 139. Cast: Ames, IA, 199p. 2003.
- CASTELLS, M. et al. J. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review. *Food Additives and Contaminants*, v.22, p.150–157, 2005.
- CATALANI, A. L. et al. Fibras alimentares. *Rev Bras Nutr Clin* v.18, n.4, p.178-82, 2003
- CAVALLERO, A. et al. High (1→3,1→4)- β -Glucan Barley Fractions in Bread Making and their Effects on Human Glycemic Response. *Journal of Cereal Science*, v. 36, p. 59–66, 2002
- CFR Code of Federal Regulations. Air contaminants. Title 13, part 1910. Washington, D.C.: Office of Federal Register, 1997.
- CHANDALIA, M. Dietary treatment of Diabetes Mellitus. *New Engl J Med* v.342, n.19, p.1392-98, 2000.
- CHAWLA, A.S et al. *Microbial decontamination of food using ozone*. The Ohio State University, USA. Woodhead Publishing Limited, 2012.
- CHELI, F. et al. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control*, v.37, p.315-325, 2014.
- CHIU, Y. H. et al. Fruit and vegetable intake and their pesticide residues in relation to semen quality among men from a fertility clinic. *Human Reproduction*, v.30, p.1342–1351, 2015.

- CLEMENS, R; VAN KLINKEN, B. J, W. Oats, more than just a whole grain: an introduction. *British journal of nutrition*, v. 112, n. S2, p. S1-S3, 2014.
- CODEX ALIMENTARIUS. Proposed draft revision of the code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 26, 2014.
- COELHO, C. C. S. et al. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.19, n.4, p.369-375, 2015.
- COFFMAN, F. A. 1977. Oat history, identification and classification. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1516. U.S. Gov. Printing Off., Washington, DC
- COFFMAN, F. A. Oats and oats improvement. Madison: American Society of Agronomy. p. 650, 1961.
- COHEN, M. Environmental toxins and health-the health impact of pesticides. *Australian family physician*, v. 36, n.12, p. 1002-1004, 2007.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Companhia nacional de abastecimento. Brasília: Conab. 5 2018.
- CULLEN, P. J. et al. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. *Trends in Food Science and Technology*, v. 20, n.3-4, p. 125-136, 2009.
- DE ANDRADE J. B.; JÚNIOR E. F.; POSSENTI R. A. (2003) Uso dos herbicidas paraquat e glifosato como dessecante no processo de ensilagem. *Boletim de Industria Animal*, 60, 23-38.
- DE MORI, C; FONTANELI, R. S; SANTOS, H.P. dos. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da aveia. Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS, p.26, 2012.
- DE, A. et al. Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles, fundamentals and applications of controlled release drug delivery, *springer briefs in molecular science*. Springer India, New Delhi. 2014.
- DIAO, E; HOU, H; DONG, H. Ozonolysis mechanism and influencing factors of aflatoxin B1:A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 33, n.1, p. 21-26, 2013.
- DEUNER, C. et al. Desempenho fisiológico de sementes de alface tratadas com tiametoxam. *Enciclopédia Biosfera*, v.10, n.18, p.1173-1182, 2014.
- DEWAN, P et al. Organochlorine pesticide residues in maternal blood, cord blood, placenta, and breastmilk and their relation to birth size. *Chemosphere*, v. 90, n. 5, p. 1704-1710, 2013.
- DIAO, E et al. Structures of the ozonolysis products and ozonolysis pathway of aflatoxin B1 in acetonitrile solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.9364-9370, 2012.

DIAO, E.; HOU, H.; DONG, H. Ozonolysis mechanism and influencing factors of aflatoxin B1: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 33, n.1, p. 21-26, 2013.

DOS SANTOS, A. B; RABELO, R. R. Informações técnicas para a cultura do arroz irrigado no Estado do Tocantins. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008.

DREWNOWSKI, A; DARMON, N. Food choices and diet costs: an economic analysis. *J. Nutr.*, n. 135, p. 900-904, 2005.

