



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

OZONIZAÇÃO EM MEIO AQUOSO DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K): CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO, POTENCIAL NA INATIVAÇÃO DE *Aspergillus flavus* E ALTERAÇÕES QUALITATIVAS

WALLAS FELIPPE DE SOUZA FERREIRA

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF
MAIO/2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

OZONIZAÇÃO EM MEIO AQUOSO DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K): CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO, POTENCIAL NA INATIVAÇÃO DE *Aspergillus flavus* E ALTERAÇÕES QUALITATIVAS

WALLAS FELIPPE DE SOUZA FERREIRA

ORIENTADOR: DR. ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR
COORIENTADOR: LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO:

BRASÍLIA-DF
MAIO/2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

OZONIZAÇÃO EM MEIO AQUOSO DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K): CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO, POTENCIAL NA INATIVAÇÃO DE *Aspergillus flavus* E ALTERAÇÕES QUALITATIVAS

WALLAS FELIPPE DE SOUZA FERREIRA

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

APROVADA POR:

**ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR, Dr. / UnB-UFV /
ernandesalencar@unb.br / Orientador**

**MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA, Dra. / UnB /
mcrr2005@hotmail.com / Examinador Interno**

**STHER MARIA LENZA GRECO, Dra. / IFB /
2487765@etfbsb.edu.br / Examinador Externo**

**SILVIA DE CARVALHO CAMPOS BOTELHO, Dra. / EMBRAPA
AGROSSILVIPASTORIL /
silvia.campos@embrapa.br / Examinador Externo**

BRASÍLIA-DF, 31 de Maio de 2022

FICHA CARTOGRÁFICA

Felippe de Souza Ferreira, Wallas

Ozonização em meio aquoso de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K): Cinética de decomposição, potencial na inativação de *Aspergillus flavus* e alterações qualitativas. / Wallas Felipe de Souza Ferreira; Orientador Ernandes Rodrigues de Alencar. — Brasília, 2022.

123 p.

Tese (Doutorado — Doutorado em Agronomia) — Universidade de Brasília, 2022.

1. Ozonização. 2. Inativação de fungos. 3. Castanha-do-Brasil. 4. Mudanças qualitativas. 5. Aflatoxinas. I. Alencar, Ernandes Rodrigues, orient. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Ferreira, W. F. S. **Ozonização em meio aquoso de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K): Cinética de decomposição, potencial na inativação de *Aspergillus flavus* e alterações qualitativas.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 123 p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: WALLAS FELIPPE DE SOUZA FERREIRA

TÍTULO DA TESE: Ozonização em meio aquoso de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K): Cinética de decomposição, potencial na inativação de *Aspergillus flavus* e alterações qualitativas.

GRAU: DOUTOR

ANO: 2022

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta Tese de Doutorado Para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta Tese de Doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Nome: Wallas Felipe de Souza Ferreira

E-mail: wallasfelippe@gmail.com

Dedico

Ao meu pai Eguimar Ferreira, ao meu sogro José Valci e ao amigo Gleison Maxwell (In memoriam).

“Ao invés de procurarmos uma explicação para tudo, devemos buscar o conhecimento, o saber, e admitir os fatos que não compreendemos e, assim, abrimo-nos para a realidade. O verdadeiro trato do ser humano com a realidade consiste na sua aceitação e não no domínio intelectual das situações.”

COF 84

“A literatura permite-nos usar a experiência alheia, e com ela conseguimos antecipar muitas situações e reconhecer outras em que nos encontramos. Teremos, assim, uma ideia do que devemos fazer e dos riscos envolvidos em certas ações ou omissões. À medida que vamos acumulando leituras, vamos conhecendo a variedade de existências humanas possíveis e adquirimos os meios para expressar o que quer que se passe dentro de nós. Desta forma, atingimos a transparência que assinala a maturidade. Isto quer dizer que só existe maturidade dentro de uma certa maturidade intelectual”.

COF 87

“A recompensa de uma obra é tê-la feito; a recompensa do esforço é ter crescido”.

A. D. Sertillanges

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho, pela fé e coragem proporcionadas para vencer todos os obstáculos.

À minha noiva, Isabele Caroline, por sempre estar presente, pela ajuda em diversos experimentos deste trabalho, por compartilhar seus sonhos ao meu lado, por ser minha melhor amiga e por sempre me dar forças para continuar e nunca desistir.

Aos meus familiares, minha mãe Aparecida do Carmo e meu irmão William Felipe, pelo apoio e pela compreensão em todos os momentos.

À memória do meu pai, Eguimar Ferreira, do meu sogro José Valci e do amigo Gleison Maxwell, que tanto me ensinaram com a presença de suas vidas.

Aos amigos Marcio Mendonça, Jaqueline Lamounier e Erich Brandani, pelo companheirismo, por dividirem o conhecimento, pela ajuda nos trabalhos acadêmicos, por acreditarem em mim e pelo incentivo prestado.

Ao professor Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar, pelas oportunidades e por confiar responsabilidades que ajudaram no meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum e à professora Dra. Márcia Ferreira, por toda ajuda e apoio oferecidos.

Aqueles que ajudaram na realização deste trabalho técnicos dos laboratórios da Universidade de Brasília, estudantes de graduação, pós-graduação e orientandos dos professores Ernandes Alencar e Marcio Mendonça.

À Universidade de Brasília (UnB), Programa de pós-graduação em agronomia pelo apoio institucional e por todos os seus professores que compartilharam de alguma forma seus conhecimentos e amizade.

À Universidade de Brasília (UnB), Programa de pós-graduação em agronomia pelo apoio institucional e por todos os seus professores que compartilharam conhecimentos e conselhos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos, ao CNPq e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que fizeram parte desta etapa da minha vida, aos amigos e familiares:

Muito obrigado!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Castanha-do-Brasil.....	4
2.1.1 Aspectos botânicos.....	4
2.1.2 Composição nutricional.....	5
2.1.3 Distribuição geográfica e produção.....	9
2.1.4 Cadeia produtiva da castanha-do-Brasil.....	12
2.1.5 Aspectos qualitativos da castanha-do-Brasil	18
2.2 Fungos e Micotoxinas.....	19
2.2.1 Identificação e caracterização molecular de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	21
2.2.2 Aflatoxinas	25
2.2.3 Metodologia de detecção de aflatoxinas em alimentos.....	30
2.2.4 Contaminação da castanha-do-Brasil por fungos e Aflatoxinas.....	31
2.3 Ozônio	33
2.3.1 Histórico.....	33
2.3.2 Propriedades físico-químicas do Ozônio	36
2.3.3 Características do Ozônio em meio aquoso	37
2.3.4 Segurança do Trabalho na aplicação do Ozônio	39
2.4 Ozônio no armazenamento de castanha-do-Brasil	40
3. OBJETIVO GERAL.....	45
3.1 Objetivos específicos.....	45
3.2 Hipóteses	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 ETAPA I: Caracterização molecular de uma espécie de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	46
4.1.1 Isolamento do isolado fúngico.....	46

4.1.2	Microscopia Óptica do Isolado	47
4.1.3	Armazenamento do Isolado	47
4.1.4	Extração do DNA genômico.....	47
4.1.5	Amplificação e purificação do DNA.....	48
4.1.6	Análises filogenéticas	49
4.2	ETAPA II: Ozonização de castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K) em meio aquoso em diferentes níveis de pH: Decomposição do Ozônio, Inativação de <i>Aspergillus flavus</i> e Efeitos na Cor da Castanha e no Perfil Lipídico do Óleo Bruto	53
4.2.1	Obtenção do gás ozônio	53
4.2.2	Processo de ozonização da água.....	54
4.2.3	Análise da decomposição do gás ozônio em meio aquoso na ausência e na presença de castanha-do-Brasil.....	54
4.2.4	Determinação do pH da água ozonizada.....	55
4.2.5	Determinação da condutividade elétrica da água	55
4.2.6	Eficácia da água ozonizada em inativar <i>A. flavus</i> em castanha-do-Brasil	56
4.2.7	Efeitos na cor da Castanha-do-Brasil submetidas à ozonização em meio aquoso	56
4.2.8	Determinação do perfil lipídico do óleo extraído de castanha-do-Brasil submetidas à ozonização em meio aquoso.....	57
4.3	ETAPA III: Ozonização de castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K) em meio aquoso em diferentes pH's: Inativação de <i>Aspergillus flavus</i>, Efeitos na Cor da Castanha e na Qualidade do Óleo Bruto	58
4.3.1	Obtenção do gás ozônio	58
4.3.2	Processo de ozonização da água.....	58
4.3.3	Determinação do pH da água	59
4.3.4	Avaliação do efeito fungicida do processo de ozonização em água de <i>A. flavus</i> inoculado em castanha-do-Brasil.....	59
4.3.5	Análises qualitativas das castanhas-do-Brasil ozonizadas	60
4.3.6	Efeitos na cor da Castanha-do-Brasil submetidas à ozonização em meio aquoso	61
4.4	ETAPA IV: Testes preliminares do efeito fungicida e da capacidade da água ozonizada em degradar aflatoxinas	61

4.5	Delineamento Experimental	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	ETAPA I: Caracterização molecular e filogenética do isolado <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	63
5.2	ETAPA II: Ozonização de castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K) em meio aquoso em diferentes níveis de pH: Decomposição do Ozônio, Inativação de <i>Aspergillus flavus</i> e Efeitos na Cor da Castanha e no Perfil Lipídico do Óleo Bruto	67
5.2.1	Decomposição do ozônio em meio aquoso contendo castanha-do-Brasil	67
5.2.2	Água ozonizada na inativação de <i>A. flavus</i> inoculado em castanha-do-Brasil	70
5.2.3	Qualidade da castanha-do-Brasil ozonizada em meio aquoso	72
5.3	ETAPA III: Ozonização de castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K) em meio aquoso em diferentes pH's: Inativação de <i>Aspergillus flavus</i> , Efeitos na Cor da Castanha e na Qualidade do Óleo Bruto	75
5.3.1	Avaliação da água ozonizada na inativação de <i>A. flavus</i> inoculado em castanha-do-Brasil	75
5.3.2	Qualidade da castanha-do-Brasil ozonizada em meio aquoso	80
5.4	ETAPA IV: Testes preliminares do efeito fungicida e da capacidade da água ozonizada em degradar aflatoxinas	82
6.	CONCLUSÃO	84
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXO I	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 — (A) Árvore de Castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K). Fonte: Lucia Wadt. (B) fruto (ouriço) sementes (C) com e sem casca (D). Fonte: Acervo pessoal.	5
Figura 2 — Produção (toneladas) de castanha-do-Brasil, no período de 1993 a 2020, conforme a produção nacional.	10
Figura 3 — Fluxograma das etapas da cadeia produtiva de castanha-do-Brasil.....	16
Figura 4 — Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil.....	17
Figura 5 — Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	26
Figura 6 — Mecanismo de formação do Ozônio (O ₃) a partir de moléculas de Oxigênio (O ₂) e o ângulo de formação em um dos híbridos de ressonância do ozônio.	36
Figura 7 — Reação de como o ozônio pode agir em relação a outros compostos (R) em solução aquosa.	38
Figura 8 — Isolado de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> em meio de cultura seletivo AFPA, (A) parte superior da placa e (B) parte inferior da placa, classificado como CCUB1405 em 2018, proveniente de amendoim coletado no Distrito Federal.....	47
Figura 9 — (a) Gerador de ozônio Modelo O&L 5.0 RM; (b) Representação esquemática do princípio de geração do gás ozônio baseada no método DBD (Descarga por Barreira Dielétrica).	53
Figura 10 — Ozonização de 200 g de castanha-do-Brasil em meio aquoso com diferentes pHs por 120 min, a 25 °C, para realização das análises de decomposição do gás ozônio.	55
Figura 11 — Esquema da ozonização da castanha-do-Brasil na concentração de entrada de 21,0 mg L ⁻¹ , vazão de 1,0 L min ⁻¹ e a 25 °C, para 120 min e 240 min....	60
Figura 12 — Microscopia óptica da (A) esporulação do isolado em meio de cultura AFPA e (B) aspectos morfológicos do conidióforo; (C) esporulação em castanha-do-	

Brasil no meio de cultura BDA do isolado (CCUB1405) de <i>Aspergillus</i> seção Flavi proveniente de amendoim coletado no Distrito Federal em 2018.....	63
Figura 13 — Árvore filogenética com sequências da região gênica β -tubulina (BenA), obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior está indicada acima dos nós. Probabilidades posteriores inferiores a 95% foram retiradas da árvore. A árvore foi enraizada com <i>Aspergillus brunneouniseriatus</i> . O isolado (CCUB1405) em estudo está destacado em vermelho.	64
Figura 14 — Árvore filogenética com sequências da região gênica LSU rDNA, obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior está indicada acima dos nós. O isolado (CCUB1405) do estudo está destacado em vermelho.	65
Figura 15 — Curvas de regressão do modelo cinético de segunda ordem referente a decomposição do ozônio ajustadas aos dados de concentração residual em meio aquoso na presença de castanha-do-Brasil em diferentes pHs em função do tempo (X) na temperatura de 25 °C.....	69
Figura 16 — Contagem de esporos e conídios viáveis log (UFC g ⁻¹) de <i>Aspergillus flavus</i> (CCUB1405) inoculados em castanha-do-Brasil e submetidos por 120 min a 25 °C aos tratamentos: Controle (não ozonizado); ADNO — Água Destilada Não Ozonizada em diferentes valores de pH; ADO — Água Destilada Ozonizada (13 mg L ⁻¹) em diferentes valores de pH.	71
Figura 17 — Contagem de esporos e conídios viáveis log (UFC g ⁻¹) de <i>Aspergillus flavus</i> (CCUB1405) inoculados em castanha-do-Brasil e submetidos por 120 min a 25 °C aos tratamentos: Controle (não ozonizado); ADNO — Água Destilada Não Ozonizada em diferentes valores de pH; ADO — Água Destilada Ozonizada (21 mg L ⁻¹) em diferentes valores de pH.	76
Figura 18 — Contagem de esporos e conídios viáveis log (UFC g ⁻¹) de <i>Aspergillus flavus</i> (CCUB1405) inoculados em castanha-do-Brasil e submetidos por 240 min a 25 °C aos tratamentos: Controle (não ozonizado); ADNO — Água Destilada Não Ozonizada em diferentes valores de pH; ADO — Água Destilada Ozonizada (21 mg L ⁻¹) em diferentes valores de pH.	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 — Composição nutricional de castanha-do-Brasil in natura. Resultados expressos em 100 g de amostra integral.....	7
Tabela 2 — Composição em ácidos graxos (%) do óleo extraído de castanha-do-Brasil	8
Tabela 3 — Parâmetros para qualidade de óleo de castanha-do-Brasil.	9
Tabela 4 — Produção (toneladas) de castanha-do-Brasil, em diferentes anos no período de 2001 a 2020, conforme a produção nacional e Unidades da Federação	11
Tabela 5 — Morfologia, produção de extrólitos e identificação molecular de espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	23
Tabela 6 — Limites Máximos Tolerados para aflatoxinas em alimentos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)....	28
Tabela 7 — Limites Máximos Tolerados para aflatoxinas em alimentos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)....	29
Tabela 8 — História da aplicação e regulação do ozônio.....	35
Tabela 9 – Diferentes agentes oxidantes e os respectivos potenciais de oxidação .	37
Tabela 10 – Solubilidade do gás ozônio em meio aquoso de acordo com a temperatura	38
Tabela 11 – Referência dos Níveis de Exposição para Ozônio.....	40
Tabela 12 — Lista de iniciadores utilizados para amplificação de diferentes regiões gênicas do isolado de <i>Aspergillus</i> spp.....	48
Tabela 13 — Números de acesso do GenBank das sequências de DNA de <i>Aspergillus</i> spp. utilizados nas análises filogenéticas.	51
Tabela 14 — Modelo de cinética de decomposição de segunda ordem e respectiva equação integrada e linearizada e respectiva meia-vida.....	55

Tabela 15 — Concentração residual de ozônio (mg L^{-1}) em água sem a presença de castanha-do-Brasil na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	68
Tabela 16 — Potencial redox (mV) e condutividade elétrica (CE, $\mu\text{S cm}^{-1}$) de água com diferentes níveis de pH antes e depois da ozonização na concentração de entrada de $13,0\text{ mg L}^{-1}$, vazão de $1,0\text{ L min}^{-1}$ e a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 120 min, na ausência e na presença de castanha-do-Brasil.....	68
Tabela 17 — Equações de regressão do modelo cinético de segunda ordem referente a decomposição do ozônio ajustadas aos dados de concentração residual em meio aquoso na presença de castanha-do-Brasil em diferentes pHs em função do tempo (X) na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	70
Tabela 18 — Perfil lipídico do óleo bruto e coloração das castanhas-do-Brasil sem tratamento e submetida à água ozonizada na concentração de 13 mg L^{-1} por 120 min em diferentes valores de pH na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	74
Tabela 19 — Valores de pH antes e depois da ozonização de $1,0\text{ L}$ de água contendo castanha-do-Brasil (200g) e concentração residual de ozônio após ozonização com concentração de entrada de 21 mg L^{-1} por 240 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	75
Tabela 20 — Qualidade do óleo bruto: ácidos graxos livres e índice de peróxido, extraído das castanhas-do-Brasil submetidas à água ozonizada na concentração de entrada de 21 mg L^{-1} por 240 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	80
Tabela 21 — Coloração das castanhas-do-Brasil, Saturação (C), Tonalidade (h°) e Diferença de cor (ΔE) sem tratamento e submetida à água ozonizada na concentração de 21 mg L^{-1} por 240 min em diferentes níveis de pH na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	82
Tabela 22 — Água ozonizada (21 mg L^{-1}) na inativação de <i>A. flavus</i> (contagem Log UFC g^{-1}) e na degradação de aflatoxina B1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	83

RESUMO

A castanha-do-Brasil pode sofrer diversos tipos de contaminações ao longo de sua cadeia produtiva e, devido às ótimas condições de temperatura e umidade relativa do ar das regiões produtoras, pode ocorrer o desenvolvimento de fungos filamentosos, como *Aspergillus* seção *Flavi* — que pode produzir aflatoxinas. Grandes perdas anuais da castanha-do-Brasil ocorrem devido à alta incidência de infecção por fungos produtores de aflatoxinas. Vários procedimentos têm sido propostos com o intuito de minimizar a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas e levam em consideração estratégias de descontaminação e detoxificação. A utilização da ozonização como técnica no controle de qualidade de produtos armazenados tem sido objeto de inúmeros estudos, inclusive como agente fungicida e para degradar aflatoxinas. O ozônio atua como agente fungicida, tanto na forma gasosa, como em meio aquoso, sendo capaz de oxidar constituintes da membrana plasmática e do conteúdo celular, devido ao seu elevado potencial oxidativo. Além do elevado potencial oxidativo, o ozônio se caracteriza pelo tempo de meia vida relativamente curto. Nesse sentido, é necessário que se avalie o efeito dessa técnica de conservação na qualidade microbiológica e físico-química em diversas matérias-primas, tendo em vista a diversidade das características de cada produto. Então, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do gás ozônio dissolvido na água em diferentes combinações de pH, concentração e período de exposição no controle de *Aspergillus* seção *Flavi*, caracterização molecular e filogenética deste fungo, na cinética de decomposição do ozônio em meio aquoso, além de possíveis alterações na qualidade de castanha-do-Brasil. O trabalho foi realizado nos Laboratórios da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), no Departamento de Fitopatologia, localizados na Universidade de Brasília (UnB), e no Laboratório de Fitoquímica da Embrapa Agrossilvipastoril, em Sinop-MT. Foi utilizado lote de castanha-do-Brasil descascada com teor de umidade de 4,3% (Safrá 2018/19). Realizou-se a caracterização molecular e filogenética de um isolado de *Aspergillus* seção *Flavi* classificado como CCUB1405. Utilizaram-se amostras de 1,0 L de água destilada e esterilizada, com pH igual a 7,1 e água com pH 3,0 e 8,1, modificadas com ácido cítrico e bicarbonato, respectivamente. Amostras de 200 g inoculadas com o isolado fúngico identificado como *A. flavus* foram submetidas à água ozonizada na concentração de 13 mg L⁻¹ por 120 min, e na concentração de 21 mg L⁻¹ por 120 e 240 min. Na caracterização molecular e filogenética deste isolado, utilizou-se as

regiões gênicas de β -tubulina (BenA), ITS e LSU rDNA. Por inferência Bayesiana, o isolado apresentou 97% dentro do grupo de *Aspergillus flavus* para região gênica β -tubulina e 85% para o mesmo grupo na região LSU rDNA. Ao utilizar água ozonizada na concentração de 13 mg L⁻¹ em diferentes níveis de pH por 120 min, observou-se uma redução mais acentuada nos níveis de ozônio ao utilizar pH 3,0, no qual a meia-vida foi de 16,14 min. Por sua vez, em pH 7,1 e 8,1, os valores de meia-vida foram iguais a 37,42 e 188,54 min, respectivamente. Em todas as etapas para avaliar a eficiência da água ozonizada na inativação de *A. flavus* inoculado em castanha-do-Brasil houve diferença significativa ($p < 0,05$). Ao utilizar água ozonizada na concentração de entrada de 13 mg L⁻¹ por 120 min as maiores reduções aconteceram ao utilizar água com pH 7,1 e 3,0, com redução de 1,25 e 1,28 ciclos log, respectivamente. As reduções mais expressivas aconteceram quando se utilizou água ozonizada, independente do pH, na concentração de 21 mg L⁻¹ por 240 min, obtendo-se reduções de até 3 ciclos log. O tratamento com água ozonizada não afetou o perfil lipídico e a qualidade do óleo bruto, mas apresentou um incremento na saturação da cor das amêndoas. Os resultados indicam que a ozonização possui potencial para ser incorporada como etapa para controle de fungos em castanha-do-Brasil.