DUBOIS, M et al. Safety of Oxygreen, an ozone treatment on wheat grains. Part 2. Is there a substantial equivalence between Oxygreen-treated wheat grains and untreated wheat grains. *Food Additives and Contaminants* 23, 1 e 15. 2006.

EFSA – European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*. Itália, v. 9, p. 1- 124, 2011.

EFSA - European Food Safety Authority. Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products. 2013.

EFSA, 2009. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 754, 755, 757, 801, 1465, 2934) and maintenance or achievement of a normal body weight (ID 820, 823) pursuant EFSA J. 7, 1–18. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1254>.

EL-MORSI, D. A; RAHMAN, R. H. A; ABOU-ARAB, A. A. K. Pesticides residues in Egyptian diabetic children: a preliminary study. *J Clinic Toxicol*, v. 2, n. 6, p. 2161-0495.1000138, 2012.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Mercado de bebidas vegetais cresce a dois dígitos no Brasil. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/com-excecao-das-de-soja-mercado-de-bebidas-vegetais-cresce-a-dois-digitos-no-brasil-211516/>>. Acesso em: 22/12/2022.

FACCIN, G. L et al. Chemical, Sensorial and Rheological Properties of a New Organic Rice Bran Beverage. *Rice Science*, v.16, n.3, p.226–234, 2009.

FAN, X et al. Effects of ultrasound combined with ozone on the degradation of organophosphorus pesticide residues on lettuce. *RSC Advances*, v.5, p.45622–45630, 2015.

FAO Drought characterization and management in Centra Asia Region and Turkey. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization. 2001. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Definitions for the Purposes of the Codex Alimentarius, 5–8.

FASOLI, E et al. Indepth proteomic analysis of non-alcoholic beverages with peptide ligand libraries. I: Almond milk and orgeat syrup. *Journal of Proteomics*, Itália, n.74, p.1080–1090, 2011.

FDA, U. United States Food and Drug Administration, Rules and Regulations, Part 173—Secondary direct food additives permitted in food for human consumption (21 CFR Part 173 Authority: 21 USC. 321, 342, 348). **Federal Register**, v. 66, p. 123, 2001.

FDA. Food and Drug Administration. Sec. Title 21. 801.415. Maximum acceptable level of ozone. Code of Federal Regulations, 8, 2014.

FEDERIZZI, L. C. et al. Melhoria da aveia. In: BOREM, A. (Ed.). Melhoria de espécies cultivadas. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 141-169.

FEDERIZZI, L. C.; ALMEIDA, J. Análise de alguns parâmetros de qualidade do grão de aveia. Em REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, p. 49-50. 1998.

FELIZIANI, E; ROMANAZZI, G; SMILANICK, J. L. Application of low concentrations of ozone during the cold storage of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, v.93, p.38–48, 2014.

FERNANDEZ-ALVAREZ, M et al. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1188, 154-163, 2008.

FLEURAT-LESSARD, F. Qualitative reasoning and integrated management of the quality of stored grain: a promising new approach. *Journal of Stored Products Research*, v.38, p.191-218, 2002.

FRANÇA-NETO, J. B. et al. TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE SEMENTES DE SOJA DE ALTA QUALIDADE. Embrapa, Documentos, n. 380, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/151223/1/Documentos-380-OL1.pdf>>, acesso em: 20/08/2022.

FRANZ, J. E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). *The herbicide glyphosate*. London: Butterworths, 1985. p. 3-17.

FREITAS-SILVA, O; VENÂNCIO, A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. *Drug Metabolism Review*, v.42, p.612–620, 2010.

GABLER, F. M. et al. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, v.55, p.85–90, 2010.

GEERING F. Ozone applications – the state-of-the-art in Switzerland. *Ozone Sci Eng*, 21(2), 187–200, 1999.

GHARIBZAHEDI, S. M. T et al. Development of an optimal formulation for oxidative stability of walnut-beverage emulsions based on gum arabic and xanthan gum using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, Irã, n. 87, p. 1611-1619, 2012.