PALAVRAS-CHAVE

Ozônio; fungos aflatoxigênicos; descontaminação; alterações qualitativas.

ABSTRACT

The Brazil nuts can suffer various types of contamination along its production chain and, due to the optimal temperature and humidity conditions in the producing regions, the development of filamentous fungi, such as *Aspergillus* section *Flavi* — that can produce aflatoxins. Large annual losses of Brazil nut occur due to the high incidence of infection by aflatoxin-producing fungi. Several procedures have been proposed with the aim of minimizing the ingestion of foods contaminated by aflatoxins and considering decontamination and detoxification strategies. The use of ozonation as an alternative technique in the quality control of stored products has been the subject of numerous studies, including as a fungicidal agent and to degrade aflatoxins. Ozone acts as a fungicidal agent, both in the gaseous form and in the aqueous medium, being able to oxidize constituents of the plasma membrane and cell contents, due to its high oxidative potential. In addition to the high oxidative potential, ozone has a relatively short half-life. In this sense, it is necessary to evaluate the effect of this conservation technique on the microbiological and physical-chemical quality of several raw materials, in view of the diversity between the characteristics of each product. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of ozone gas dissolved in water at different combinations of pH, concentration, and exposure period on the control of *Aspergillus* section *Flavi*, molecular and phylogenetic characterization of this fungus, and on the decomposition kinetics of ozone in aqueous medium, as well as possible changes in the quality of Brazil nuts. The work was carried out in the Laboratories of the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine (FAV), in the Department of Phytopathology, located at the University of Brasília (UnB), and in the Phytochemistry Laboratory of Embrapa Agrossilvipastoril, in Sinop-MT. A batch of peeled Brazil nuts with a moisture content of 4.3% was used (2018/19 harvest). The molecular and phylogenetic characterization of an isolate of *Aspergillus* section *Flavi* classified as CCUB1405 was carried out. Samples of 1.0 L of distilled and sterilized water, with pH equal to 7.1 and water with pH 3.0 and 8.1, modified with citric acid and bicarbonate, respectively, were used. Samples of 200 g inoculated with the fungal isolate identified as *A. flavus* were subjected to ozonated water at a concentration of 13 mg L⁻¹ for 120 min, and at a concentration of 21 mg L⁻¹ for 120 and 240 min. In the molecular and phylogenetic characterization of this isolate, the gene regions of β -tubulin (BenA), ITS and LSU rDNA were used. By Bayesian inference, the isolate presented 97% within the *Aspergillus flavus* group for the β -tubulin gene region and

85% for the same group in the LSU rDNA region. When using ozonated water at a concentration of 13 mg L^{-1} at different pH levels for 120 min, a more pronounced reduction in ozone levels was observed when using pH 3.0, in which the half-life was 16.14 min. In turn, at pH 7.1 and 8.1, the half-life values were equal to 37.42 and 188.54 min, respectively. In all steps to evaluate the efficiency of ozonated water in the inactivation of *A. flavus* inoculated in Brazil nuts there was a significant difference ($p < 0.05$). When using ozonated water at the inlet concentration of 13 mg L^{-1} for 120 min, the greatest reductions occurred when using water with pH 7.1 and 3.0, with a reduction of 1.25 and 1.28 log cycles, respectively. The most significant reductions occurred when ozonated water was used, regardless of pH, at a concentration of 21 mg L^{-1} for 240 min, obtaining reductions of up to 3 log cycles. The treatment with ozonated water did not affect the lipid profile and the quality of the crude oil, but it showed an increase in the color saturation of the almonds. The results indicate that ozonation has the potential to be incorporated as a step to control fungi in Brazil nuts.

KEY WORDS

Ozone; aflatoxigenic fungi; decontamination; qualitative changes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o segundo produtor mundial de castanha-do-Brasil e a região norte é responsável por 95,9% da produção nacional, com destaque para os estados do Acre, do Amazonas e do Pará (IBGE, 2022). A maior parte da produção de castanha-do-Brasil destina-se ao consumo *in natura*, porém essa matéria-prima possui uma ampla cadeia de produtos e subprodutos, sendo recomendada inclusive para extração de óleo, devido ao elevado conteúdo de lipídios, que está situado entre 60 e 70% (FREITAS *et al.*, 2007). A castanha-do-Brasil, além de ser uma oleaginosa de elevado valor energético, é rica em proteínas de importante valor biológico e muitos outros constituintes indispensáveis a uma boa alimentação, como o selênio, antioxidante que vem sendo indicado na prevenção de câncer e doenças cardiovasculares (SOUZA e MENEZES, 2004).

Devido ao modo de produção extrativista, a castanha-do-Brasil pode sofrer diversos tipos de contaminações ao longo da cadeia produtiva (ÁLVARES *et al.*, 2012), sendo que a obtenção de um produto com qualidade é de fundamental importância. Dentre os fungos que podem infectar a castanha-do-Brasil, destacam-se *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, os principais produtores de aflatoxinas. Dentre as principais aflatoxinas, destacam-se aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂) (CALDAS *et al.*, 2002; ARRUS *et al.*, 2005; MIDORIKAWA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2016).

A contaminação dos alimentos por aflatoxinas é considerada um problema mundial, porque são substâncias carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas, além de causar expressivas perdas econômicas em razão da rejeição do produto contaminado. As aflatoxinas se destacam por apresentar alta toxidez, aguda e crônica, no ser humano e em animais, podendo ocasionar danos no fígado, como cirroses e indução de tumores. A ingestão de alimentos contaminados com elevadas concentrações de aflatoxinas pode ocasionar morte, em função da toxicidade aguda da toxina (ABDULKADAR *et al.*, 2000; MURRAY *et al.*, 2006).

Diante do risco relacionado à saúde do consumidor e objetivando a aquisição de produto com qualidade nutricional e livres de contaminantes, diversos países estabeleceram limite máximo permitido para aflatoxinas, o que implicou no aumento do rigor para importação de castanha-do-Brasil. Tal exigência tem como objetivo

principal o controle de qualidade do produto, que por consequência exige maior grau de organização em todas as etapas da cadeia produtiva (COSLOVSKY, 2014). Em 2010 a União Europeia estabeleceu limites máximos de 5 e 10 ppb para aflatoxina B₁ e aflatoxinas totais em castanha-do-Brasil direcionada para consumo direto (EUROPEAN UNION, 2010). Nos Estados Unidos, o limite para aflatoxinas em castanha-do-Brasil é 20 ppb (FDA, 2018). No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Instrução Normativa N° 88, de 26 de março de 2021, estabeleceu como limite máximo 10 ppb de aflatoxinas totais (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) para castanha-do-Brasil descascada, destinada ao consumo (BRASIL, 2021). Diante desse cenário, é fundamental o controle adequado durante todas as etapas da cadeia produtiva, com o intuito de evitar a contaminação das castanhas por aflatoxinas e atender os padrões para consumo e comercialização, inclusive para exportação.

O processo de prevenção e controle dos diversos tipos de micotoxinas, dentre as quais as aflatoxinas, após mais de 50 anos da sua descoberta, ainda não apresentaram um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva (PRADO *et al.*, 2006). Dentre os diversos procedimentos propostos tem-se o tratamento com amônia, com bissulfito de sódio, adição de adsorventes e ozonização. A utilização do ozônio como alternativa no controle de aflatoxinas em alimentos tem sido objeto de inúmeros estudos, inclusive avaliando esse gás como agente fungicida e na degradação dessas substâncias (MCKENZIE *et al.*, 1997; MCKENZIE *et al.*, 1998; PRUDENTE e KING, 2002; INAN *et al.*, 2007; ALENCAR *et al.*, 2012; SAHAB *et al.*, 2013; AGRIOPOULOU *et al.*, 2016).

Outra possibilidade de aplicação do ozônio é em meio aquoso, tendo sido testado na inativação de microrganismos em produtos de origem vegetal e na inativação de micotoxinas, inclusive aflatoxinas (AGRIOPOULOU *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017; MAXIMIANO *et al.*, 2018). A cinética de decomposição de aflatoxinas em meio aquoso, em diferentes combinações de concentração e temperatura, é mais rápida nas aflatoxinas B₁ e G₁, em comparação com as aflatoxinas B₂ e G₂ (AGRIOPOULOU *et al.*, 2016). O gás ozônio é parcialmente solúvel em água e, assim como a maioria dos gases, aumenta sua solubilidade à medida que a temperatura decresce (KIM *et al.*, 1999a; WYSOK *et al.*, 2006). A solubilidade do ozônio em meio aquoso depende do conteúdo de matéria orgânica no meio, pois quanto menor a concentração de matéria orgânica, maior é o tempo de meia vida do ozônio em água (GRAHAM *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999b).

Apesar de serem encontrados na literatura diversos trabalhos com o uso de ozônio como agente antimicrobiano e na degradação de micotoxinas, há carência de relatos em que essa tecnologia seja testada em castanha-do-Brasil, quer na forma gasosa ou em meio aquoso. Ressalta-se que a castanha-do-Brasil se destaca pelo elevado teor de lipídeos, o que pode acelerar o processo de degradação do ozônio. Então, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do gás ozônio dissolvido na água em diferentes combinações de pH, concentração e período de exposição no controle de *Aspergillus* seção *Flavi* inoculado em castanha-do-Brasil, a caracterização molecular e filogenética deste fungo, e na cinética de decomposição do ozônio em meio aquoso, além de avaliar possíveis alterações na qualidade de castanha-do-Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Castanha-do-Brasil

Originária do Brasil, a árvore de castanha-do-Brasil foi descrita pela primeira vez em 1808, pelos pesquisadores Alexander von Humboldt, Bompland e posteriormente Kunth, na qual recebeu a denominação botânica de "árvore majestosa da Amazônia", devido ao seu porte e destaque do dossel entre as demais árvores da floresta e em homenagem ao químico francês Claude Louis Berthollet — *Bertholletia excelsa*; posteriormente, em homenagem aos pesquisadores, foram adicionados as iniciais de cada um ao final do nome científico: *Bertholletia excelsa* H.B.K (MENNINGER, 1977). A castanha-do-Brasil, também conhecida como castanha-do-Pará, castanha-da-terra e castanha-da-Amazônia, é um dos principais produtos de extrativismo da região da floresta amazônica — onde está concentrado o maior volume de produção no país, com milhares de extrativistas que vivem de manejo familiar e comunitário (BRASIL, 2017). Em 1961 por meio do decreto de lei nº 51.209, determinou-se a utilização de "Castanha-do-Brasil" — com perspectivas para o comércio exterior: em inglês denominada de "Brazil nut" (noz do Brasil) (BRASIL, 1961; BRASIL, 2017).

2.1.1 Aspectos botânicos

A árvore de *Bertholletia excelsa* pode atingir uma altura que varia entre 30 e 50 metros e até 5 metros de diâmetro na base do tronco — Figura 1 (a). Apresenta-se com porte frondoso e copa dominante, podendo atingir idade de até 400 anos. De acordo com Schöngart *et al.* (2015), em condições naturais, a produção de fruto das árvores se inicia entre 73 e 93 anos e a produção máxima é de até 240 anos de idade. A floração de um exemplar adulto de *Bertholletia excelsa* ocorre de acordo com as condições climáticas de cada região: no Acre a floração ocorre entre outubro e dezembro; no Pará, entre setembro e fevereiro; em Rondônia, de setembro a janeiro e nas demais regiões amazônicas de agosto a fevereiro — podendo haver variações locais. Diversas espécies de abelhas, que buscam o néctar altamente energético presente nas flores da espécie e vivem na floresta nativa, são os principais agentes polinizadores da castanha-do-Brasil (BRASIL, 2017).

A classificação botânica caracteriza-se em: Divisão: *Angiospermae*; Classe: *Dicotiledônea*; Ordem: *Myrtiflorae*; Família: *Lecythidaceae*; Gênero: *Bertholletia*; Espécie: *excelsa*. A família tem 325 tipos de árvores nos trópicos americanos, divide-se em 15 gêneros, em que o *Bertholletia* é dominante com 75 espécies. O fruto da castanheira é chamado de “ouriço”, constituindo-se uma camada de substância lenhosa; é uma cápsula (pixídio) globosa deprimida, quase esférica, de 08 a 16 cm de diâmetro — Figura 2 (b). A casca do fruto é grossa, lenhosa, dura, de cor marrom, repleta de células resinosas. Podem pesar entre 0,5 e 5 kg e conter de 10 a 25 sementes, angulosas, agudas, mais ou menos triangulares, transversalmente rugosas, estreitamente comprimidas — Figura 2 (b) (BRASIL, 2002; PACHECO, 2007; BRASIL, 2017).

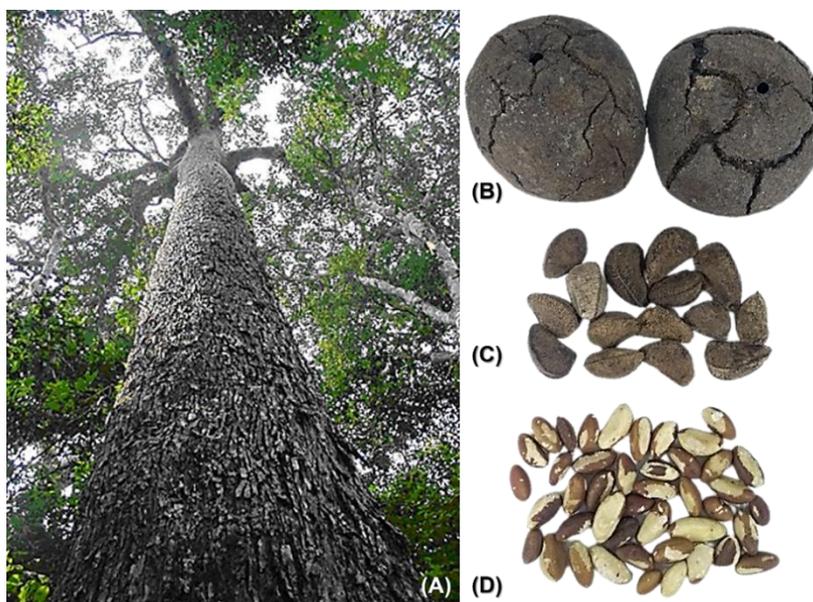


Figura 1 — (A) Árvore de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Fonte: Lucia Wadt. (B) fruto (ouriço) sementes (C) com e sem casca (D). Fonte: Acervo pessoal.

2.1.2 Composição nutricional

O produto mais importante da *Bertholletia excelsa* são suas castanhas, que podem ser consumidas tanto “*in natura*” ou misturada com outros alimentos, além de ser bastante apreciado não só pelo seu sabor, como também pelas suas qualidades nutritivas. Sua composição é uma rica fonte nutricional, popularmente chamada de “carne vegetal”, por ser um alimento energético, rico em proteínas e valorizado pela presença de antioxidantes; é amplamente utilizado na indústria alimentícia, como na produção de extração de óleo, farinha desengordurada, mingaus, biscoitos,

suplementos proteicos, leites, bebidas dietéticas, e, principalmente, na indústria confeitaria (COZZOLINO, 2001; FREITAS *et al.*, 2007; PACHECO, 2007; MARTINS *et al.*, 2008).

O valor nutricional de castanha-do-Brasil é reconhecido pela sua rica composição entre 60 e 70% de lipídios — principalmente ácidos graxos polinsaturados —, seguidos por 15 a 20% de proteínas de alto valor biológico, carboidratos e fibras, elevado teor vitamínico — especialmente B1 —, além de quantidades apreciáveis de minerais e valor energético bastante elevado (GUTIERREZ *et al.*, 1997; SOUZA e MENEZES, 2004; FERRIERA *et al.*, 2006 MOODLEY *et al.*, 2007). Há uma grande variação do teor de minerais para a castanha-do-Brasil, inclusive em função da localização das árvores em diferentes regiões. Um dos destaques nutricionais da castanha-do-Brasil é seu elevado percentual de selênio — importante antioxidante e que vem sendo vinculado a redução de alguns tipos de câncer e outras doenças; além disso, apresenta outros nutrientes importantes do ponto de vista nutricional, tais como: ferro (Fe), magnésio (Mg) e manganês (Mn) (CHUNHIENG *et al.*, 2008).

Quanto ao selênio, a quantidade diária necessária deste nutriente na nutrição para homens e mulheres fica em torno de 75 µg e 55 µg por dia, respectivamente; uma única castanha-do-Brasil pode fornecer até 120 µg de selênio — o que demonstra sua importância na nutrição humana —, fornecendo, uma única castanha, quase o dobro da quantidade diária necessária (FREITAS *et al.*, 2002; MOODLEY *et al.*, 2007). A castanha-do-Brasil apresenta teor de ácido linoleico superior à maioria dos óleos de produtos similares (FELBERG *et al.*, 2004).

A Tabela 1 mostra, por meio de diferentes pesquisas, o elevado valor calórico da castanha-do-Brasil, com valores próximos a 700 kcal, oriundos da alta concentração de lipídios — próximo a 70 g por 100 g de amostra. A concentração de lipídios mostra-se importante para conferir propriedades organolépticas aos alimentos, tais como odor e cor. Os lipídios são misturas de glicerídeos que podem ser oxidáveis em diferentes graus (SILVA e MARSAIOLI-JUNIOR, 2003). Tais compostos podem ser formados pela associação química entre o glicerol e moléculas de ácidos graxos — classificados em saturados e insaturados, ou seja, mono e polinsaturados, dependendo do número de duplas ligações em sua estrutura química (HOLCAPEK *et al.*, 2003; PACHECO, 2007).

Tabela 1 — Composição nutricional de castanha-do-Brasil *in natura*. Resultados expressos em 100 g de amostra integral.

Valor calórico (kcal)	Lipídios (g)	Proteínas (g)	Carboidratos (g)	Fibra total (g)	Autores
666	65,90	14,40	11,00	2,10	Almeida (1963)
-	66,80	13,60	10,3	-	Andrade <i>et al.</i> (1999)
676,56	67,30	14,29	3,42	8,02	Souza e Menezes (2004)
-	-	12,91	4,13	-	Felberg <i>et al.</i> (2004)
680,20	61,00	15,60	17,12	7,79	Ferreira <i>et al.</i> (2006)
-	66,7	19,93	0,69	-	Venkatachalam e Sathe (2006)
-	66,80	13,60	10,30	-	Moodley <i>et al.</i> (2007)
695,73	65,33	18,22	8,72	4,85	Santos (2008)
-	70,62	14,35	11,61	-	Felberg <i>et al.</i> (2009)
732,00	69,40	15,90	10,90	-	Pires (2012)
659	67,10	14,32	11,74	7,50	USDA (2018)

-Não determinado

Fonte: Elaborado e adaptado pelo autor com base em Kluczkovski *et al.* (2015).

O óleo extraído da castanha-do-Brasil apresenta elevado valor nutricional e funcional, conferem propriedades organolépticas aos alimentos, tais como odor e cor. Os lipídios constituem-se como misturas de glicerídeos, oxidáveis em diferentes graus, que são formados pela associação química entre o glicerol e moléculas de ácidos graxos. O perfil de ácidos graxos é composto por monoglicerídeos, diglicerídeos e poliglicerídeos em menor concentração. Podem ser classificados em saturados e insaturados — o que vai depender do número de duplas ligações em sua estrutura química. A grande relevância situa-se nos ácidos graxos insaturados, principalmente, os ácidos linoleico e oleico (HOLCAPEK *et al.*, 2003; VENKATACHALAM e SATHE, 2006; PACHECO, 2007; YANG, 2009).

Os ácidos graxos livres ocorrem em pequenas quantidades nos óleos e gorduras; entretanto, participam da construção das moléculas de glicerídeos e não-glicerídeos, representando algo em torno de 96% da massa total dessas moléculas, contribuindo de maneira importante nas propriedades físico-químicas de diferentes óleos e gorduras (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). O perfil de ácidos graxos insaturados, incluindo os monoinsaturados (MUFA) e os polinsaturados (PUFA) correspondem em média a 75% do total de ácidos graxos. Esses ácidos graxos insaturados são considerados como uma das maiores causas de danos nas propriedades sensoriais de alguns alimentos, pois as reações oxidativas podem levar à formação de hidroperóxidos. Entretanto, os ácidos graxos saturados (SFA), têm

prevalência para ácidos palmítico e esteárico, fontes consideráveis de ômega-6 e 9, com taxas importantes de ômega-3 — ácidos linolênicos. A composição em ácidos graxos é muito variável nas castanhas de diferentes espécies, ou até mesmo em variedades da mesma espécie. Em comparação com as demais oleaginosas, a castanha-do-Brasil possui um valor em torno de 25% de ácidos graxos saturados e 75% de insaturados; sendo que a maior prevalência é de ácidos graxos polinsaturados — o ácido oleico e linoleico pode atingir níveis superiores a 70% ao de outras nozes (RYAN *et al.*, 2006; YANG, 2009; SANTOS, 2012; USDA, 2018).

Devido a presença de um alto teor de ácidos graxos polinsaturados o óleo da castanha-do-Brasil pode apresentar certa instabilidade — vide Tabela 2, em que diferentes pesquisas mostram a composição de ácidos graxos extraídos da castanha-do-Brasil. Essa instabilidade é diretamente dependente da área de origem e das condições de estocagem e manuseio da matéria-prima. Ao ser negligenciado tais fatores, a qualidade do óleo pode ser afetada, ocorrendo um aumento da acidez — principalmente devido ao ácido oleico e linoleico (HOLCAPEK *et al.*, 2003; VENKATACHALAM e SATHE, 2006; PACHECO, 2007; YANG, 2009).

Tabela 2 — Composição em ácidos graxos (%) do óleo extraído de castanha-do-Brasil

Ácidos Graxos	Andrade <i>et al.</i> (1999)	Ryan <i>et al.</i> (2006)	Venkatachalam e Sathe (2006)	Ferreira <i>et al.</i> (2006)	Santos (2012)
Mirístico (14:0)	-	0,06	0,05	-	0,06
Palmítico (16:0)	-	13,50	0,00	13,0	14,24
Palmitoléico (16:1)	-	0,33	15,1	-	0,01
Margárico (17:0)	15,0	0,22	0,08	-	-
Esteárico (18:0)	10	11,77	9,51	-	11,19
Oléico (18:1)	28,0	29,09	28,75	51,0	36,26
Linoléico (18:2)	6,9	42,80	45,43	34,0	37,56
Linolênico (18:3)	21,7	0,20	0,18	-	0,08
Araquídico (20:0)	24,9	0,54	0,25	-	-
Gadoléico (20:1)	-	0,21	0,00	-	-
Behênico (22:0)	-	0,12	0,06	-	-
Erúcico (22:1)	-	0,34	0,00	-	-

-Não determinado

Parâmetros como índice de acidez e o índice de peróxido são descritos como parâmetros referenciais para determinar a qualidade da conservação de óleos (BRASIL, 2005). Índice de iodo, índice de saponificação, índice de refração e densidade relativa estão relacionados apenas com as características específicas de

cada óleo vegetal, como comprimento de cadeias e números de insaturações (MORETTO e FETT, 1998; FERREIRA *et al.*, 2006). Alguns desses parâmetros em diferentes pesquisas é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 — Parâmetros para qualidade de óleo de castanha-do-Brasil.

Parâmetros	Autores				
	Almeida (1963)	Ferreira <i>et al.</i> (2006)	Moodley <i>et al.</i> (2007)	Santos (2012)	Oliveira (2018)
Índice de Acidez (mg KOH/g óleo)	-	0,207	1,45	0,32	0,66-0,84
Índice de Peróxido (mEq kg ⁻¹)	-	0,970	-	4,06	-
Índice de Iodo (mg de iodo/100 mg de óleo)	97-109	-	74	-	96,7-105,8
Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)	192-202	198,58	192,4	181,53	-

-Não determinado

Fonte: Adaptado de Pacheco (2007)

2.1.3 Distribuição geográfica e produção

Presente em quase toda a região amazônica, a castanha-do-Brasil distribuem-se principalmente pelos estados brasileiros do Acre, Amazonas, Pará, Amapá, Roraima, Rondônia e Mato Grosso — Região Norte e uma pequena parte da Região Centro Oeste do Brasil. Além dos estados brasileiros, a castanha-do-Brasil ocorre em países com os quais o Brasil faz fronteira, tais como: Bolívia, Peru, Venezuela, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa e Suriname (BRASIL, 2017).

Na região amazônica, entre os anos de 1927 e 1945, ocorre o Projeto Ford — criado em função do monopólio do mercado da borracha. O pioneiro Henry Ford e os idealizadores do projeto queriam o controle de todo o material necessário à sua indústria automobilística. Para tal, nesse período é criada a Companhia Ford Industrial do Brasil; com a consequente criação de um povoado conhecido como Fordlândia, que logo evolui para cidade. Essa efervescência vai até 1945, quando acontece a

estagnação da economia regional e a consequente estagnação das cidades. Ainda em 1945, ocorre a dissolução da Companhia Ford (PIMENTEL *et al.*, 2007; BRASIL, 2017). Após a decadência do ciclo da borracha na região amazônica, a castanha-do-Brasil passou a constituir o principal produto extrativista para exportação da região norte brasileira, na categoria de produtos básicos. A exploração de exemplares nativos da árvore de *Bertholletia excelsa* é protegida por lei (Decreto nº 1.282, de 19 de outubro de 1994), porém é permitido seu plantio em sistema de monocultivo ou consorciado (CAETANO, 2012; LOCATELLI *et al.*, 2015).

Grande parte da produção brasileira de fruticultura ainda é comercializada no mercado interno. Entretanto, a castanha-do-Brasil tornou-se um diferencial, pois aparece como um dos principais componentes na lista de exportações brasileiras. Os últimos dados do IBGE (2022), nos anos de 2016 e 2017, a produção média brasileira oscilou em torno de 34.000 e 26.000 toneladas de castanha-do-Brasil, respectivamente para esses anos, sendo que grande parcela foi destinada à exportação. Na Tabela 4 e na Figura 2 encontram-se os dados da produção da extração vegetal no Brasil.

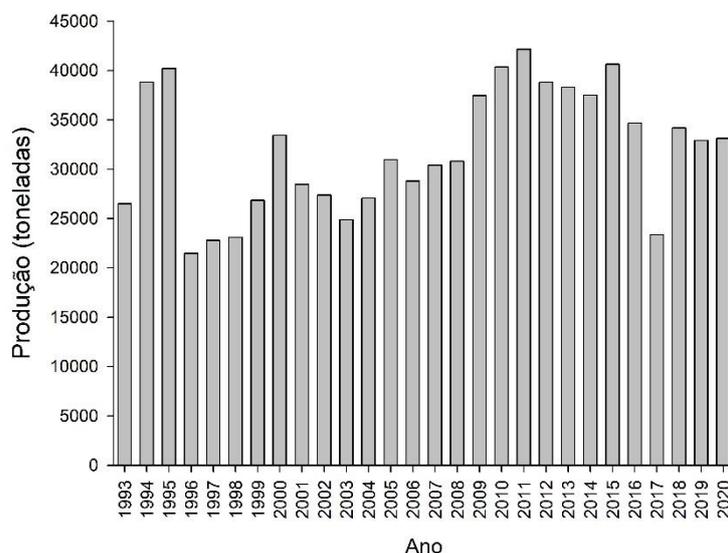


Figura 2 — Produção (toneladas) de castanha-do-Brasil, no período de 1993 a 2020, conforme a produção nacional.

Fonte: Elaborado pelo autor com base nos dados do IBGE (2022).

O Brasil, até 1990, ocupou posição de liderança no mercado mundial, com 80% do comércio internacional, foi quando teve a maior produção de sua história, nunca mais superada, com mais de 50.000 toneladas (Figura 2). Atualmente, com a redução da produção brasileira variando entre 25.000 e 40.000 toneladas — Tabela 4 —, a

Bolívia e o Peru passaram a ser os maiores exportadores mundiais, com volume da ordem de 50.000 toneladas anuais. Na Tabela 4 observa-se que o estado do Amazonas, desde os anos 2001, é o maior produtor de castanha, seguido alguns anos pelo Acre ou pelo Pará. Uma das causas da redução na produção brasileira, além da diminuição da oferta do produto e destruição dos castanhais nativos foi o surgimento de barreiras não-tarifárias, pela imposição de padrões fitossanitários mais rígidos por parte dos países exportadores, como os da União Europeia. Desde os anos 1970, as exportações brasileiras vêm decrescendo progressivamente, e essa perda de participação no mercado, aliada a problemas com exportações principalmente com relação à União Europeia, suscitaram reações do setor industrial e de segmentos do governo para a tomada de medidas, visando ao maior fortalecimento da sua cadeia produtiva. Dessa forma, as empresas de beneficiamento, procuraram aprimorar os padrões de qualidade e passaram a buscar novos mercados — dentre eles Bolívia e Peru —, pois a tecnologia de processamento da castanha é variada e utiliza, em sua maioria, grande contingente de mão-de-obra (BRASIL, 2002; SANTOS *et al.*, 2010; BAYMA *et al.*, 2014).

Tabela 4 — Produção (toneladas) de castanha-do-Brasil, em diferentes anos no período de 2001 a 2020, conforme a produção nacional e Unidades da Federação

Unidade da Federação	Produção (toneladas)								
	2001	2007	2010	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Norte	28.191	29.930	38.879	38.560	33.258	21651	31.991	30.679	31.436
Acre	5.924	10.378	12.367	14.038	8.742	4.790	7.681	7.297	6.769
Amapá	1.393	847	447	473	489	476	437	405	416
Amazonas	8.352	8.871	16.039	13.983	14.945	10.011	12.161	12.182	11.707
Roraima	69	90	106	155	161	322	2.230	1.940	1.982
Pará	6.972	7.639	8.128	7.967	6.886	4.186	7.726	6.977	8.643
Rondônia	5.481	2.105	1.197	1.944	2.055	1.865	1.755	1.878	1.920
Centro-Oeste	277	476	1.477	2.082	1.407	1.706	2.169	2.226	1.682
Mato Grosso	245	476	1.477	2.082	1.407	1.706	2.169	2.226	1.682
Brasil	28.467	30.406	40.375	40.643	34.903	23.357	34.170	32.905	33.118

Fonte: Elaborado pelo autor com base nos dados do IBGE (2022): Produção da extração vegetal e da silvicultura, 2022.

As maiores áreas de extrativismo estão na região amazônica. Ressalta-se que o sistema tradicional de coleta e pós-colheita se faz muito presente, ainda há

resistência à adoção de novas práticas em diversas regiões do Brasil. A adoção desse sistema tradicional de coleta e pós-colheita resulta em problemas de contaminação das castanhas que leva à perda da qualidade do produto, que podem se tornar barreiras comerciais e prejudicar o mercado externo — sendo que o principal foco e destino desse produto é a exportação (BRASIL, 2017).

As exportações brasileiras ao longo do tempo apresentam diversas oscilações — com quedas ou elevações em seu volume; que podem ser resultados de fatores como: elevação da produção de natureza extrativista de países que fazem fronteira com o Brasil; evolução das técnicas de beneficiamento dos países produtores, principalmente a Bolívia e o Peru. Somam-se ainda as dificuldades de manuseio nos níveis de produção e uma série de fatores socioeconômicos e ambientais ligados às políticas públicas de distribuição de terras e do movimento de ocupação das regiões dos castanhais no Brasil. Em paralelo, constata-se um possível aumento do consumo interno, tanto para o consumo per capita no setor alimentício, quanto para aproveitamento nos ramos farmacêuticos e de cosméticos. Como se observa, o Brasil exporta, cada vez mais, castanha com casca para a Bolívia, em decorrência do aperfeiçoamento das técnicas de beneficiamento e adequação às exigências da União Europeia, como descrito acima, que tornaram esse país um dos principais exportadores de castanha-do-Brasil, para essa região e para os Estados Unidos — o que fez o Brasil perder destaque como maior produtor mundial no mercado externo, sendo atualmente a Bolívia o maior produtor mundial de castanha-do-Brasil (SANTOS *et al.*, 2012; IBGE, 2018).

2.1.4 Cadeia produtiva da castanha-do-Brasil

Produtos florestais foram explorados de maneira predatória por séculos no Brasil. Essa exploração concentrava-se na madeira e diversos produtos florestais não madeireiros, tais como: látex da seringueira, a madeira e os frutos de castanha-do-Brasil, pequi e óleos como os de andiroba, buriti e copaíba. A cadeia de produtos florestais não madeireiros envolve diversos setores da sociedade e papel do estado. O produtor extrativista pode se articular por meio de associações de produtores e/ou cooperativas, assim como uma busca por assistência técnica em instituições do governo e privadas. Pode ser vantajoso para o produtor extrativista tais forma de organização, pois podem possibilitar que seus produtos cheguem sem intermediação

à indústria, que seguirá para o comércio até chegar ao destino — os consumidores. Porém, há aqueles que ainda dependem de um intermediário para transportar seus produtos para unidades de beneficiamento, indústria ou o comércio local. Entende-se por cadeia produtiva “um sistema constituído de atores inter-relacionados e pela sucessão de processos de produção, transformação e comercialização do produto”, segundo o Plano Nacional de Promoção das Cadeias de Produtos da Sociobiodiversidade. Torna-se importante entender os elos da cadeia produtiva para permitir que os atores envolvidos visualizem todo o caminho percorrido pelo produto, podendo assim identificar em cada elo as potencialidades e os problemas que podem acontecer nesse percurso (BRASIL, 2017).

Há algumas plantações experimentais no estado do Amazonas, porém, a maioria das populações de castanheiras são nativas. O processo produtivo da castanheira caracteriza-se em que entre os meses de dezembro e abril o ouriço da castanha amadurece e, devido às chuvas e aos ventos, acaba caindo da árvore. Ao cair, aparece os coletores autônomos — seringueiros, povos indígenas e ribeirinhos —, que circulam pela floresta, de árvore em árvore, recolhendo os ouriços e levando-os para um armazenamento simples no meio da floresta. Na Bolívia e no Peru, grande parte dos coletores autônomos são trabalhadores contratados, que só começam a trabalhar após receberem um adiantamento do comprador. O armazenamento, manejo, transporte e quebra das castanhas nas localidades extrativistas são feitas de maneiras artesanais, muitas vezes com condições higiênicas precárias, caracterizando-se por iniciar entre os meses de janeiro a maio — período de coleta, quando os frutos caem no solo na estação das chuvas. Os trabalhadores que fazem a coleta dos ouriços usam um cesto levado às costas; quando esses cestos estão cheios são transportados até os locais de armazenamento na floresta (barracões de palha ou cobertos com lonas). Esses locais são denominados de “região de quebramento”, ou “comunidades”, destinadas à operação de extração das sementes dos ouriços. Uma vez extraídas essas sementes dos ouriços começa a etapa de eliminação das impurezas, onde são classificadas e armazenadas a granel, para transporte até o beneficiamento. Todo esse processo pode ser feito por até três pessoas, que colhem entre 2 e 3 mil ouriços na sua área de produção, posteriormente cortam, lavam, secam e ensacam as castanhas, num período em torno de 20 dias. Em seguida, toda a produção é vendida no mercado local, geralmente (BRASIL, 2002;

EMBRAPA, 2004; PACHECO, 2007; BRASIL, 2017). A figura 3 mostra um fluxograma das etapas da cadeia produtiva de castanha-do-Brasil.

Após essas etapas, o produto é armazenado em barracões e levado aos portos primários de comercialização e levado até a sede do município, devido à dificuldade de navegabilidade dos rios, muitas vezes o transporte é feito em pequenas embarcações. Alguns lugares esse transporte pode ocorrer via terrestre, como é o caso do Estado do Acre. Ao chegar as usinas de beneficiamento, o beneficiamento pode ou não ser feito. Uma etapa importante nas usinas de beneficiamento é a secagem das castanhas, etapa que não ocorre em etapas extrativistas mais artesanais. No processo de descasca das castanhas, devido ao seu formato irregular e devido à quebra ser manual, há uma grande porcentagem de perdas. As castanhas com casca podem ser vendidas desidratadas ou semidesidratadas ou ainda sem beneficiamento — sem o processo de descasca (EMBRAPA, 2004; PACHECO, 2007; PACHECO e SCUSSEL, 2009; BRASIL, 2017). A Figura 4 mostra um fluxograma do beneficiamento de castanha-do-Brasil, apesar de que a sequência de procedimentos é variável de acordo com o local de beneficiamento.

Após o beneficiamento, o produto com casca é acondicionado em big bags, de 500 a 1000 kg em sacos de juta ou de polietileno, e o produto sem casca são pesadas e embaladas em embalagem a vácuo com capacidade de 20 kg — objetivo de retardar o processo de oxidação. Como a maioria dos mercados compradores consiste em outros países, o transporte é normalmente efetuado em contêineres em navios, e, às vezes, o transporte aéreo é mais aplicável em pequenos lotes. Entretanto, a castanha descascada e em pedaços possui como destino o mercado interno, em que as indústrias de alimentos representam os principais compradores (EMBRAPA, 2004; PACHECO e SCUSSEL, 2009).

É de extrema importância realizar o tratamento silvicultural do castanhal; pois, no extrativismo sustentável, de acordo com Brasil (2017):

“essa atividade compreende as ações pelas quais o extrativista pode melhorar as condições ambientais da área em que explora determinada espécie, como capinar, roçar, adubar, podar e controlar as pragas. A proteção das áreas de ocorrência dos castanhais é fundamental para assegurar a conservação da espécie na região de ocorrência. A castanheira é uma espécie nativa de grande valor para a população que vive do seu extrativismo. Por isso, é importante cumprir algumas diretrizes para garantir sua conservação. Podem ser adotadas medidas tanto para manter e

proteger as áreas, como para aumentar a produção de frutos.” (BRASIL, 2017, p.48).

Para garantir a conservação e produção das áreas de coleta é importante acompanhar todas as etapas do manejo e seus impactos ambientais, socioculturais e econômicos. Para garantir a obtenção de informações sobre o crescimento e a necessidade de novos castanhais é importante que seja bem executado, obtendo ainda informações sobre a produção de frutos por planta e por área de coleta. Além de ser uma importante ferramenta para o extrativista se organizar, planejando a coleta anual e, assim, estimar sua produção (EMBRAPA, 2004; BRASIL, 2017).