- GIMÉNEZ, I. et al. A review of technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, v. 8, n.3-4, p. 501-551, 2004.
- GOGATE, P.R; PANDIT, A.B. A review of technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, v. 8, n.3-4, p. 501-551, 2004.
- GRAHAM, D.M. Use of ozone for food processing. *Food Technol.* 51, 72-75, 1997.
- GREENE, A. K; GUZEL-SEYDIM, Z. B; SEYDIM, A. C. Chemical and physical properties of ozone, in: O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; RICE, R.G. (Eds.), *Ozone in Food Processing*. John Wiley & Sons, p.19–32, 2012.
- GRUYS, K. J; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.
- GUTKOSKI, L.C; PEDÓ, I. Aveia: Composição química, valor nutricional e processamento. Editora Varela, São Paulo/SP, p. 191, 2000.
- GUZEL-SEYDIM, Z. B; GREENE, A. K; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, San Diego, v. 37, n.4, p. 453-460, 2004.
- HADERLIE, L. C; SLIFE, F. W; BUTLER, H.S. 14C-glyphosate absorption and translocation in maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) seeds and in soybean plants. *Weed Research*, v. 18, p. 269-273, 1978.
- HANDFORD, C. E; ELLIOTT, C. T; CAMPBELL, K. A review of the global pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v.11, n.4, p.525-536, 2015
- HANSEN, L. S; HANSEN, P; VAGN JENSEN, K. M. Effect of gaseous ozone for control of stored product pests at low and high temperature. *Journal of Stored Products Research*, v.54, p.59–63, 2013.
- HARDIN, J.A. et al. Ozone fumigation of stored grain, closed loop recirculation and the rate of ozone consumption. *Journal of Stored Products Research* 46, 149 e 154. 2010.
- HAWERROTH, M. C et al. Importância e dinâmica de caracteres na aveia produtora de grãos. 2014.
- HERRMANN K. M. (1995) The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell*, 7, 907.
- HOLLAND, J.B. et al. Genomic regions controlling vernalization and photoperiod responses in oat. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.105, p.113-126, 2002.
- HORVÁTH M, B. L; HUTTNER J. *Ozone*, Budapest, Elsevier, 1985.

HOSENEY, R. C. Principles of Cereal Science and Technology – A General Reference on Cereal Science. American Association of Cereal Chemistry, 1986.

HUSSEIN S; BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v. 167, n.2, p.101-134, 2001.

HWANG, E; CASH, J.N; ZABIK, M.J. Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 49, n.6, 3127-3132, 2001.

IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer, Geneva, 56: 489-521.

IBANOĞLU, Ş. Influence of tempering with ozonated water on the selected properties of wheat flour. *Journal of Food Engineering*, v.48, p.345–350, 2001.

IKEHATA, K. GAMAL EL-DIN M. Aqueous pesticide degradation by ozonation and ozone-based advanced oxidation processes: a review (Part I). *Ozone Science and Engineering* 27, 83-114. 2005a

IKEHATA, K; GAMAL EL-DIN, M. Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science* 5, 81- 135, 2006b.

IKEHATA, K; GAMAL EL-DIN, M. Aqueous pesticide degradation by ozonation and ozone-based advanced oxidation processes: a review (Part II). *Ozone Science and Engineering* 27, 173-202. 2005b

IKEHATA, K; NAGHASHKAR, J. N; GAMAL EL-DIN, M. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. *Ozone Science & Engineering*, v.28, p.353–414, 2006a.

IKEURA, H; HAMASAKI, S; TAMAKI, M. Effects of ozone microbubble treatment on removal of residual pesticides and quality of persimmon leaves. *Food Chemistry* 138, 366-71. 2013.

IKEURA, H; KOBAYASHI, F; TAMAKI, M. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. *Journal of Hazardous Materials*, v.186, p.956-959, 2011.