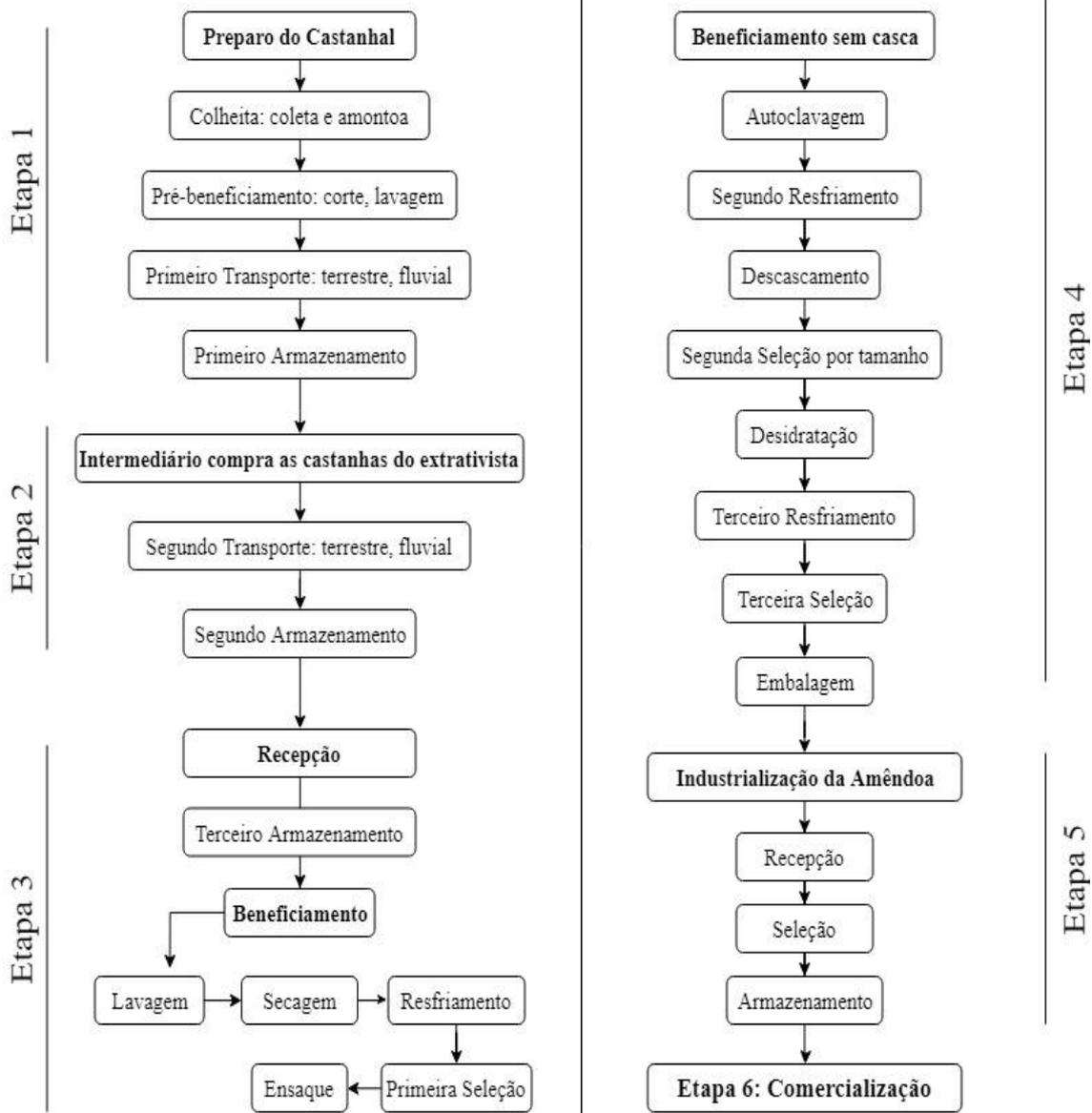


Figura 3 — Fluxograma das etapas da cadeia produtiva de castanha-do-Brasil.
 Fonte: Elaborado pelo autor com base nos dados de Brasil (2002) e Embrapa (2004).

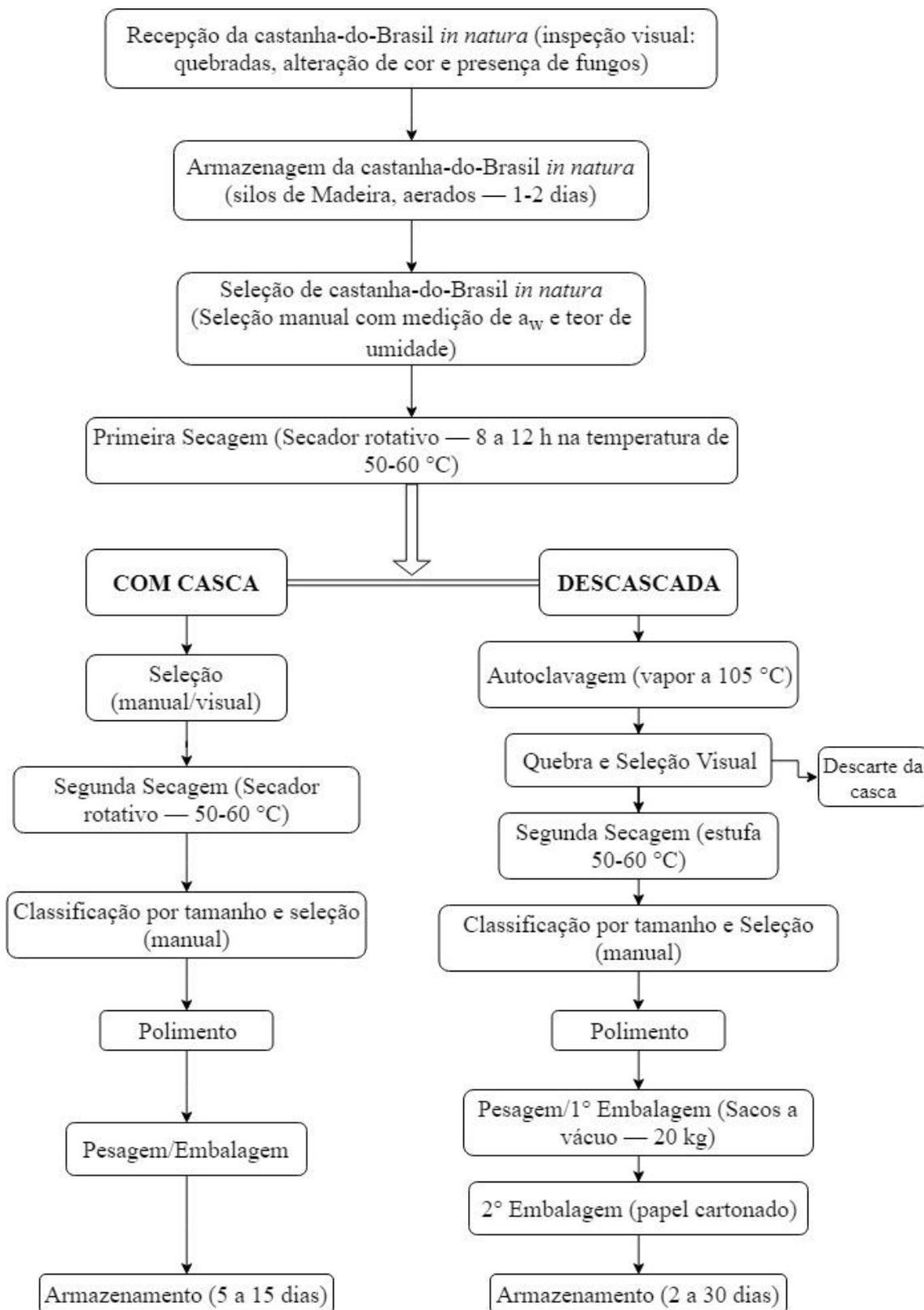


Figura 4 — Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil.

Fonte: Elaborado pelo autor como base nos dados de Embrapa (2004) e Pacheco e Scussel (2009)

2.1.5 Aspectos qualitativos da castanha-do-Brasil

O extrativismo é a principal forma de colheita da castanha-do-Brasil, o que dificulta o transporte e o beneficiamento, sendo os maiores entraves para sua comercialização. O sistema de produção tradicional é focado em unidades familiares e não possui muitos investimentos tecnológicos. A região norte, onde predomina os castanhais brasileiros, apresenta o solo úmido e o índice pluviométrico elevando, além disso, o envoltório amadeirado (ouriço) e esses fatores de umidade oferecem condições ideais para o crescimento de microrganismos contaminantes, tais como os coliformes e *Salmonella* sp. — microrganismos mais relevantes definidos pela legislação brasileira como contaminantes (BRASIL, 2001; YANG, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

Outro fator importante na cadeia produtiva da castanha-do-Brasil são as ótimas condições de temperatura e umidade dessas regiões para o desenvolvimento de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. A região amazônica apresenta condições propícias para o desenvolvimento desses fungos, pois há temperaturas que variam de 25 a 30 °C e umidade relativa média entre 97 e 99% (SANTOS *et al.*, 2012). Esses fungos, principalmente os fungos do grupo *Aspergillus* seção *Flavi*, produzem micotoxinas — metabólitos secundários elaborados —, sendo que os mais importantes são as aflatoxinas. A ingestão dessa substância pode levar ao surgimento de patologias que variam consideravelmente, de acordo com a dose, do estado nutricional, da idade e do gênero. São conhecidos mais de 17 compostos, dentro os quais os principais tipos, e de maior interesse à saúde humana e animal, são identificados pelas siglas: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (HEDAYATI *et al.*, 2007; PACHECO e SCUSSEL, 2009).

Devido aos problemas relatados acima, o Brasil possui grande incidência de infecção fúngica e altos níveis de aflatoxinas em suas castanhas, mesmo sendo um grande exportador. Grandes perdas anuais da castanha-do-Brasil em países em desenvolvimento, como o Brasil, ocorrem devido à alta incidência de infecção por fungos produtores de aflatoxinas; ocasionando uma redução na economia do país devido a não aceitação dos produtos que excedem os limites regulamentares de toxinas produzidas por fungos (micotoxinas) pelo mercado estrangeiro. As castanhas que são rejeitadas pelo mercado externo, além de afetar a economia interna do país, são vendidas nesse mesmo mercado interno, o que aumenta o risco de contaminação

por micotoxinas pela população brasileira (FREIRE *et al.*, 2000; PACHECO e SCUSSEL, 2009; MIDORIKAWA *et al.*, 2014).

Os três principais e maiores produtores de castanha-do-Brasil são a Bolívia, Brasil e Peru; esses países têm implementado restrições, com o objetivo de evitar a contaminação das castanhas-do-Brasil por fungos produtores de aflatoxinas, e, dessa forma, estarem de acordo com as exigências dos padrões sanitários internacionais, além de fortalecer o mercado interno e as exportações — principalmente a Europa. O projeto “*Safenut*” coordenado pela União Europeia é um exemplo, pois, trata-se de um projeto com o intuito de validar métodos de análise fáceis e confiáveis para a detecção de níveis de aflatoxinas em indústrias e setores de distribuição (STDF, 2008). A Embrapa Acre, desde meados dos anos 2000, tem implementado tecnologias de boas práticas de manejo que melhoram a qualidade da castanha-do-Brasil — orientando extrativistas nas regiões produtoras para a adoção e implementação de cuidados simples que conferem a qualidade do produto (MIDORIKAWA *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

2.2 Fungos e Micotoxinas

Em todo o mundo alimentos como grãos e seus derivados são extremamente suscetíveis a contaminação por fungos. Grande parte desses fungos são produtores de substâncias químicas e atividade biológica amplamente variada. Alguma dessas substâncias — metabólitos produzidos por fungos —, são componentes altamente desejados de alguns alimentos e com função farmacológica, como os antibióticos. Porém, alguns fungos podem produzir substâncias tóxicamente agudas, crônicas potentes ou carcinogênicas — promotoras e indutoras de câncer. Esses agentes tóxicos são denominados de micotoxinas. Esse termo deriva do grego “*mýkes*” (fungo/cogumelo) e do latim “*toxicum*” (veneno), ou seja: toxina produzida por fungos em condições específicas, com efeitos crônicos e agudos em humanos e animais. Esse termo surgiu em meados de 1960 devido a uma crise veterinária incomum nos arredores de Londres, Inglaterra, onde cerca de 100.000 perus morreram. O papel das micotoxinas como possíveis carcinógenos humanos e animais só se tornaram relevantes e objeto de estudos devido a este acontecimento na Inglaterra nos anos de 1960 (BLOUT, 1961; FORGACS, 1962; SHIBAMOTO e BJELDANES, 2014).

Essa misteriosa doença foi associada a alimentação com amendoim contaminado proveniente do Brasil com o metabólito secundário, uma micotoxina, de *Aspergillus flavus* — as aflatoxinas. O acontecido sensibilizou cientistas na busca de outros metabólitos de fungos que poderiam ser mortais. Em seguida, muitas toxinas de fungos previamente conhecidas, foram inclusos no grupo das chamadas micotoxinas (SHIBAMOTO e BJELDANES, 2014). Entretanto, baseado em extensivos estudos analíticos e estudos detalhados da distribuição desses fungos na natureza, a International Agency for Research on Cancer (IARC), determinou cinco toxinas, das mais de 300 encontradas, importantes para a agricultura. As toxinas determinadas pela IARC são: as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, zearalenona e deoxinivalenol (tricotecenos). Essas toxinas também são imunossupressoras, neurotoxigênicos, nefrotoxigências e podem ser carcinogênicas (JESTOI *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2008; SANI *et al.*, 2012; MIDORIKAWA *et al.*, 2014).

A contaminação dos alimentos por essas substâncias produzidas por fungos varia de acordo com as condições ambientais — umidade, temperatura, métodos de processamento, armazenamento e cadeia produtiva —, em que o alimento é submetido. A temperatura se destaca como sendo um dos principais fatores envolvidos na produção de micotoxinas. A faixa ideal de produção varia entre 11 até 37°C. Fungos produtores de micotoxinas podem utilizar, principalmente grãos, ou outros materiais de origem vegetal, como fonte de alimento, liberando enzimas para a degradação do substrato. O resultado é a degradação dos grãos e conseqüente perda do valor nutricional. A exposição a micotoxinas é mais provável de ocorrer em lugares em que os métodos de manipulação e armazenamento de alimentos são precários, assim como lugares que existam poucos regulamentos para proteger a população exposta a esse tipo de contaminação. Cerca de 25% da agricultura mundial, principalmente de cereais, é afetada por fungos produtores de micotoxinas, o que pode gerar uma perda global, em termos de produção, de aproximadamente 1 bilhão de toneladas por ano. As micotoxinas têm atraído a atenção mundial devido a perdas significativas associadas com o seu impacto na saúde humana e animal, e conseqüente implicações econômicas (FAO, 2004; ZLOTOWSKI *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2008; SANI *et al.*, 2012).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar do homem ou de animais de maneira direta ou indireta. A contaminação direta ocorre quando o desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, a produção de micotoxinas acontece no produto final.

Porém, a contaminação indireta decorre da utilização de ingredientes contaminados com fungos produtores de micotoxinas. Logo, durante o processamento do alimento, o fungo pode ser eliminado, porém a micotoxina não é eliminada, o que garante que o produto ainda esteja contaminado. A ausência de fungos nos alimentos não significa ausência de micotoxinas, pois o fungo já pode ter sido eliminado, porém a toxina pode estar presente e ativa no alimento. A maioria das micotoxinas são termorresistentes mantendo a sua toxicidade mesmo após o alimento passar por processos que utilizam altas temperaturas (FREIRE *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2008).

2.2.1 Identificação e caracterização molecular de *Aspergillus* seção *Flavi*

Em 1729 P. A. Micheli, um padre e micologista, descreveu pela primeira vez o gênero *Aspergillus*, nome escolhida devido à semelhança estrutural da morfologia do conidióforo do fungo com o aspergillum — instrumento litúrgico utilizado para borrifar água benta (BENNETT e KLICH, 1992; AMAIKE e KELLER, 2011). Ao longo da história o gênero *Aspergillus* foi classificado com base em sua morfologia, contendo mais de 200 espécies catalogadas até o momento. Link aprofundou estes estudos, e, em 1809, descreveu pela primeira vez a espécie *Aspergillus flavus*, classificando-o como uma espécie assexuada que produz apenas esporos assexuados, conídios e corpos frutíferos assexuados, os escleródios. Só recentemente que o estágio sexual de *A. flavus* e *A. parasiticus* foi relatado e classificado como *Petromyces flavus* e *Petromyces parasiticus*, respectivamente (HORN *et al.*, 2014). O gênero *Aspergillus* compreende mais de 180 espécies anamórficas, os quais são divididos em seções, como a seção *Flavi*, que compreende 33 espécies, sendo que a maioria são produtoras naturais de aflatoxinas (FRISVAD *et al.*, 2019). *Aspergillus* é um gênero com taxonomia complexa e em constante evolução. Para identificação em gênero as características morfológicas são facilmente aplicadas, porém, para identificação de espécies classificadas numa mesma seção, como a *Flavi*, a diferenciação torna-se complexa, pois torna-se difícil diferenciar espécies somente com características morfológicas (FRISVAD *et al.*, 2005; PILDAIN *et al.*, 2008; FRISVAD *et al.*, 2019).

Métodos convencionais de análise para identificação de espécies de *Aspergillus* seção *Flavi* aflatoxigênicos baseia-se, tradicionalmente, em análises de isolamentos em meios de cultivo seletivo, porém, são métodos trabalhosos, demorados e requerem amplo conhecimento taxonômico para identificação correta

com base em características morfológicas. A identificação morfológica por si só é insuficiente e relacionada como não confiável para identificar e diferenciar corretamente as espécies intimamente relacionadas e presentes em *Aspergillus* seção *Flavi* (TANIWAKI *et al.*, 2017). Outro aspecto importante utilizado na identificação de *Aspergillus* sp. é a utilização do perfil químico para auxiliar os resultados da identificação morfológica. Na identificação do perfil químico produzido por *Aspergillus* sp. os principais extrólitos identificados são as aflatoxinas, o ácido aspergílico e o ácido ciclopiazônico (NORLIA *et al.*, 2019a). Uma abordagem polifásica usando características morfológicas e fisiológicas, bem como perfis moleculares e extrólitos, é a abordagem mais recomendada para identificar e distinguir espécies importantes e toxigênicas dentro da seção *Aspergillus Flavi* e *A. seção Nigri* (TANIWAKI *et al.*, 2017; FRISVAD *et al.*, 2019).

Para identificação morfológica observa-se as estruturas microscópicas — cabeças dos conídios uni ou bisseriados, produção de escleródios de cor escura por algumas dessas espécies, além dos conídios de tonalidades amarelo-esverdeadas e marrons. As espécies dentro dessa seção podem se encontrar no solo como escleródios, conídios, ou ainda como micélios no tecido vegetal. Podem ainda ser produzidos naturalmente no estágio assexuado ou sexuado nas plantas em campo e, durante a recombinação da fase sexuada, a população, principalmente de *A. flavus*, resulta em uma alta diversidade genética (HORN *et al.*, 2016). Decorre assim que, a morfologia, produção de micotoxinas e grupos de compatibilidade vegetativa em *A. flavus*, possuem maior diversidade em relação a outras espécies dentro da seção *Flavi*. Portanto, a identificação precisa de *Aspergillus* seção *Flavi* requer uma abordagem trifásica: morfológica, química e molecular, pois são espécies intimamente relacionadas e não podem se distinguir facilmente utilizando apenas características morfológicas — a Tabela 5 mostra a morfologia, os extrólitos e a identificação molecular que têm sido utilizados para diferenciação das espécies dentro de *Aspergillus* seção *Flavi* em alguns trabalhos (HORN *et al.*, 2014; TANIWAKI *et al.*, 2017; FRISVAD *et al.*, 2019; NORLIA *et al.*, 2019a).

Tabela 5 — Morfologia, produção de extrólitos e identificação molecular de espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*

Espécie	Morfologia	Extrólitos	Identificação Molecular	Origem	Referências
<i>A. flavus</i>	Conídios verde-amarelados, escleródios pequenos e grandes, verso laranja no meio AFPA	AFB (+/-), ACP (+/-), ácido aspergílico, asperfurano (+/-), paspalinina e paspalina (+/-)	β -tubulina e calmodulina	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Pildain <i>et al.</i> 2008
<i>A. flavus</i>	Conídios verde-amarelados, escleródios pequenos e grandes, verso laranja no meio AFPA	AFB (+/-), ACP (+/-), ácido aspergílico, asperfurano (+/-), paspalinina e paspalina (+/-)	β -tubulina e calmodulina	<i>Zea mays</i> L.	Frisvad <i>et al.</i> 2019
<i>A. flavus</i>	Conídios verde-amarelados, escleródios pequenos e grandes	AFB (+/-) e AFG (+/-)	β -tubulina, calmodulina, rDNA ITS, mtDNA SSU rDNA	<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.	Midorikawa <i>et al.</i> 2014
<i>A. parasiticus</i>	Conídios verde-escuros, cor laranja no verso de AFPA	AFB, AFG, ácido kójico, ácido aspergílico, parasiticólídeos, paspalinina e paspalina (+/-)	β -tubulina e calmodulina	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Pildain <i>et al.</i> 2008
<i>A. nomius</i>	Conídio amarelo esverdeado, verso laranja em meio AFPA	AFB, AFG, ácido kójico, ácido aspergílico, nominina	β -tubulina e calmodulina	<i>Triticum aestivum</i> L.	Pildain <i>et al.</i> 2008
<i>A. oryzae</i>	Conídio amarelo esverdeado	Ácido kójico, asperfurano, aspiroclorina	β -tubulina e calmodulina	Desconhecida	Varga <i>et al.</i> 2011
<i>A. sojae</i>	Conídio amarelo esverdeado	Ácido kójico, asperfurano, ácido aspergílico, aspiroclorina	β -tubulina e calmodulina	Molho de soja	Varga <i>et al.</i> 2011
<i>A. tamarii</i>	Conídios marrom escuro, com verso marrom escuro em AFPA	Ácido kójico, ACP (+/-)	β -tubulina e rDNA ITS	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Norlia <i>et al.</i> 2019b

ACP — ácido ciclopiazônico; AFB — aflatoxina B; AFG — aflatoxina G; AFPA — *Aspergillus flavus* e *parasiticus* Agar

Fonte: Elaborado pelo autor com base em Norlia *et al.* (2019a).

A identificação molecular do gênero *Aspergillus* têm sido amplamente utilizada, principalmente quando é necessário caracterizar uma nova espécie. Geralmente, na identificação molecular de *Aspergillus* seção *Flavi*, e para obtenção de informações sobre a relação filogenética entre as espécies desta seção, são feitas análises da sequência de DNA de regiões como a do espaçador transcrito interno (ITS — Internal Transcript Space), a β -tubulina, a calmodulina e clusters de genes da via biossintética de aflatoxina (PILDAIN *et al.*, 2008; VARGA *et al.*, 2011; MIDORIKAWA *et al.*, 2014).

O genoma de fungos possui diversas regiões comumente usadas para a identificação de espécies. A região do rDNA ITS, β -tubulina e calmodulina são usadas com grande frequência na identificação de *Aspergillus* sp. (WHITE *et al.*, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2007; MIDORIKAWA *et al.*, 2008; VARGA *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012; LEVIN, 2012; MIDORIKAWA *et al.*, 2014; KOCSUBÉ *et al.*, 2016; FRISVAD *et al.*, 2019).

O DNA ribossômico nuclear (rDNA) da região ITS é a região mais amplamente sequenciada e recomendada como marcador molecular de DNA (código de barras) para identificação de fungos e para construção de informações filogenéticas. A região ITS está localizada entre os genes 18S (SSU) e 28S (LSU) na unidade de repetição de rDNA, onde se encontra as regiões ITS1 e ITS2, separados pelo gene 5.8S. As sub-regiões ITS1 e ITS2 são tipicamente específicas para espécies, o que representa uma alta taxa de evolução, e, a sequência completa da região ITS pode variar entre 450 e 700 pb (WHITE *et al.*, 1990; NILSSON *et al.*, 2009; SCHOCH *et al.*, 2012). Porém, a utilização de marcadores de identificação secundária é constantemente utilizada para identificar com precisão *Aspergillus* seção *Flavi*, principalmente os genes de β -tubulina e calmodulina, já que a região ITS sozinho ainda é insuficiente para fins de identificação molecular (SAMSON *et al.*, 2014). A β -tubulina é um gene codificador da proteína tubulina, encontrada em todas as células eucarióticas, representando um dos principais componentes do citoesqueleto e flagelos de seres eucarióticos. A Calmodulina (CaM) trata-se de uma proteína de ligação ao cálcio, envolvida na proliferação e diferenciação celular, altamente conservada, funcionando como principal receptor de cálcio intracelular. Pois bem, o rDNA da região ITS, a β -tubulina e a Calmodulina são amplamente utilizados como marcadores de DNA para a identificação e análise filogenética de *Aspergillus* spp (MA *et al.*, 2009; FRISVAD *et al.*, 2019; NORLIA *et al.*, 2019a).

2.2.2 Aflatoxinas

Os fungos produtores de aflatoxinas ocorrem predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, onde a temperatura e umidade são elevadas, aumentando assim a incidência de alimentos contaminados por essas micotoxinas nessas regiões (ZLOTOWSKI *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2008; VARGA *et al.*, 2011).

As aflatoxinas produzidas por *Aspergillus* seção *Flavi* geralmente podem usar como substrato grãos como amendoim, amêndoas e castanha-do-Brasil — de uma maneira geral a cadeia produtiva desses alimentos há contato direto com o solo, o que aumenta o risco de sua contaminação por fungos aflatoxigênicos. As fumonisinas, produzidas por *Fusarium moliniforme*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium globosum*, usam como substrato cereais como o milho e o trigo. As ocratoxinas produzidas por *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, usam como substrato café, uvas, milho. As zearalenonas que são produzidas por *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium sporotrichioides*, são normalmente encontrados também em cereais como milho, sorgo e trigo. O deoxinivalenol produzido por *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium sporotrichioides* podem utilizar o trigo, o milho e a cevada como substratos (KUMAR *et al.*, 2008; BRÄSE *et al.*, 2009; SANI *et al.*, 2012; MIDORIKAWA *et al.*, 2014).

As aflatoxinas mais estudadas e que mais se destacam, em nível de importância dada em função do potencial tóxico — assim como pela alta ocorrência nos alimentos —, são as AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ e AFM₂. A nomenclatura B₁, B₂, G₁ e G₂, baseiam-se na fluorescência delas sob luz ultravioleta (B=Blue, G=Green) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada (Figura 5). As aflatoxinas M₁ e M₂ são metabólitos das AFB₁ e AFB₂, respectivamente. Apresentam como particularidade a possibilidade de serem formadas no metabolismo de mamíferos expostos a alimentação contaminada por AFB₁ e AFB₂ (FREIRE *et al.*, 2007; BRÄSE *et al.*, 2009; FILAZI e SIRELI, 2013).

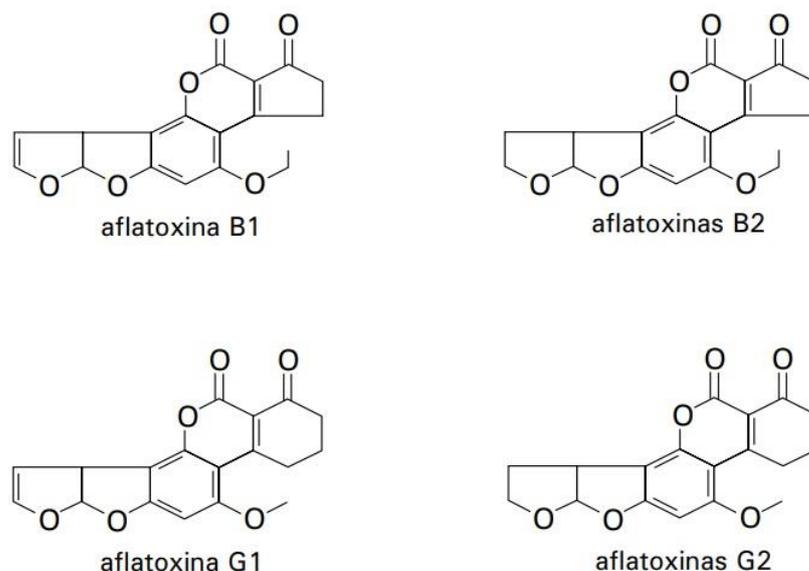


Figura 5 — Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.
 Fonte: Freire *et al.* (2007)

As aflatoxinas da série G diferem quimicamente das da série B devido a presença de um anel 3-lactona no lugar do anel ciclopentanona. As aflatoxinas B₁ e G₁ diferem das aflatoxinas B₂ e G₂ por possuírem uma ligação dupla 8,9 no anel terminal furano. As aflatoxinas M₁ e M₂ são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas B₁ e B₂, respectivamente (JAIMEZ *et al.*, 2000). Essas diferenças estruturais estão ligadas ao nível de toxicidade das aflatoxinas, de acordo com Friend e Franson (1999), a aflatoxina B₁ é a mais comumente encontrada e é a que apresenta maior toxicidade. São solúveis em solventes moderadamente polares como clorofórmio e metanol, além da solubilidade em água variar de 10 a 20 mg L⁻¹. Possuem grande estabilidade em altas temperaturas, porém são sensíveis a luz e a radiação UV e também são destruídas na presença de soluções fortemente alcalinas como amônia e hipoclorito (WHO, 1979).

Geralmente os efeitos do consumo de aflatoxinas por animais são similares para todas as espécies, porém a suscetibilidade varia de acordo com a espécie, idade, peso corporal, entre outros fatores. A aflatoxina B₁ quando ingerida através de alimentos contaminados, passa pelo processo de detoxificação pelo citocromo P450 monooxigenase no fígado, muitas vezes a AFB₁ é modificada em um produto mais tóxico e carcinogênico, podendo seguir 4 diferentes vias metabólicas: O-desalquilação formando a aflatoxina P₁; quetoredução gerando o aflatoxicol; epoxidação gerando a AFB₁-8-9-epóxido (AFBO) – metabólito altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico

—; e, a hidroxilação formando a aflatoxina M₁ — altamente tóxica —; a aflatoxina Q₁ (que pode ser transformado em aflatoxicol H₁ no fígado) e a aflatoxina B_{2a} — menor toxicidade (LEWIS *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2009).

A forma epóxido de aflatoxina B₁ e exoepóxidos AFB₁ se ligam a resíduos de guanina do DNA — formando adutos com os ácidos nucleicos. Essa ligação forma adutos guanil-N7 e induz a mutações. A mudança de G para T na terceira base do codon 249, resulta em uma mutação no gene p53 supressor de tumor, que também está associado ao mecanismo de iniciação da formação de hepatocarcinoma. Estes adutos se transformam em um anel aberto estável derivado da formamidopirimidina levando ao aparecimento de mutações genéticas, e, conseqüentemente, câncer. Os metabólitos hidroxilados e as demais aflatoxinas não sofrem a reação de epoxidação sendo menos mutagênicos e carcinogênicos do que a aflatoxina B₁ (HSU *et al.*, 1991; MURPHY *et al.*, 2006). Existem grandes diferenças qualitativas e quantitativas nas habilidades toxigênicas apresentadas por diferentes isolados dentro de cada espécie produtora de aflatoxinas. Cerca de metade dos isolados de *A. flavus* produzem aflatoxinas, podendo chegar a produzir mais de 106 µg kg⁻¹ (KLICH e PITT, 1988; COTTY *et al.*, 1994; MIDORIKAWA *et al.*, 2008).

Existem fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que estão diretamente ligados à produção de aflatoxinas nos alimentos. Como fatores intrínsecos dos alimentos pode-se destacar o teor de umidade, a atividade de água (*a_w*) e a composição nutricional. Como fatores extrínsecos, que afetam diretamente a produção de aflatoxinas e no desenvolvimento de fungos, destacam-se: temperatura, umidade relativa, tempo de armazenamento, uso de fungicidas e o microclima (ARRUS *et al.*, 2005; KABAK *et al.*, 2006).

De acordo com Kabak *et al.* (2006) a composição nutricional dos alimentos — macronutrientes e micronutrientes —, influencia diretamente na curva de crescimento dos microrganismos, conseqüentemente no processo de deterioração e possível produção de aflatoxinas nos alimentos. Outro fator importante é o teor de umidade nos alimentos, pois pode influenciar o desenvolvimento de fungos e produção de aflatoxinas. É fundamental manter o teor de umidade o mais baixo possível, de preferência abaixo de 2% (LORINI *et al.*, 2002). A atividade de água (*a_w*) do alimento também interfere no metabolismo de fungos e é medida em uma escala que varia de 0 a 1, refletindo o grau em que a água está ligada aos compostos do substrato. Desta forma, a água não se encontra disponível para reações bioquímicas e para o

crescimento de micro-organismo. De forma geral, os alimentos estão seguros quanto ao crescimento fúngico e possível produção de aflatoxinas quando a atividade de água (a_w) é melhor que 0,70. Quanto ao pH, a faixa ideal para a produção de aflatoxinas é de pH entre 5 e 6 — faixa em que os fungos encontram condições favoráveis de crescimento (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

Dentre os fatores extrínsecos, a temperatura é o que mais afeta diretamente o desenvolvimento de fungos. A temperatura média ideal do alimento para o desenvolvimento de fungos produtores de aflatoxinas durante o armazenamento é de 30 °C em regiões tropicais — com faixa de temperatura ótima entre 25 e 28 °C. A umidade de equilíbrio entre o ambiente e o alimento é denominado de teor de umidade relativa (UR%); que está relacionada com a atividade de água (a_w) e resulta em ganho ou perda de umidade do alimento — favorecendo ou impedindo o crescimento de fungos (TANIWAKI e SILVA, 1996; ARRUS *et al.*, 2005). Além disso, o tempo de armazenamento do alimento também pode favorecer o crescimento de fungos que exigem baixa umidade e tempo prolongado para se desenvolver, pois, quanto maior o período de armazenagem maior a chance de ocorrer crescimento fúngico e a possível produção e contaminação do alimento por aflatoxinas (LOPEZ *et al.*, 2000; ARRUS *et al.*, 2005).

Muitos países têm estabelecido leis, tanto para o mercado interno, quanto para os produtos de importação e exportação, que especificam os limites aceitáveis de aflatoxinas em vários alimentos, numa tentativa de minimizar a exposição a aflatoxinas (Tabela 6). O Ministério da Saúde no Brasil estabelece através da Instrução Normativa N° 88, de 26 de março de 2021, os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. No Anexo II da Instrução Normativa N° 88, encontram-se os Limites Máximos Tolerados para Micotoxinas, e, no item 2.2 desse mesmo anexo, estão estabelecidos os limites máximos tolerados para Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em castanha-do-Brasil (Tabela 7).

Tabela 6 — Limites Máximos Tolerados para aflatoxinas em alimentos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

País	Aflatoxina B ₁	Aflatoxinas Totais
Brasil ^{1*}	10	10
Mercosul ^{2*}	-	20
União Europeia ³	5	10
Canadá ^{4*}	-	15

EUA ⁴	-	20
Austrália ⁴	-	15
Japão ⁴	10	10
China ⁴	-	20
Índia ⁴	30	30
Israel ⁴	5	15

Fonte: ¹Brasil, 2021; ²Mercosul, 2002; ³CE, 2010; ⁴FAO, 2004.

*Valores específicos para aflatoxinas em castanha-do-Brasil sem casca pronta para consumo (SOUZA, 2016).

Os produtos alimentícios que não constam na Instrução Normativa N° 88 de 2021, prevalece a legislação de 1974 do Ministério da Saúde, onde o limite tolerado de AFB₁ e AFG₁ é de 30 µg kg⁻¹ (ppb). Para alimentos de consumo animal como matéria prima e rações, o MAPA estabelece limite máximo tolerado de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ de 50 µg kg⁻¹ (ppb). Países integrantes do MERCOSUL, possuem legislação comum a todos os países, de limite máximo para a presença de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ de 20 µg kg⁻¹ (ppb). Porém, a Comissão Europeia estabeleceu limites para amendoins após processamento de 15 ppb para aflatoxinas totais e 8 ppb para aflatoxina B₁ (AFB₁). Para castanhas e frutas secas processadas, é estabelecido limite de 10 ppb para aflatoxinas totais e 5 ppb para AFB₁. A exportação brasileira de castanha-do-Brasil obteve uma queda de mais de 90% em 2003, logo após a União Europeia ter estabelecido esses novos limites de aflatoxinas totais e AFB₁. Este é um exemplo de que a contaminação por aflatoxinas nos alimentos não é somente um problema de segurança alimentar, mas há, como resultado, implicações econômicas significativas para a indústria agrícola no mundo (MERCOSUL, 2002; ANVISA, 2003; FAO, 2004; CE, 2010; BITTENCOURT *et al.*, 2012; MIDORIKAWA *et al.*, 2014).

Tabela 7 — Limites Máximos Tolerados para aflatoxinas em alimentos (µg kg⁻¹)

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg kg ⁻¹)
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	Castanha-do-Brasil em casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15

Fonte: Instrução Normativa N° 88, de 26 de março de 2021 (BRASIL, 2021).

2.2.3 Metodologia de detecção de aflatoxinas em alimentos

O Brasil tem sofrido com questionamentos quanto à qualidade de seus produtos agrícolas, principalmente de produtos como a castanha-do-Brasil, castanha de caju e o amendoim — devido ao risco de contaminação por micotoxinas. Esses questionamentos são feitos principalmente pelos Estados Unidos e Europa; essas castanhas são consumidas principalmente *in natura* e a contaminação, principalmente por aflatoxinas, pode atingir o consumidor final, por isso há uma grande preocupação quanto à origem e o processo de beneficiamento. A cadeia produtiva da castanha-do-Brasil tem sido ameaçada pelas dificuldades de adequação quanto aos padrões tecnológicos que são exigidos pelo mercado externo (MIDORIKAWA, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Nos últimos anos a qualidade da castanha-do-Brasil aumentou devido ao *Codex Alimentarius* — programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), criado com o objetivo de estabelecer normas internacionais na área de alimentos, incluindo padrões, diretrizes e guias sobre Boas Práticas e de Avaliação de Segurança e Eficácia (ANVISA, 2016). Porém, mesmo com essas recomendações a contaminação dessas castanhas exportadas por aflatoxinas ainda pode ocorrer. As regiões Norte do Brasil são as mais afetadas pela contaminação, pois, o extrativismo da castanha-do-Brasil é realizado por populações ribeirinhas e quase não há beneficiamento. Exemplos de como são identificados os pontos críticos de contaminação dentro do processo da cadeia produtiva é a secagem e o armazenamento dos produtos; ficam expostos a aeração natural para secagem, ou o armazenamento das castanhas ocorrem com elas ainda úmidas (MIDORIKAWA *et al.*, 2014).

Vários são os métodos que podem ser utilizados na análise e detecção de aflatoxinas nos alimentos. Grande parte desses métodos são compostos por etapas de extração, limpeza, separação, detecção, quantificação e confirmação (SCOTT, 1991). Um desses métodos é a identificação morfológica; apesar de ser um método convencional é um método lento que necessita de especialistas em morfologia e taxonomia de fungos. A diagnose morfológica identifica apenas o fungo micotoxigênico, porém não há identificação da toxina produzida por ele. Para detecção da micotoxina produzida por fungos, um dos primeiros métodos utilizados, na década de 1960, foi o da cromatografia em camada delgada (CCD). Ao longo dos anos, e com

o avanço tecnológico, surgiram novas metodologias e estudos de amostragem e validação, ocasionando uma maior precisão e confiabilidade dos resultados (GILBERT e ANKLAM, 2002; WHITAKER, 2003; MURPHY *et al.*, 2006). Os principais métodos utilizados hoje em dia para determinação de aflatoxinas em alimentos são: cromatografia em camada delgada, fluorimetria, cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas ou ao detector por ionização em chama, cromatografia líquida de alta eficiência, imunoenaios (ELISA), cromatografia de imunoafinidade, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e, mais recentemente, diagnose molecular (REN *et al.*, 2007; MIDORIKAWA *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2012; MIDORIKAWA *et al.*, 2014).