ISIKBER, A. A; ATHANASSIOU, G, C. The use of ozone gas for the control of insects and micro-organisms in stored products. *Journal of Stored Products Research*. Elsevier, 2014.

ISIKBER, A.A; OZTEKIN, S. Comparison of susceptibility of two stored product insects, *Ephestia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. *J. Stored Prod. Res.* 45, 159 e 164, 2009.

ISO 7932. Microbiology of food and animal feedings stuffs - Horizontal method for enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony count technique at 30°C, 2004.

- IZYDORCZYK, M.S; DEXTER, J.E. Barley b-glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. *Food Research International*, v. 41, p. 850–868, 2008.
- JIN, X. et al. Genetic variants of HvGlb1 in Tibetan annual wild barley and cultivated barley and their correlation with malt quality. *Journal of Cereal Science*, v. 53, p. 59-64, 2011.
- JUAN, C; RITIENI, A; MANES, J. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v.134, n.4, p.2389-2397, 2012.
- KABAK, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.89, n.4, p.549-554, 2009.
- KAUSHIK, G; SATYA, S; NAIK, S. N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review. *Food Research International*, v.42, p.26–40, 2009.
- KELLS, S.A. et al. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *Journal of Stored Products Research* 37, 371 e 382. 2001.
- KHADRE, M. A; YOUSEF, A. E; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science*, v. 66, n.9, p. 1242-1252, 2001.
- KHER, S. V. et al. Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains: a cross-national study. *International Journal of Consumer Study*, v.37, p.73–83, 2013.
- KIM, J.G; YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *Journal of Food Science*, v. 65, n.3, p. 521-528, 2000.
- KOVALCZUK, T. et al. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, v. 25, n.4, p. 444-457, 2008.
- KUNZ, A; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento efluentes têxteis. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- KUSVURAN, E. et al. Removal of chloropyrifos ethyl, tetradifon and chlorothalonil pesticide residues from citrus by using ozone. *Journal of Hazardous Materials*. 241-242, 287-300, 2012.
- KYING, M; ALI, A. Postharvest biology and technology antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, v.100, p.113–119, 2015.
- LÂNGARO, N. C; CARVALHO, I. Q. Indicações Técnicas para a Cultura da Aveia. XXXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia. Editora UPF. Universidade de Passo Fundo/RS, 2014.

LANGLAIS, B; RECKHOW, D. A; BRINK, D. R. Ozone in Water Treatment. Application and Engineering. Lewis Publishers, Chelsea: Michigan, p.592, 1991.

LARSEN, J.C. et al. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: Summary report. Toxicology Letters, v. 1, n.1, p. 22, 2004.

LAZARIDOU. A. et al. Composition and molecular structure of polysaccharides released from barley endosperm cell walls by sequential extraction with water, malt enzymes, and alkali. Journal of Cereal Science, v. 48, p. 304-318, 2008.

LÁZZARI, F. A. Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade das Sementes, Grãos e Rações. Curitiba, 1993.

LI, M. M; GUAN, E. Q; BIAN, K. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and quality evaluation of ozonised wheat. Food Additives and Contaminants, v.32, p.544–553, 2014.

LIMBERGER-BAYER, V. M. et al. Barley b-glucans extraction and partial characterization. Food Chemistry, v, 154, p. 84–89, 2014.

LIU, Y; PAN, X; LI, J. Current agricultural practices threaten future global food production. Journal of Agricultural Environmental Ethics, v.28, p.203–216, 2015.

LIU, Z; GAO, J; YU, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. Journal of Stored Products Research, v. 42, n.4, p. 468–479, 2006.

LLORENS, A. et al. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. From Spanish crops. International Journal of Food Microbiology, v. 94, n.1, p. 43-54, 2004.

LOMBARD, M. J. Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: What do we know? Annals of Nutrition and Metabolism, v.64, p.42–52, 2014.

LORINI, I. Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados. Passo Fundo, Embrapa Trigo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 72 p.2008.

LOZOWICKA, B. et al. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. Food and Chemical Toxicology 64, 238-248. 2014.

LUO, X et al. Effect of ozone treatment on aflatoxin B1 and safety evaluation of ozonized corn. Food Control, v.37, p.171–176, 2014a.

LUO, X et al. Detoxification of aflatoxin in corn flour by ozone. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.94, p.2253–2258, 2014b.

MACEDO, F. R. A. S. Desenvolvimento de bases vegetais e suas aplicações. 2021. Tese de Doutorado.

- MÄKINEN, O. E. et al. Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 3, p. 339–349, 2016.
- MALIK, A. K; BLASCO, C; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p.4018–4040, 2010.
- MALKKI, Y; VIRTANEN, E. 2001. Gastrointestinal effects of oat bran and oat gum—A review. *Lebensm. Wiss. Technol.* 34:337-347.
- MALZEW, A. I. The genus *Eu-avena*. *Bull. Appl. Bot., Suppl.*, v. 38, 1930.
- MARGNI, M. et al. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 93, n.1-3, p. 379-392, 2002.
- MARROQUÍN-CARDONA, A. G. et al. Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food Chemical Toxicology*, v.69, p.220-230, 2014
- MATEO, J. J; MATEO, R; JIMÉNEZ, M. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 72, n.1-2, p. 115-123, 2002.
- MCCLEMENTS, D. J; NEWMAN, E; MCCLEMENTS, I. F. Plant- based milks: A review of the science underpinning their design, fabrication, and performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 18, n. 6, p. 2047-2067, 2019.
- MCCLURKIN, J. D; MAIER, D. E; ILELEJI, K. E. Half-life time of ozone as a function of air movement and conditions in a sealed container. *Journal of Stored Product Research*, v.55, p.41–47, 2013.
- MCKENZIE, K.S. et al. Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. *Poultry Science*, v. 77, n.8, p. 1094-1102, 1998.
- MCKENZIE, K.S. et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, v. 35, n. 8, p.807-820, 1997.
- MENDEZ, F. et al. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *Journal of Stored Products Research*, v.39, p.33–44, 2003.
- MILLER, S. S; FULCHER, R. G. Microstructure and Chemistry of the oat kernel. 2011. Cap. 5, pag 77 Em WEBSTER, F. H; WOOD, P. J. *Oats Chemistry and Technology*, Second Edition AACC International, 2011
- MISHRA, S. et al. Deoxynivalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 279, n.2, p. 186-197, 2014.
- MISHRA, S. PhD Dissertation: Assessment of dermal toxic potential of Deoxynivalenol - A mycotoxin. Banaras Hindu University, Varanasi, India, 2013.

MOHAMMADI KOUCHEFAHANI, M et al. Antifungal effects of ozonated water on *Aspergillus parasiticus*: A new approach to prevent wheat contamination. *Journal of Food Safety*, v.35, n.3, p.295-302, 2015.

MORRISON, O. Amigos, não inimigos: o crescimento baseado em vegetais pode 'andar de mãos dadas' com laticínios. Disponível em:<
<https://www.dairyreporter.com/Article/2022/06/10/friends-not-foes-plant-based-growth-can-go-hand-in-hand-with-dairy>>. Acesso em: 23/12/2022.

MOSS, M.O. Mycotoxin review-2. *Fusarium*. *Mycologist*. v. 16, p. 158-161, 2002.

MOSTAFALOU, S; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.268, p.157–177, 2013.

MOSTAFALOU, S; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.268, p.157–177, 2013.

MURPHY, P. A et al. *J. Food Sci.* 2006, 71, 51.

MYOZONE: Geradores de Ozônio. Disponível em:
<https://www.myozone.com.br/produto/m10i/>. Acesso dia 22/01/23

NAITO, S; TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. *Ozone: Science and Engineering*, v. 28, n.6, p. 425-429, 2006.

O'DONNELL, C. et al. Status and trends of ozone in processing, in: O'DONNELL, C., TIWARI, B.K., CULLEN, P.J., RICE, R.G. (Eds.), *Ozone in Food Processing*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p. 312. 2012.