2.2.4 Contaminação da castanha-do-Brasil por fungos e Aflatoxinas

Os primeiros relatos na literatura sobre a contaminação de amêndoas e castanhas contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus* e da associação destes com a produção de aflatoxinas ocorreu na década de 1960 (SHIBAMOTO e BJELDANES, 2014). Almeida (1963), realizou um dos primeiros trabalhos sobre a exportação e importância na economia amazônica da castanha-do-Brasil, relatou possíveis contaminações na cadeia produtiva deste produto. Os danos mecânicos da castanha-do-Brasil são um dos principais fatores que favorecem a contaminação por fungos e a produção de aflatoxinas. Ocorrem por diversos motivos: queda dos ouriços no solo, ação de animais, transporte da floresta até os locais de armazenamento, recepção das usinas de beneficiamento, ou até no transporte da exportação, quando a castanha já foi beneficiada. Os danos mecânicos permitem a absorção de umidade do ambiente, além de permitir uma possível invasão, penetração e proliferação dos esporos de fungos no interior das castanhas (tornando-se o meio nutritivo), permitindo o desenvolvimento dos fungos e possíveis produção de aflatoxinas (PACHECO, 2007; PACHECO e SCUSSEL, 2009).

Fatores como secagem, teor de umidade e atividade de água são importantes na cadeia produtiva de castanha-do-Brasil. A secagem realizada de maneira inadequada pode ocasionar uma má distribuição do calor, o que pode ocasionar um teor de umidade na castanha maior do que o adequado — favorecendo ainda mais o crescimento de fungos. Quanto ao teor de umidade, é considerado seguro para a estabilidade da castanha-do-Brasil, um teor de umidade em torno de 13% — abaixo

da umidade crítica de 15%. Para a atividade de água (a_w) é importante observar que há fungos que toleram a_w menor que 0,70. As castanhas-do-Brasil desidratadas ($a_w < 0,70$), podem permanecer estáveis por um período maior na etapa de armazenamento (até 180 dias), principalmente se forem embaladas a vácuo (BRASIL, 2004; ARRUS *et al.*, 2005).

Outro fator importante para o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas é o período que castanha-do-Brasil fica armazenada, principalmente nas primeiras etapas da cadeia produtiva — desde a coleta, diversos tipos de transporte e beneficiamento —; pois, essas etapas ocorrem em ambientes que possuem umidade e temperatura elevadas e, portanto, favoráveis à contaminação fúngica, com a consequente produção de aflatoxinas. Segundo Arrus *et al.* (2005) uma importante estratégia para evitar a contaminação de castanha-do-Brasil por aflatoxina é a prevenção do crescimento do fungo após a coleta do produto mediante controle adequado de temperatura e umidade relativa do ar durante o armazenamento. Nunes *et al.* (2003) relatam que o fungo pode não estar presente no produto, mas suas micotoxinas podem permanecer, pois estas não são facilmente eliminadas. Por isso a importância de se utilizar todas as medidas de boas práticas de fabricação, a fim de se evitar este problema (BRASIL, 2017).

Há uma preocupação e uma necessidade de aprimoramento das condições de armazenagem de castanha-do-Brasil na floresta, no beneficiamento e no transporte em todas as etapas da cadeia produtiva desse produto. Existem vários tipos de armazenagem para alimentos à granel ou embalados, acondicionados em silos ou em armazéns graneleiros, em atmosferas naturais ou controladas. Dentre as atmosferas controladas os gases mais utilizados são o nitrogênio, o gás carbônico e o gás ozônio. Devido às condições precárias de armazenagem da castanha-do-Brasil e do seu risco quanto à contaminação em diversas etapas da cadeia produtiva, o gás ozônio surge como uma alternativa, pois trata-se de um gás antimicrobiano, com alto potencial oxidante, sendo capaz de degradar micotoxinas, além de não deixar resíduo nos alimentos (KIM *et al.*, 1999a; AGRIOPOULOU *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017).

2.3 Ozônio

2.3.1 Histórico

De acordo com o livro "Ozone" de 1920 do físico-químico E. K. Rideal, que faz o primeiro panorama histórico das pesquisas com ozônio, os primeiros relatos do ozônio surgiram na Holanda em 1783 com um cientista holandês chamado Martin Van Marum, que evidenciou que o ar submetido a uma série de faíscas elétricas em sua máquina eletrostática adquiria um forte odor característico. Em 1801, Cruickshank demonstrou que o gás produzido pela decomposição eletrolítica de ácidos diluídos em certas condições, possuía certo odor semelhante ao demonstrado por Martin Van Marum. Esses dois pesquisadores não elucidaram e não foram a fundo sobre a origem de tal substância, apenas mostraram os resultados de seus experimentos. Em 1840 o físico alemão Schönbein demonstrou que o cheiro característico do oxigênio em descargas elétricas e eletrólise na verdade era um novo gás, o qual foi nomeado por ele de "ozone", palavra derivado do grego "ὄζειν", ozein — que significa "cheiro" (RIDEAL, 1920).

Bequerel e Freny foram os primeiros a demonstrar que o oxigênio poderia ser convertido em ozônio. Utilizaram um experimento simples: um tubo de descargas elétricas contendo oxigênio (O_2) para geração de ozônio (O_3); com a adição de solução de Iodeto de Potássio (KI) o ozônio era consumido na medida em que era formado (RIDEAL, 1920; OLIVEIRA e WOSCH, 2012). Pesquisas sobre as propriedades oxidantes do ozônio foram conduzidas por Hunt em 1848, o que lhe permitiu postular que a estrutura molecular do ozônio é formada por um triângulo triatômico de oxigênio, uma forma alotrópica de O_2 . O primeiro gerador de ozônio propriamente dito, foi desenvolvido por Werner von Siemens na Alemanha em 1857, baseado no efeito corona – descarga elétrica produzida pela ionização de um fluído nas redondezas de um condutor. Em 1888 a primeira patente foi emitida por Fewson nos Estados Unidos, que tinha por finalidade remover odores provenientes de esgotos (GRAHAM *et al.*, 1997; NOVAK e YUAN, 2007).

Um dos primeiros usos do ozônio como sanitizante foi com o tratamento de água, onde o primeiro experimento com essa finalidade foi instalado em 1893 na Holanda e posteriormente em 1906 começaram os estudos na Universidade de Sorbonne em Paris, França. Estudos com este novo composto começaram com o químico Marius Paul Otto, que evidenciou em sua tese, "*Recherches sur l'ozone*" –

Pesquisas em Ozônio, a ação antimicrobiana do ozônio e deu início a sua utilização em estações de tratamento de água e esgoto em 1907, criando a “*Compagnie des Eaux et de l’Ozone*” (CEO) – Companhia de Água e de Ozônio. O ozônio já era utilizado em mais de 100 estações de tratamento na França em 1936 e em 40 diferentes lugares do mundo. Em escala comercial, no tratamento de água, o ozônio foi instalado em 1940 nos Estados Unidos (RIDEAL, 1920; GRAHAM *et al.*, 1997; NOVAK e YUAN, 2007).

A ozonização como sanitizante já é uma tecnologia que vem sendo desenvolvida desde meados do início do século XX. Como exemplo temos a desinfecção de água na França há mais de 100 anos. Em pouco mais de um século diversas áreas do conhecimento adotaram pesquisas com ozônio. Na conservação de alimentos o ozônio foi utilizado pela primeira vez em 1909, em câmaras frias de estocagem de carne, que àquela época não atingiu grandes proporções como uma agente conservante devido seu custo inicial comparado com outros produtos mais baratos como, por exemplo, o cloro (CHIATTONE *et al.*, 2008). Em 1972 utilizam o ozônio para o tratamento de águas residuais na Alemanha. Já em 1977 na Rússia o uso do ozônio como agente microbicida em alimentos tornou-se evidente, utilizaram-se do gás para reduzir *Salmonella* em ovos com casca. No Brasil, os primeiros experimentos com ozônio começaram em 1983, segundo Dalsasso (1999), quando surgiu a necessidade de algumas estações de tratamento de água buscar formas alternativas para o tratamento, substituindo métodos convencionais como pré-cloração e pré-aeração de águas superficiais (SANTOS, 2008).

O ozônio foi declarado como uma substância segura (GRAS – "Generally Reconined as Safe"), pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1982, sendo seu uso permitido apenas como sanificante para água engarrafada. Alguns anos mais tarde a utilização do ozônio como aditivo direto em alimentos foi permitido pelo FDA; possibilitando assim o uso do ozônio como agente antimicrobiano no tratamento, armazenamento e etapas de processamento de alimentos (GRAHAM *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999a; SOPHER *et al.*, 2002; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; FDA, 2013).

Atualmente essa tecnologia tem sido destinada para diversos fins, tais como: tratamento de águas de piscinas, sanitização de recipientes de água, alimentos, plantas, equipamentos, conservação de frutas e hortaliças etc. Outras áreas do conhecimento como a medicina, têm começado a adotar o uso do ozônio na chamada ozonioterapia, em diversas pesquisas referentes à saúde humana (MENDEZ *et al.*,

2003; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2008; OLIVEIRA-JUNIOR e LAGES; 2012). A Tabela 8 traz um panorama da história da aplicação e regulação do ozônio ao longo dos anos.

Tabela 8 — História da aplicação e regulação do ozônio

Ano	Realizações
1839	Descoberta do ozônio por Schönbein.
1895	A fórmula molecular do ozônio é determinada por Soret.
1886	O potencial do ozônio para desinfecção de água poluída é reconhecido na Europa.
1891	Os resultados de testes feitos na Alemanha mostram que o ozônio é eficaz contra bactérias.
1893	Primeira aplicação em grande escala usando ozônio para água potável nos Países Baixos.
1906	A França encomenda sua primeira usina municipal de ozônio para água potável.
1909	Ozônio usado na preservação de carne na Alemanha.
1914	O interesse pelo ozônio para o tratamento da água começa a diminuir devido à pesquisa e produção de gás cloro, bem mais barato nessa época (custos energéticos).
1936	Ozônio usado para depurar mariscos na França.
1939	Ozônio utilizado para impedir o crescimento de levedura e mofo durante o armazenamento de frutas.
1942	Ozônio usado em depósitos de ovos e em depósitos de queijos nos EUA.
1957	Ozônio implementado para oxidação de ferro e manganês em água potável na Alemanha.
1964	A floculação espontânea em câmaras de contato com ozônio leva a França a construir uma planta de ozônio para melhorar a remoção de partículas.
1965	Ozônio empregado para controlar a cor de águas superficiais na Irlanda e no Reino Unido. Ozônio usado para oxidar micropoluentes, como compostos fenólicos e vários pesticidas na Suíça.
1970	Ozônio explorado para controle de algas na França
1982	FDA concede status GRAS (Generally Recognised as Safe) na desinfecção com ozônio em água engarrafada.
1987	600 MGD (milhões de galões por dia) planta de ozonização em linha, na cidade de Los Angeles após sete anos de testes-piloto.
1995	Aprovação do ozônio pelo FDA como uma substância GRAS para desinfecção de água engarrafada.
1997	O Painel de Especialistas, convocado pelo Instituto de Pesquisa de Energia Elétrica (EPRI), afirma que o ozônio é um GRAS para contato direto com alimentos. A FDA não se opõe a esta afirmação GRAS.
1999	O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) rejeita um protocolo de ozônio para aplicação de carne, citando a declaração GRAS de 1982 para desinfecção de água engarrafada na qual a FDA declarou que "qualquer outro uso deve ser regulado por uma petição de aditivo alimentar".
2000	Uma petição de aditivo alimentar (FAP) apresentada pelo EPRI solicita a aprovação do ozônio pelo FDA para contato direto com alimentos.
2001	A FDA aprova o ozônio como um aditivo alimentar direto, como um agente antimicrobiano (Federal Register, Vol. 66, no. 123, 26 de junho). O Instituto Americano da Carne registra uma carta com o FSIS (Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar da FDA) dos EUA solicitando uma interpretação do escopo da regra do FDA. Em sua resposta, o FSIS determina que, "O uso de ozônio em produtos de carne e aves, incluindo o tratamento de produtos prontos para consumo de carne e aves imediatamente antes da embalagem, é aceitável", e que não há "problemas de rotulagem no produto tratado".
2004	A FDA emite orientações e recomendações industriais para processadores de suco de maçã ou cidra sobre o uso de ozônio para fins de redução de patógenos.

Fonte: Tiwari e Rice (2012).

2.3.2 Propriedades físico-químicas do Ozônio

O ozônio (O_3), ou oxigênio triatômico, é uma molécula instável formada pela adição de um átomo de oxigênio à molécula diatômica de oxigênio (O_2), que pode ser produzido naturalmente como resultado de relâmpagos ou radiação ultravioleta (KIM *et al.*, 1999a). Sinteticamente, a nível industrial, o gás ozônio é gerado pelo método de descarga elétrica no gás oxigênio, conhecido como descarga por efeito corona — Figura 6 —, o mesmo utilizado no primeiro equipamento criado por Siemens em 1857 (GLAZE, 1987; BALAKRISHNAN *et al.*, 2002; OLIVEIRA e WOSCH, 2012).

O efeito corona, na geração de ozônio, consiste na passagem de gás contendo oxigênio puro ou outras misturas de ar, através de alta energia em descarga elétrica. Moléculas de oxigênio são dissociadas e produzindo radicais livres altamente reativos, que ao reagir com outras moléculas de oxigênio formam o ozônio (O_3), como indicado na Figura 7 (TRAMBARULO *et al.*, 1953; KIM *et al.*, 1999a; NOVAK e YUAN, 2007).

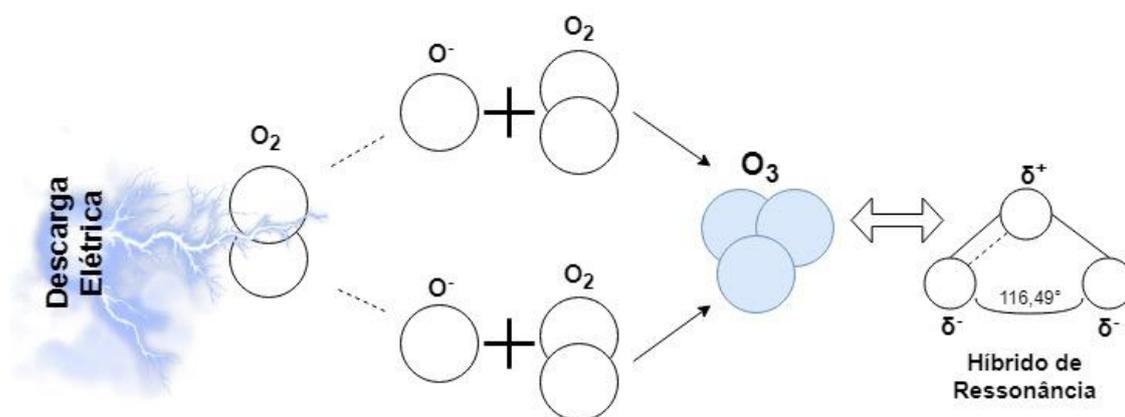


Figura 6 — Mecanismo de formação do Ozônio (O_3) a partir de moléculas de Oxigênio (O_2) e o ângulo de formação em um dos híbridos de ressonância do ozônio.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gás ozônio possui um elevado potencial oxidativo que o destaca como um ótimo sanitizante em alimentos. Esse potencial oxidativo é o terceiro mais poderoso encontrado na natureza, a nível comercial é o segundo, ficando atrás apenas do flúor (Tabela 9). O potencial oxidativo do ozônio é de aproximadamente 2,07 mV, enquanto o do flúor consiste em aproximadamente 3,06 mV. Já o cloro utilizado na sanitização de alimentos possui um potencial de aproximadamente 1,36 mV (KIM *et al.*, 1999a; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; MAHMOUND e FREIRE, 2007). Este elevado poder de oxidação do ozônio confere uma elevada capacidade na desinfecção e esterilização

de alimentos, com um menor tempo de contato e menores concentrações, tornando o uso do ozônio como um sanitizante potencial na indústria.

Tabela 9 – Diferentes agentes oxidantes e os respectivos potenciais de oxidação

Agente Oxidante	Potencial de Oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,5
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Güzel-Seydim *et al.* (2004); Mahmoud e Freire, (2007).

2.3.3 Características do Ozônio em meio aquoso

O ozônio é um gás instável, possui um tempo de meia vida curto (aproximadamente 20 min em água a 20 °C), é parcialmente solúvel em água e, assim como a maioria dos gases, aumenta sua solubilidade à medida que a temperatura decresce (KIM *et al.*, 1999a; WYSOK *et al.*, 2006). O ozônio segue a lei de Henry, que afirma que um gás em solução, em uma dada temperatura, é linearmente proporcional a pressão parcial do gás. A taxa de solubilidade do ozônio, segundo Khadre *et al.* (2001), aumenta conforme diminui a temperatura da água. Khadre *et al.* (2001) apresentaram um resultado de um logaritmo negativo quando se relaciona a dissolução de ozônio em água com a temperatura variando na taxa de 0,5°C a 43°C. A Tabela 10 mostra a solubilidade do ozônio em água de acordo com a temperatura. Essa solubilidade do ozônio em meio aquoso dependerá também do conteúdo de matéria orgânica no meio, pois quanto menor a concentração de matéria orgânica, maior será o tempo de meia vida do ozônio em água (GRAHAM *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999b).

Kim (1998) relata que quanto maior a quantidade de matéria orgânica presente na água menor a estabilidade do gás. Em experimento, esse autor borbulhou ozônio em água destilada e em água de torneira e monitorou as amostras a 25°C durante 8 minutos. A concentração de ozônio diminuiu em uma taxa mais acentuada na água de torneira em relação a água destilada, demonstrando que o ozônio degrada em maior proporção em água de torneira que em água pura.

Tabela 10 – Solubilidade do gás ozônio em meio aquoso de acordo com a temperatura

Temperatura (°C)	Solubilidade L O ₃ / L H ₂ O
0	0,640
15	0,456
27	0,270
40	0,112
60	0

Fonte: Rideal, 1920; Güzel-Seydim *et al.*, 2004; Wysok *et al.*, 2006.

A decomposição do ozônio em meio aquoso é caracterizada por uma rápida diminuição da concentração inicial, com uma fase posterior na qual a concentração de ozônio diminui segundo uma cinética de primeira ordem, sendo que os radicais hidroxila (OH) são os principais produtos desta decomposição (KIM *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004). O ozônio pode reagir com compostos orgânicos em solução aquosa através da reação direta: o próprio ozônio molecular atua; e, da reação indireta: envolve reações com os radicais hidroxila (OH), formados da decomposição do ozônio em meio aquoso, descritos acima. Essa reação indireta não é seletiva, pois ela é capaz de promover um ataque a compostos orgânicos 10⁶-10⁹ vezes mais rápido que alguns agentes oxidantes como, por exemplo, o H₂O₂ e o próprio ozônio. Predominantemente processos de desinfecção ocorrem via ozônio molecular, já processos de oxidação podem ocorrer tanto por meio do ozônio molecular, via direta, como dos radicais hidroxila, via indireta — Figura 7 (ALMEIDA *et al.*, 2004; DI BERNADO e DANTAS, 2005; SILVA *et al.*, 2011).

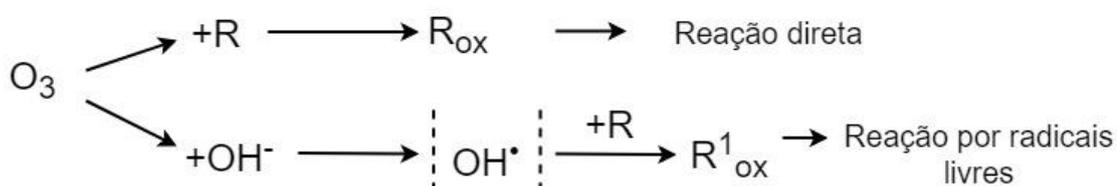


Figura 7 — Reação de como o ozônio pode agir em relação a outros compostos (R) em solução aquosa.