OLIVEIRA, A. R. V; NASCIMENTO, L. P. C. *Manual: Asma*. Universidade Católica de Brasília (SIBI/UCB), Brasil, p. 1-88, 2018

ONG, K.C. et al. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chemistry*, v. 55, n.2, p. 153-160, 1996.

ONO, E. Y.S et al. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. *J. Econ. Entomol.* 105, 1107 e 1114, 2012.

ONU– Organização das Nações Unidas. *População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU*, 2019.

OPIT, G.P. et al. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. *J. Econ. Entomol.* 105, 1107 e 1114, 2012.

ORMAD, M. P. et al. Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere*, v. 71, n. 1, p. 97-106, 2008.

- PALOU, L. et al. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 24, n.1, p. 39-48, 2002.
- PARRÓN, T. et al. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicology Letters*, v.230, p.157–165, 2014.
- PATIL, S. et al. Safety and quality assessment during the ozonation of cloudy apple juice. *Journal of Food Science*, v.75, p.437–443, 2010.
- PAUL, A. A; SOUTHGATE, D. A. T. 1978. McCance and Widdowson's *The Composition of Foods*, 4th ed. Her Majesty's Stationery Office, London.
- PEREZ, A.G. et al. Effect of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 47, n.4, p. 1652–1656, 1999.
- PESTKA, J.J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, v. 84, n. 9, p. 663-679, 2010.
- PESTKA, J.J; A.T. SMOLINSKI. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, v. 8, n.1, p. 39-69, 2005.
- PETERSON, D.M; HAHN, M.J; EMMONS, C.L. Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro. *Food Chemistry*. v.79, n.4 ,p.473–478. 2002.
- PHILLIPS, T.W; THRONE, J.E. Biorational approaches to managing stored product insects. *Annual. Rev. Entomol.* 55, p.375 e 397, 2010.
- PLEADIN, J et al. Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*, v.28, n.1, p.94-8, 2012.
- PRATA, F. Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. 2002. 149 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002
- PUBCHEM. Chemistry Data Base. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 05/09/2022.
- PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Disponível em:< <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>>. Acesso em 14/01/2023.
- RAJHATHY, T; THOMAS, H. Genetic control of chromosome pairing in hexaploid oats. *Nat. New Biol.* 239:217-219, 1974.
- RECHE, M et al. The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, Espanha, v. 21, p. 577-585, 2010.

REDDY, K.R. N. Estimation and prevention of aflatoxin contamination in rice. Ph.D. dissertation, Osmania University, Hyderabad, India, 2008.

RESTAINO, L. et al. Efficacy of ozonated water against various food related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n.9, p. 3471-3475, 1995.

ROCHA, E. B. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, v.36, p.159–165, 2014.

RÖDER, M; VIETHS, S; HOLZHAUSER, T. Sensitive and specific detection of potentially allergenic almond (*Prunus dulcis*) in complex food matrices by Taqman® realtime polymerase chain reaction in comparison to commercially available protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta*, Alemanha, n. 685, p.74–83, 2011.

RODRIGUES, R. S. Caracterização de extratos de soja obtidos de grãos, farinha integral e isolado protéico visando à formulação e avaliação biológica (em coelhos) de bebida funcional à base de soja e polpa de pêssego. 2003. 177p. Tese. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ROMERO-GONZÁLEZ, Roberto. Food safety: how analytical chemists ensure it. *Analytical Methods*, v. 7, n. 17, p. 7193-7201, 2015.

ROOHI, S; AZIZI, I. G; HASHEMI, M. Fumonisin contamination based on flour quality used in bakeries and confectioneries in Qaemshahr (city of the Northern Iran). *African Journal of Microbiology Research*, v.6, n.1, p.1815-1818, 2012.

RUYCK, K. et al. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research*, v.766, p.32-41, 2015.

SALVADORI, J. R; PEREIRA, P. R. V. S. Indicações Técnicas para a Cultura da Aveia. (LÂNGARO; CARVALHO). XXXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia. Editora UPF. Universidade de Passo Fundo/RS, 2014.

SAMAR, M. et al. Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. *Food Control*, v.18, p.1295–1299, 2007.

SANDRIN, R et al. Caracterização físico-química de diferentes frações da aveia (*Avena sativa* L.) e atividade antioxidante de seus extratos. 2013

SCUSSEL, V. M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. Armazenagem de grãos. Campinas: Biogeneziz, 2002. p. 675-691.

SCUSSEL, V. M; BEBER, M; TONON, K. M. Efeitos da infecção por *Fusarium*/*Giberella* na qualidade e segurança de grãos, farinhas e produtos derivados. In: REIS, E.M. (Org). Seminário sobre *Giberella* em cereais de inverno. 1ed. Passo Fundo: Berthier, p. 131-175. 2011.

SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em Alimentos. Editora Insular; Florianópolis, 1998.

SHARMA, R.R. et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat Treatment. *Journal of Food Protection*, v. 65, n.3, p. 447–451, 2002.

SILVA, A. R. A; SILVA, M. M. N; RIBEIRO, B. D. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International*, v. 131, p. 108972, 2020.

SILVEIRA, D.S. et al. Identificação e associação de estratégias indiretas para mensurar a resistência ao acamamento em aveia-branca. 2020.

ŠKRBIĆ, B; PREDOJEVIĆ, Z. Levels of organochlorine pesticides in crops and related products from Vojvodina, Serbia: Estimated dietary intake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 54, n.4, p. 628-636, 2008.

SOUSA, A. H. et al. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. *Journal of Stored Products Research*, v.44, p.379–385, 2008.

STERNA, V; ZUTE, S; BRUNAVA, L. Composição do grão de aveia e seu benefício nutricional. *Agricultura e ciência agrícola procedia* , v. 8, p. 252-256, 2016.

STOEV, S. D. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.39, p.794–809, 2015a.

STORGARDS, E et al. 1997. Microbiology of the hydrothermal process. Page 146 in: Third Nordfood Conference: Sustainable Food Production and Competitive Industries. M. Uusisuo, Ed. Nordisk Industrial Fund, Norway.

SUBRAMANYAM, B; HAGSTRUM, D.W. Resistance measurement and management. In:

SUBRAMANYAM, B; HAGSTRUM, D.W. (Eds.), *Integrated Management of Insects in Stored Products*. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA, pp. 331 e 397, 1996.

SWEENEY, M. J; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 43, p. 141-158, 1998.

TAKAHASHI, M; CHIBA, K.; LI, P. Formation of hydroxyl radicals by collapsing ozone microbubbles under strongly acidic conditions. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.111, p.11443–6, 2007.

TAPP, C; RICE, R. G. Generation and control of ozone, in: O'DONNELL, C; TIWARI, B. K; CULLEN, P. J; RICE, R.G. (Eds.). *Ozone in Food Processing*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p. 312, 2012.

TATAPUDI, P; FENTON, J. M. Electrochemical oxidant generation for water treatment. In: SEQUEIRA, C.A.C. *Environmental Oriented Electrochemistry*. Amsterdam: Elsevier, p. 103-130. 1994.

TAVARES, M. J. C. M. S.; ZANETTINI, M. H. B.; DE CARVALHO, F. I. F. Origem e Evolucao do Genero Avena: Suas Implicacoes no Melhoramento Genetico. 1993.

TEILLIER, SEBASTIAN. Curso de botánica sistemática. Chloris chilensis: Revista chilena de flora y vegetación, Universidad Central, 2007.

TIBOLA, C. S et al. Distribution of Fusarium mycotoxins in wheat milling process. Food Control, v.53, p.91–95, 2015.

TIWARI, B.K et al. Application of ozone in grain processing. Journal of Cereal Science v.51, p.248 – 255, 2010.