Fonte: Eriksson *et al.* (2007).

Outro fator importante que leva à rápida decomposição do ozônio em meio aquoso e à formação de radicais hidroxila (OH), assim como outros compostos oxidantes com distintas reatividades, são ambientes que apresentam altos níveis de pH. As alterações na eficiência do processo de desinfecção, quando há uma

representativa variação no pH do meio, relacionam-se com mudanças na taxa de decomposição do ozônio (KIM *et al.*, 2003; DI BERNADO e DANTAS, 2005). Segundo Kim (1998) e Khadre e Yousef (2001), a estabilidade do ozônio em água decresce quando o pH do meio aumenta; quando esse pH é superior a 8,0 praticamente metade do ozônio introduzido é decomposto em várias formas intermediárias de oxigênio, num período de 10 min (KIM *et al.*, 2003; WYSOK *et al.*, 2006).

A potencialidade do ozônio, na forma de gás e dissolvido em água, na indústria alimentícia é grande, pois trata-se de um dos mais potentes sanitizantes na esterilização de bactérias em alimentos. As vantagens da utilização do ozônio na indústria alimentícia são grandes, pois descarta a necessidade de manipulação, armazenamento (é produzido *in loco*) ou de recipientes de produtos químicos, não gerando resíduos, pois sua autodecomposição é rápida convertendo-se em oxigênio, não deixando resíduos nos alimentos tratados (KIM *et al.*, 1999a; NAITO e TAKAHARA, 2006).

2.3.4 Segurança do Trabalho na aplicação do Ozônio

Na aplicação do ozônio deve-se ter cuidado especial quanto ao local em que o gás será injetado, pois o ozônio em altas concentrações é um gás tóxico ao homem e aos animais, sendo o primeiro alvo o trato respiratório (HOOF, 1982; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004). O uso de um sistema seguro é de importância primária na aplicação do ozônio na indústria de alimentos. São essenciais sistemas de detecção e destruição do gás ozônio para a segurança dos trabalhadores. É necessário a instalação no local de ozonização um detector com célula ajustada para medição da concentração do gás na faixa entre 0,01 e 100 ppm; além disso, outro equipamento essencial é o destruidor térmico ou catalítico de ozônio que deve ser instalado com a finalidade de acelerar a decomposição do ozônio residual na saída do sistema (DAMEZ *et al.*, 1991; KHADRE *et al.*, 2001).

Vale ressaltar que essa toxicidade do ozônio desaparece quando este se decompõe em oxigênio. No Brasil, a exposição ao gás ozônio segue a determinação do Ministério do Trabalho e Emprego por meio da Norma Regulamentadora N° 15 (NR 15), aprovada pela Portaria N° 3.214/78, que disponibiliza os limites de tolerância do ozônio (descrito como Ozona na norma), em atividades/operações que o trabalhador poderá ficar exposto; diversos institutos (Tabela 11) realizaram estudos referentes aos

níveis de exposição ao gás ozônio. O limite do gás para trabalhos de até 48 horas semanais é de 0,08 ppm ou 0,16 mg/m³ (BRASIL, 1978).

Tabela 11 – Referência dos Níveis de Exposição para Ozônio

Instituição	Concentração máxima permitida (ppm) no ar	Tempo de exposição para o ser humano em ar ozonizado
Food and Drug Administration (FDA)	0,05	8 hs
Occupational Safety and Health Administration (OSHA)	0,10	8 hs
National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH)	0,10	Permanente
Environmental Protection Agency (EPA)	0,08	8 hs
Ministério do Trabalho e Emprego (Brasil) – Portaria 3214/78	0,08	48/semana

Fonte: Gonçalves, 2009.

2.4 Ozônio no armazenamento de castanha-do-Brasil

Deve-se observar que para a maioria dos alimentos, suas embalagens devem conter o mínimo possível de oxigênio, pois o objetivo é retardar o crescimento microbiano aeróbio e reduzir o grau de oxidação (GODOY, 1995). Para se obter um eficiente processo de atmosfera modificada, é necessário o monitoramento de parâmetros como: análise da composição gasosa no interior da embalagem, análises físico-químicas e microbiológicas e avaliação sensorial durante a vida útil do produto. Atmosfera modificada no armazenamento pode ser definida como um dos métodos de preservação dos alimentos que mantém a qualidade natural de produtos alimentares, além de alargar a vida de prateleira (SOUZA e MENEZES, 2004; AGUAYO *et al.*, 2006).

O processo de prevenção e controle dos diversos tipos de micotoxinas, dentre as quais as aflatoxinas, após mais de 50 anos da sua descoberta, ainda não apresentaram um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva (PRADO *et al.*, 2006). Isso se deve ao fato de que muitas micotoxinas se destacam por apresentar significativa estabilidade química, acarretando sua persistência no produto, mesmo após a remoção dos fungos durante as etapas do processamento (BITTENCOURT, 2005). Nesse cenário, diversos pesquisadores têm estudado técnicas que sejam

eficazes na prevenção e controle de aflatoxinas em alimentos. Vários procedimentos têm sido propostos com o intuito de minimizar a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas (OGUZ *et al.*, 2002) e levam em consideração estratégias de descontaminação e detoxificação. Dentre os diversos procedimentos propostos tem-se o tratamento com amônia, com bissulfito de sódio, adição de adsorventes e ozonização. A utilização do ozônio como alternativa no controle de aflatoxinas em alimentos tem sido objeto de inúmeros estudos, inclusive avaliando esse gás como agente fungicida e na degradação dessas substâncias (MCKENZIE *et al.*, 1997; MCKENZIE *et al.*, 1998; PRUDENTE e KING, 2002; INAN *et al.*, 2007; ALENCAR *et al.*, 2012; SAHAB *et al.*, 2013; AGRIOPOULOU *et al.*, 2016).

O ozônio, que se destaca por seu elevado potencial oxidativo, pode atuar na inativação ou inibição do desenvolvimento de espécies de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas diversas *commodities*. Sabe-se que em produtos agrícolas o gás ozônio inibe ou retarda o desenvolvimento de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Mucor*, dentre outros (RAILA *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2006; ALENCAR *et al.*, 2012; SAVI e SCUSSEL, 2014; SANCHEZ *et al.*, 2016), além de outros microrganismos, como vírus e bactérias (KIM *et al.*, 1999a; KHADRE *et al.*, 2001; AGUAYO *et al.*, 2006; ÖZTEKIN *et al.*, 2006; WHANGCHAI *et al.*, 2006).

A inativação ou inibição do desenvolvimento de microrganismos pelo ozônio, a partir da oxidação de componentes celulares vitais, é um processo considerado complexo, em que o gás atua sobre constituintes da membrana e da parede celular, como os ácidos graxos insaturados, assim como elementos do conteúdo celular, como enzimas e ácidos nucleicos. Os microrganismos são inativados pelo rompimento da célula, em decorrência da ação do ozônio molecular ou dos radicais livres gerados durante a decomposição do gás (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; PASCUAL *et al.*, 2007; CULLEN *et al.*, 2009). Segundo Victorin (1992), existem dois mecanismos do ozônio na destruição de biomoléculas. No primeiro mecanismo, ocorre a oxidação de grupos sulfidril e aminoácidos de enzimas, proteínas e peptídeos pelo ozônio. No segundo mecanismo, o gás atua como agente oxidante de ácidos graxos polinsaturados a peroxiácidos. É importante mencionar que o ozônio foi classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos e liberado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em alimentos, tanto na forma gasosa quanto dissolvido em água, como agente antimicrobiano (FDA, 2001).

No que se refere degradação de aflatoxinas em alimentos pelo ozônio gasoso, encontram-se na literatura relatos nos quais esse gás é testado como composto capaz de oxidar essa toxina. De acordo com McKenzie *et al.* (1998), o ozônio é capaz de oxidar as aflatoxinas, e, os produtos da reação são aldeídos, cetonas, ácidos e dióxido de carbono. Prudente e King (2002) avaliaram a eficácia do processo de ozonização na degradação de aflatoxina em grãos de milho com umidade entre 10 e 12% b.u. A aplicação do ozônio ocasionou redução de 92% na concentração de aflatoxinas no produto. Inan *et al.* (2007) estudaram o poder detoxificante do gás ozônio sobre aflatoxinas em pimenta vermelha. Os autores testaram três concentrações do gás ozônio (16; 33 e 66 mg L⁻¹) e quatro períodos de exposição (7,5; 15; 30 e 60 min) e obtiveram redução de 80 e 90% de Aflatoxina B₁, após 60 min, para as concentrações do gás ozônio de 33 e 66 mg L⁻¹, respectivamente. Alencar *et al.* (2012) ozonizaram grãos de amendoim na concentração de 21 mg L⁻¹, por até 96 h e verificaram redução nos teores de aflatoxinas totais e aflatoxina B₁ equivalente a 30 e 25%, respectivamente. Luo *et al.* (2014) ozonizaram grãos de milho contaminados com 83 ppb de Aflatoxina B₁. Foi testada a concentração do gás de 90 mg L⁻¹, por 20 e 40 min, com reduções da concentração da toxina equivalentes a 78,2 e 88,1%, respectivamente.

Outra possibilidade de aplicação do ozônio é em meio aquoso, tendo sido testado na inativação de microrganismos em produtos de origem vegetal e na inativação de micotoxinas, inclusive aflatoxinas (AGRIOPOULOU *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017; MAXIMIANO *et al.*, 2018). Agriopoulou *et al.* (2016) estudaram a cinética de decomposição de aflatoxinas em meio aquoso, em diferentes combinações de concentração e temperatura. Esses autores verificaram que degradação mais rápida nas aflatoxinas B₁ e G₁, em comparação com as aflatoxinas B₂ e G₂. O gás ozônio é parcialmente solúvel em água e, assim como a maioria dos gases, aumenta sua solubilidade à medida que a temperatura decresce (KIM *et al.*, 1999a; WYSOK *et al.*, 2006). A solubilidade do ozônio em meio aquoso depende do conteúdo de matéria orgânica no meio, pois quanto menor a concentração de matéria orgânica, maior é o tempo de meia vida do ozônio em água (GRAHAM *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999b). O ozônio pode reagir com compostos orgânicos em solução aquosa através da reação direta: o próprio ozônio molecular atua; e, da reação indireta: envolve reações com os radicais hidroxila (OH), formados da decomposição do ozônio em meio aquoso. Predominantemente processos de desinfecção ocorrem via ozônio

molecular, já processos de oxidação podem ocorrer tanto por meio do ozônio molecular, via direta, como dos radicais hidroxila, via indireta (ALMEIDA *et al.*, 2004; DI BERNADO e DANTAS, 2005; SILVA *et al.*, 2011).

Diante do elevado potencial oxidativo do gás ozônio — aproximadamente 2,07 mV —, e dos radicais hidroxilas presentes na água ozonizada (KIM *et al.*, 1999a), faz-se necessário o estudo aprofundado das características morfológicas e genéticas dos fungos produtores de aflatoxinas; pois, como relata Fountain *et al.* (2016), fungos toxigênicos e atoxigênicos empregam mecanismos distintos para remediar o dano oxidativo, e, um desses mecanismos em fungos toxigênicos é a produção de aflatoxinas e a biossíntese de aflatrem para remediar o estresse oxidativo consumindo o excesso de oxigênio. A produção de metabólitos secundários tais como as aflatoxinas, pode aumentar a tolerância ao estresse oxidativo de *Aspergillus* seção *flavi* (ROZE *et al.*, 2013). Por isso, é importante o estudo das relações entre o estresse oxidativo propiciado pelo ozônio, em diferentes concentrações e tempo de exposição, com a expressão gênica de diferentes isolados de *Aspergillus*, produtores e não produtores de aflatoxinas. De acordo com Fountain *et al.* (2014) e Fountain *et al.* (2016), genes biossintéticos da aflatoxina e genes das enzimas antioxidantes são co-expressos e altamente correlacionados com a biomassa fúngica sob estresse oxidativo propiciado por H₂O₂. Isso sugere que esses metabólitos secundários podem ser produzidos como parte de respostas coordenadas do estresse oxidativo em *A. flavus*, juntamente com a expressão do gene da enzima antioxidante e a regulação do desenvolvimento.

Apesar de serem encontrados na literatura diversos trabalhos com o uso de ozônio como agente antimicrobiano e na degradação de micotoxinas, há carência de relatos em que essa tecnologia é testada em castanha-do-Brasil, quer na forma gasosa ou em meio aquoso. Silva *et al.* (2013) avaliaram a eficácia da água ozonizada no controle de *A. flavus* em castanha-do-Brasil e indicaram grande potencial dessa técnica na inativação dos microrganismos. Ressalta-se que a castanha-do-Brasil se destaca pelo elevado teor de lipídeos, o que pode acelerar o processo de degradação do ozônio. Então, é importante a realização de pesquisa com o intuito de avaliar a eficácia do ozônio gasoso e em meio aquoso na inativação de fungos aflatoxigênicos, na degradação de aflatoxinas em castanha-do-Brasil e possíveis efeitos na qualidade do produto, tendo em vista a saúde do consumidor e a importância comercial desse

produto para que assim, seja possível estabelecer binômios “concentração *versus* período de exposição”.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do gás ozônio dissolvido na água em diferentes combinações de pH, concentração e período de exposição no controle de *Aspergillus* seção *Flavi* inoculado em castanha-do-Brasil, a caracterização molecular e filogenética deste fungo, e na cinética de decomposição do ozônio em meio aquoso, além de possíveis alterações na qualidade de castanha-do-Brasil.

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar molecular e filogeneticamente um isolado de *Aspergillus* seção *Flavi*;
- ✓ Avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio dissolvido em meio aquoso em diferentes combinações de pH e teor de matéria orgânica;
- ✓ Avaliar a capacidade da água ozonizada de inativar fungos aflatoxigênicos em castanha-do-Brasil em diferentes combinações de pH e período de exposição;
- ✓ Avaliar possíveis alterações na qualidade da castanha-do-Brasil em decorrência da ozonização, em diferentes combinações de pH e período de exposição;
- ✓ Estabelecer combinações de concentração do ozônio e períodos de exposição adequados para garantir a segurança do produto.

3.2 Hipóteses

- ✓ A cinética de decomposição do gás ozônio dissolvido em meio aquoso pode ser alterado pelo pH do meio e teor de matéria orgânica.
- ✓ A água ozonizada é capaz de inativar *Aspergillus* seção *Flavi* em diferentes combinações de pH e período de exposição;
- ✓ É possível estabelecer combinação de concentração do ozônio e período de exposição capaz de inativar fungos aflatoxigênicos sem afetar a qualidade do produto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas e de Análise de Alimentos, localizados na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, FAV, no Laboratório de Micologia, do Departamento de Fitopatologia, todos na Universidade de Brasília, UnB, Brasília, Distrito Federal, e no Laboratório de Fitoquímica, da Embrapa Agrossilvipastoril, em Sinop, Mato Grosso.

Foi utilizado lote de castanha-do-Brasil descascada com teor de umidade de 4,3% (Safrá 2018/19), obtidas da Cooperativa dos Produtores Agropecuários da região Norte do Estado do Mato Grosso (COOPERVIA) em todas as etapas do trabalho.

4.1 ETAPA I: Caracterização molecular de uma espécie de *Aspergillus* seção *Flavi*

4.1.1 Isolamento do isolado fúngico

Para realização do presente estudo foi utilizado, para caracterização molecular e filogenética, um isolado proveniente de amendoim do Distrito Federal coletado em 2018, catalogado como UNBDF01 e posteriormente classificado como CCUB1405 (Figura 8). Realizou-se o isolamento a partir do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) com sintomas e sinais de *Aspergillus* sp., no qual conídios foram retirados dos tecidos dos grãos contendo sinais do patógeno e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura *Aspergillus flavus* e *parasiticus* Agar (AFPA) — conforme a metodologia utilizada por Pitt e Hocking (2009). Para garantir a uniformidade genética do isolado, as culturas foram obtidas a partir da ponta de uma única hifa, multiplicadas nos meios de cultura AFPA e BDA (Agar Batata Dextrose).

A utilização de um isolado de amendoim foi necessária devido à confirmação — realizada por HPLC de acordo com Blesa *et al.* (2003) —, de sua toxigenicidade, ou seja, um isolado produtor de aflatoxinas, principalmente a aflatoxina B₁. Fatores essenciais para avaliação do efeito detoxificante da água ozonizada em castanha-do-Brasil contaminada com aflatoxinas. Em decorrência da pandemia de COVID-19 não foi possível determinar molecular e filogeneticamente outros isolados fúngicos

provenientes da castanha-do-Brasil de diferentes regiões obtidos — um dos objetivos iniciais do estudo —, sendo necessário recorrer ao primeiro isolado identificado, proveniente de amendoim, para realização da avaliação do uso potencial da água ozonizada neste trabalho.

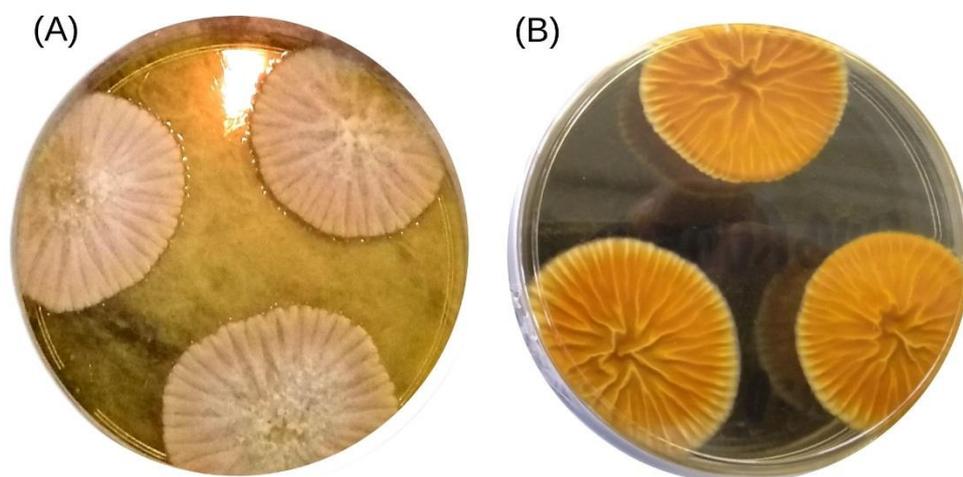


Figura 8 — Isolado de *Aspergillus* seção *Flavi* em meio de cultura seletivo AFPA, (A) parte superior da placa e (B) parte inferior da placa, classificado como CCUB1405 em 2018, proveniente de amendoim coletado no Distrito Federal.

Fonte: Acervo Pessoal.

4.1.2 Microscopia Óptica do Isolado

As imagens de microscopia óptica foram obtidas a partir dos equipamentos: Leica DM2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), com câmara clara e sistema de captura de imagens acoplado, com objetiva de 40x; e pelo estereomicroscópio Leica MDG33 com iluminação incidente (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.1.3 Armazenamento do Isolado

A partir de colônias puras, o armazenamento do isolado foi feito retirando-se partes de colônias desenvolvidas em meio AFPA e preservados em solução salina (NaCl 0,9%) com glicerol 50% e mantidos a -80 °C.

4.1.4 Extração do DNA genômico

O isolado foi cultivado durante sete dias em placas de Petri contendo BDA coberto com papel celofane esterilizado. Após o crescimento das colônias, o micélio

foi removido com auxílio de um palito de madeira e colocado em microtubos de 1,5 ml contendo 30 µl de tampão Tris-EDTA (TE). A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Inc.) conforme protocolo adaptado por Pinho *et al.* (2012). A presença de DNA foi determinada por meio da eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a confirmação, as amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

4.1.5 Amplificação e purificação do DNA

Para cada reação de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: 6,25 µl de MyTaq, 0,3 µl de cada iniciador (senso e anti-senso), 1 µl de DNA genômico (25 ng/µl) e 4,25 µl de água ultrapura. Para a identificação, foram sequenciadas as regiões LSU, ITS e BenA do isolado. Para a amplificação das regiões LSU e ITS foram utilizados os primers LR05 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') e V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3'). Já para a região BenA os primers utilizados foram Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') — Tabela 12.