TROMBETE, F. M. Micotoxinas em grãos de trigo: ocorrência, efeitos da ozonização e determinação de uma forma modificada do desoxinivalenol. Tese Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. Rio de Janeiro/RJ, 2016.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. 1999.

VALENTINE, J et al. 2003. One hundred years of progress in cereal breeding from Mendel to molecular selection - Oats. Pages 79-82 - in: From Biodiversity to Genomics: Breeding Strategies for Small Grain Cereals in the Third Millennium. C. Mare, P. Facciola, and A. M. Stanca, Eds. Proc. Eucarpia Cereal Section Meeting. Experimental Institute for Cereal Research, Rome, Italy.

VELLOSO, C.B.O; FEDERIZZI, L.C. Delimitação preliminar da cadeia da aveia branca para consumo humano no Brasil. Em reunião da comissão brasileira de pesquisa de aveia. Resultados Experimentais. Pelotas: EMBRAPA/UFPeL, p.181- 183. 2000.

VENTURINI, F. W. G. (2010). Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia. São Paulo Blücher.

WADE, A; MAUNSELL, C. 2004. Assessing the impact of improved crop management on naked oat quality for poultry production: Part of avian feed efficiency from naked oats (AFENO). Res. Rep. 337. Home Grown Cereals Authority, London.

WARNER, T. et al. Hexachlorocyclohexanes and endosulfans in urban, rural, and high altitude air samples in the Fraser Valley, British Columbia: evidence for trans-Pacific transport. Environmental Science & Technology 39, 724-731. 2005.

WCBBC - WORKERS' COMPENSATION BOARD OF BRITISH COLUMBIA. Library and Archives Canada Cataloguing in Publication Data. Ozone safe work practices. WCBBC, 2006.

WEBSTER, F. Oats: chemistry and technology. Academic Press. p. 16, 2016.

WEBSTER, F. H.; WOOD, P. J. Oats Chemistry and Technology, Second Edition AACC International. 2011.

WEIDENBONER, M.; KUNZ, B. 1994. Contamination of different muesli components by fungi. Mycol. Res. 98-583-586.

WELCH, R. W. 1995. The chemical composition of oats. Pages 279-320 in: *The Oat Crop: Production and Utilization*. W. Welch, Ed. Chapman and Hall, London.

WELCH, R. W; MCCONNELL, J. M. Oats. *Cereals and cereal products: chemistry and technology*. Vyd, v. 2, p. 367-390, 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global Strategy for Food Safety: safer food for better health*. Food Safety Programme. Geneva, 2006.

WIJNANDS, L.M.; VAN LEUSDEN, F. M. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and biossays for their detection. RIVM report 257852 004, Bilthoven, 2000.

WU, J. G et al. Efficacy evaluation of low-concentration of ozonated water in removal of residual diazinon, parathion, methylparathion and cypermethrin on vegetable. *Journal of Food Engineering*, v.79, p.803–809, 2007.

WU, J. G. et al. Efficacy evaluation of low-concentration of ozonated water in removal of residual diazinon, parathion, methyl-parathion and cypermethrin on vegetable. *Journal of Food Engineering*, v.79, p.803–809, 2007.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, v.53, n.10, p. 58–61, 1999.

YAMAGUCHI, Y. Environmental and food hygiene approach to pesticide. *Seilatsu Eisei* 50, 283-290. 2006.

YANNICCARI, M et al. (2012) Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *lolium perenne* l. Biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 210-217.

YAZAR, S; OMURTAG, G. Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, v.9, p.2062–2090, 2008.

YUSA, V. et al. Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 891, p. 15-31, 2015.

ZAIED, C et al. Natural occurrence of citrinin in Tunisian wheat grains. *Food Control*, v.28, n.1, p.106-109, 2012. ZHANG, H.; WANG, B. Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during wheat milling and Chinese steamed bread processing. *Food Control*, v.44, p.86–91, 2014.

ZHANG, H; WANG, B. Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during wheat milling and Chinese steamed bread processing. *Food Control*, v.44, p.86–91, 2014.