Tabela 12 — Lista de iniciadores utilizados para amplificação de diferentes regiões gênicas do isolado de *Aspergillus* spp.

Iniciador	Região gênica	Sequência do iniciador (5' - 3')	Referência
Bt2a	β-tubulina (BenA)	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	(GLASS e DONALDSON, 1995)
Bt2b	β-tubulina (BenA)	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	(GLASS e DONALDSON, 1995)
V9G	rDNA	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	(HOOG e GERRITS VAN DEN ENDE, 1998)
LR5	rDNA	TCCTGAGGGAACTTCG	(VILGALYS e HESTER, 1990)

Foram utilizados diferentes parâmetros durante o ciclo da PCR para cada região gênica, a saber:

- β-tubulina (BenA): Desnaturação inicial a 95°C por 1,5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 55 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

- ITS e LSU: Desnaturação inicial a 95°C por 1,5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis com 2% de agarose corados com corante fluorescente GelRed e visualizados sob luz UV para verificar o tamanho e pureza das amplificações. Os produtos de PCR foram tratados com as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase para remoção dos resíduos de dNTPs e iniciadores seguindo o protocolo do fabricante (ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent — Thermo Fisher Scientific) e sequenciados pela Macrogen Inc., Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>). As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas com o software Geneious versão 11.1.5 (KEARSE *et al.*, 2012). As sequências foram analisadas quanto a presença de posições ambíguas, as quais foram corrigidas manualmente com comparação das sequências senso e anti-senso.

4.1.6 Análises filogenéticas

Após sequenciamento, todas as fitas consenso geradas foram comparadas com sequências já depositadas no GenBank (BENSON *et al.*, 2005) utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível online através da plataforma NCBI (National Center of Biotechnology Information) (MADDEN *et al.*, 1996) para aproximação da identidade taxonômica — Tabela 13.

As sequências foram alinhadas utilizando a estratégia E-INS-i disponível no software MAFFT (KATO e STANDLEY, 2013), indicada para alinhamento de regiões gênicas compostas de múltiplos domínios conservados (observado nas porções exônicas de marcadores codantes e porções dos marcadores ribossomais) e a presença de longos gap's (presentes nas porções intrônicas e espaçadores dos marcadores ribossomais). As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando a otimização por Inferência Bayesiana.

Na análise, a busca pela melhor árvore foi realizada pelo método de inferência bayesiana sob o modelo GTR+I+G. O suporte dos ramos foi calculado com base em 10 milhões de réplicas, com frequência amostral a cada 1000 árvores. Todas as análises foram realizadas na plataforma online CIPRES Science Gateway 3.1. O resultado das análises foi visualizado no software FigTree

(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para o software Inkscape (<http://www.inkscape.org/>), para edições gráficas.

Tabela 13 — Números de acesso do GenBank das sequências de DNA de *Aspergillus* spp. utilizados nas análises filogenéticas.

Espécies	Isolados	LSU	BenA
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	CBS 132161	MH877414.1	MG517791.1
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	CBS 511.69	MH871124.1	MG517790.1
<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church	CBS 126335	MH875371.1	FR775356.2
<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church	CBS 126.61	MH869551.1	FR775334.1
<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church	CBS 112.48	MH867829.1	HE974433.1
<i>Aspergillus candidus</i> Link	CBS 129262	MH876707.1	HG916672.1
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	CBS 514.65	MH870335.1	EU982074.1
<i>Aspergillus flavus</i> Link	CBS 130026	MH877142.1	EU982071.1
<i>Aspergillus flavus</i> Link	CBS 126857	MH875716.1	EU982070.1
<i>Aspergillus flavus</i> Link	CBS 130024	MH877140.1	MG825996.1
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	CBS 263.65	MH870199.1	EU982068.1
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	CBS 121.55	MH868943.1	EU982067.1
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	CBS 128798	MH876588.1	EU021662.1
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	CBS 128438	MH876377.1	LT574722.1
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	CBS 132944	MH878492.1	KJ524906.1
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	CBS 132948	MH878509.1	EU982083.1
<i>Aspergillus tubingensis</i> Mosseray	CBS 425.65	MH870293.1	MF327716.1
<i>Aspergillus tubingensis</i> Mosseray	CBS 107.55	MH868934.1	KX863701.1
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	CBS 129267	MH876758.1	EU076377.1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	DAOM 213189	AF003355.1	MF176784.1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	CBS 132214	MH877439.1	JF909955.1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	CBS 132213	MH877438.1	JF909948.1

<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx	CBS 135.41	MH867582.1	KJ527400.1
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling, Ark. Bot.	CBS 390.48	MH867960.1	FJ004441.1
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	CBS 126809	MH875691.1	MF176773.1
<i>Penicillium commune</i> Thom	CBS 427.65	MH877787.1	FJ004398.1
<i>Penicillium commune</i> Thom	CBS 254.31	MH877693.1	FJ004397.1
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	CBS 129536	MH878082.1	FJ004400.1
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	CBS 129789	MH876982.1	FJ004399.1
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	CBS 130054	MH877162.1	MF176778.1
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge	CBS 184.81	MH873085.1	FJ004415.1
<i>Penicillium oxalicum</i> Currie & Thom	QCC:M048/17	KY781807.1	MF176791.1
<i>Penicillium polonicum</i> K.M. Zaleski	CBS 111.43	MH877771.1	MF176803.1
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom	CBS 432.65	MH877789.1	MF176815.1
<i>Penicillium waksmanii</i> K.M. Zalesky	CBS 129407	MH876747.1	FJ004444.1
<i>Talaromyces funiculosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	CBS 269.73	MH878370.1	KC992264.1
<i>Talaromyces purpurogenus</i> Samson, Yilmaz, Houbraken, Spierenb.,	CBS 129768	MH877076.1	KC992267.1
<i>Talaromyces rugulosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	CBS 133084	MH877524.1	MG714867.1
<i>Talaromyces rugulosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	CBS 111.64	MH870005.1	KX657070.1
<i>Talaromyces verruculosus</i> (Peyronel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	CBS 133084	MK518350.1	KC992269.1
Outgroup <i>Paecilomyces variotii</i>	CBS 339.51	MH868409.1	KX281055.1

4.2 ETAPA II: Ozonização de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) em meio aquoso em diferentes níveis de pH: Decomposição do Ozônio, Inativação de *Aspergillus flavus* e Efeitos na Cor da Castanha e no Perfil Lipídico do Óleo Bruto

4.2.1 Obtenção do gás ozônio

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio Modelo O&L 5.0 RM (Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil) — Figura 9 (a) —, baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD): efeito corona. Este tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta tensão entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o ar seco — Figura 9 (b). Neste espaço livre, é produzida uma descarga em forma de filamentos, em que são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o gás ozônio (O_3). No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo oxigênio (O_2) com grau de pureza de aproximadamente 90%, isento de umidade, obtido de concentrador de oxigênio acoplado ao gerador de ozônio. Adotou-se a concentração do gás de $13,0 \text{ mg de } O_3 \text{ L}^{-1}$, vazão de 1 L min^{-1} , na temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

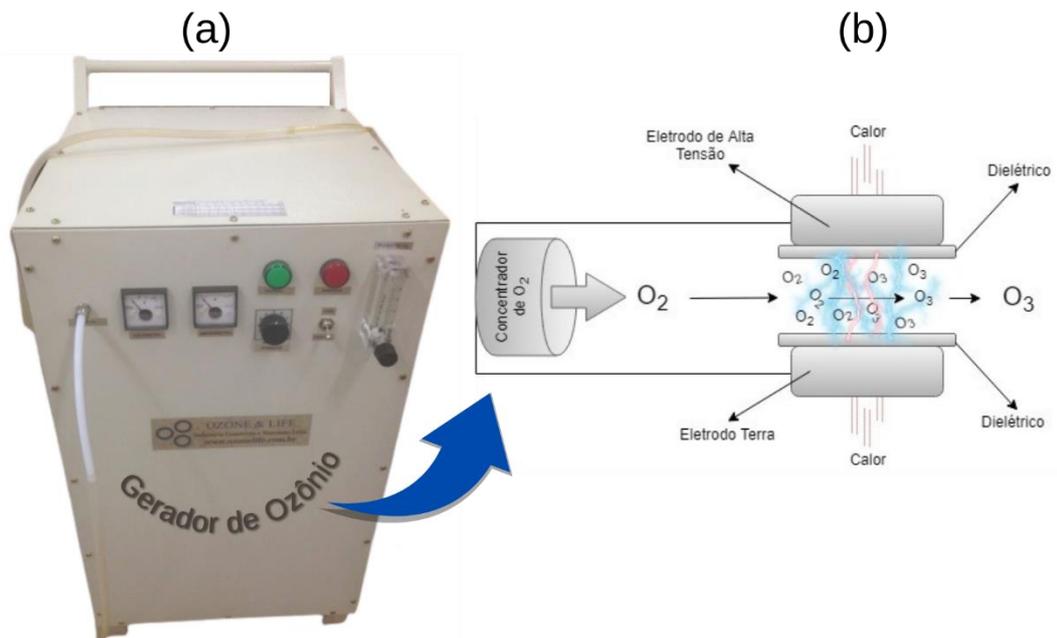


Figura 9 — (a) Gerador de ozônio Modelo O&L 5.0 RM; (b) Representação esquemática do princípio de geração do gás ozônio baseada no método DBD (Descarga por Barreira Dielétrica).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Processo de ozonização da água

Utilizaram-se amostras de 1,0 L de água destilada e esterilizada, com pH igual a 7,1. Posteriormente foram utilizados ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) e bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) para obter pHs iguais a 3,0 e 8,1, respectivamente. A ozonização da água com os diferentes pHs, na ausência e na presença de castanha-do-Brasil, foi realizada em coluna de vidro com capacidade de 1,5 L, dotada de entrada e saída do gás e placa porosa. Depois da passagem do ozônio pela coluna, o gás era direcionado para um destruidor catalítico manufacturing on demand (Ozone & Life, São José dos Campos, SP, Brazil). Nessa etapa, adotou-se concentração do gás de 13,0 mg de O_3 L^{-1} e vazão de 1 $L\ min^{-1}$, por 120 min.

4.2.3 Análise da decomposição do gás ozônio em meio aquoso na ausência e na presença de castanha-do-Brasil

Imediatamente depois da ozonização e decorridos 120 min, determinou-se a concentração do ozônio dissolvido na água. A quantificação do ozônio dissolvido na água foi feita utilizando-se o fotômetro SAM CHEMetrics, Modelo I-2019, com faixa de medição de 0,01 a 5,0 mg de O_3 L^{-1} . Quando a concentração de ozônio dissolvido ultrapassou o limite de detecção do aparelho, efetuou-se diluição da água ozonizada com volume igual de água não ozonizada, com as mesmas características iniciais.

Na ozonização da água na presença de castanha-do-Brasil descascada com partes da película, utilizaram-se amostras de 200 g do produto, nas mesmas condições de ozonização citadas anteriormente (Figura 10). A concentração residual do ozônio no meio aquoso na presença de castanha-do-Brasil foi determinada imediatamente depois da ozonização e decorridos 30, 60, 90 e 120 min.



Figura 10 — Ozonização de 200 g de castanha-do-Brasil em meio aquoso com diferentes pHs por 120 min, a 25 °C, para realização das análises de decomposição do gás ozônio.
Fonte: Acervo pessoal.

Foram ajustados o modelo cinético de segunda ordem aos dados da concentração de ozônio em função do tempo (WRIGHT, 2004). O modelo de cinética de decomposição e respectiva equação integrada e linearizada e meias-vidas são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 — Modelo de cinética de decomposição de segunda ordem e respectiva equação integrada e linearizada e respetiva meia-vida

Ordem	Equação Diferencial	Equação Integrada e Linearizada	Meia-vida
2	$\frac{dC}{dt} = -kC^2$	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	$t_{1/2} = \frac{1}{kC_0}$

Fonte: Wright, 2004. C = concentração de O₃ (mg L⁻¹); t = tempo (min); k = constante da taxa de decomposição (min⁻¹); e; C₀ = Concentração de O₃ no tempo inicial (mg L⁻¹).

4.2.4 Determinação do pH da água ozonizada

A medição do pH foi realizada com potenciômetro Digimed Mod. DM21.

4.2.5 Determinação da condutividade elétrica da água

A medição da condutividade elétrica foi realizada com o condutivímetro de bancada CG2000 da GEHAKA®, antes e depois da ozonização da água.

4.2.6 Eficácia da água ozonizada em inativar *A. flavus* em castanha-do-Brasil

A castanha-do-Brasil foi inoculada com *A. flavus* (CCUB1405) aflatoxigênico — identificado molecularmente conforme descrito no item 4.1. Inicialmente o isolado foi inoculado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 25 °C por sete dias, conforme proposto por Pitt e Hocking (2009). Para a obtenção dos esporos e conídios, 10 mL de água destilada esterilizada foram despejados em placas de Petri e, posteriormente, a concentração de conídios foi ajustada para 10^6 esporos mL^{-1} . Em seguida, as amostras de castanhas-do-Brasil autoclavadas foram submersas na suspensão de conídios por 10 min (MICHEL e RADCLIFFE, 1995). Após a inoculação, as amostras permaneceram dez dias em câmara climatizada regulada a 28 ± 2 °C e $90 \pm 2\%$ de umidade relativa, de forma a promover o desenvolvimento do microrganismo.

Após as amostras de castanha-do-Brasil serem inoculadas com *A. flavus*, foram utilizados 200 g das castanhas inoculadas como amostras e 1000 mL de água destilada para os seguintes tratamentos: i) controle (amostras não tratadas); ii) água não ozonizada em pH 8,1; iii) água não ozonizada em pH 7,1; iv) água não ozonizada em pH 3,0; v) água ozonizada em pH 8,1; vi) água ozonizada com pH 7,1; e vii) água ozonizada a pH 3,0. Todas as amostras foram submetidas a água ozonizada ou não por 120 min.

As contagens de *A. flavus* foram realizadas através do plaqueamento de diluição em série (PITT e HOCKING, 2009). Para isso, misturou-se 25 g de castanha-do-Brasil com 225 mL de água peptonada 0,1%, e essa solução estoque foi utilizada para preparar diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , sendo o plaqueamento realizado em capela de fluxo laminar. A homogeneização realizou-se em homogeneizador tipo stomacher. Os resultados foram expressos em log (UFC g^{-1}).

4.2.7 Efeitos na cor da Castanha-do-Brasil submetidas à ozonização em meio aquoso

A avaliação da cor das castanhas foi realizada com o auxílio do colorímetro triestímulo ColorQuestXE, obtendo-se os valores das coordenadas L, a e b do sistema Hunter. Com os valores das coordenadas L, a e b foi possível obter parâmetros relacionados à tonalidade h (Equação 1), à saturação da cor ou croma C (Equação 2)

e à diferença de cor ΔE (Equação 3) (LITTLE, 1975, FRANCIS, 1975, MCLELLAN *et al.*, 1995, MASKAN, 2001).

$$h = \arctang(b/a) \quad \text{Equação 1}$$

$$C = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad \text{Equação 2}$$

$$\Delta E = \sqrt{((L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2)} \quad \text{Equação 3}$$

em que:

h = tonalidade da cor;

C = saturação da cor ou croma;

ΔE = diferença de cor;

L = intensidade e branco a preto; a = intensidade de vermelho e verde; b = intensidade de amarelo e azul; L_0 , a_0 e b_0 são coordenadas obtidas antes do tratamento das castanhas.

4.2.8 Determinação do perfil lipídico do óleo extraído de castanha-do-Brasil submetidas à ozonização em meio aquoso

Para a obtenção do óleo bruto, utilizou-se o método de extração de acordo com Bligh and Dyer (1959). Posteriormente, efetuou-se a esterificação dos ácidos graxos seguindo metodologia proposta por Mendonça *et al.* (2015).

- Esterificação (metilação) dos ácidos graxos

O processo de esterificação foi realizado de acordo com Christie (1989). Alíquotas de 20 mg de lipídios totais das amostras foram pesadas, transferidas para tubos de ensaio com tampas rosqueáveis e submetidas a esterificação dos ácidos graxos. Em seguida, foram adicionados 1,5 mL de solução de hidróxido de potássio 0,5 M em metanol para a saponificação dos ácidos graxos. A amostra foi agitada em agitador vortex por 1 minuto, posteriormente colocada em banho-maria a 70°C por 5 min e resfriada em água corrente. Depois do resfriamento, adicionou-se 2 mL de solução de trifluoreto de boro (BF_3 , PA), 14% em metanol, seguido de nova agitação

mecânica em vortex por 1 min, aquecimento em banho-maria a 70°C por 5 min e resfriamento imediato em água corrente. À mistura resultante foram adicionados 2,5 mL de solução de NaCl saturado e 1 mL de hexano (grau cromatográfico), seguida de centrifugação por 10 min a 1.200 rpm. O sobrenadante foi recolhido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo de vidro com capacidade volumétrica de 2 mL, com tampa rosqueável, septo de silicone e atmosfera saturada de nitrogênio.

- Análise cromatográfica dos ácidos graxos esterificados

A análise dos ácidos graxos esterificados (metilados) foi realizada em cromatógrafo gasoso CG-2010 Shimadzu com autoinjeter AOC-5000. A separação dos ácidos graxos foi feita utilizando-se Coluna J & W Scientific 122-2362 DB-23, 60 m (comprimento), 0,25 mm ID (diâmetro interno), 0,25 µm (espessura do filme). O gás de arraste foi o Hélio, com fluxo contínuo na coluna de 0,40 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 1 µL. A identificação de cada ácido graxo foi feita por comparação com o tempo de retenção do padrão de ácidos graxos Supelco 37 component FAME mix (Supelco®, USA) e confirmados com os espectros de tais substâncias, já existentes em uma biblioteca no programa do próprio equipamento. Os resultados foram expressos em percentual da área de cada ácido graxo, em relação à área dos ácidos graxos totais.

4.3 ETAPA III: Ozonização de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) em meio aquoso em diferentes pH's: Inativação de *Aspergillus flavus*, Efeitos na Cor da Castanha e na Qualidade do Óleo Bruto

4.3.1 Obtenção do gás ozônio

Conforme descrito no item 4.2.1.

4.3.2 Processo de ozonização da água

Adotou-se concentração de entrada do gás de 21 mg de O₃ L⁻¹ na vazão de 1 L min⁻¹ e os tempos de ozonização de 120 e 240 min. As demais condições de ozonização são descritas no item 4.2.2.

4.3.3 Determinação do pH da água

Conforme descrito no item 4.2.4

4.3.4 Avaliação do efeito fungicida do processo de ozonização em água de *A. flavus* inoculado em castanha-do-Brasil

Para inoculação das amostras de castanha-do-Brasil realizou-se o procedimento conforme o item 4.2.8, porém com a concentração de conídios ajustada para 10^8 mL^{-1} e as castanhas autoclavadas foram submersas nessa suspensão de conídios por 20 min (MICHEL e RADCLIFFE, 1995). Após a inoculação, as amostras permaneceram dez dias em câmara climatizada regulada a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $90 \pm 2\%$ de umidade relativa, de forma a promover o desenvolvimento do microrganismo.

Após as amostras de castanha-do-Brasil serem inoculadas com *A. flavus*, foram utilizados 200 g das castanhas inoculadas como amostras e 1000 mL de água destilada para os tratamentos. Para os tempos de exposição de 120 e 240 min foram propostos os seguintes tratamentos: i) controle (amostras não tratadas); ii) água não ozonizada em $\text{pH } 2,7 \pm 0,2$; iii) água não ozonizada em $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$; iv) água não ozonizada em $\text{pH } 8,3 \pm 0,1$; vi) água ozonizada em $\text{pH } 2,7 \pm 0,2$; vii) água ozonizada em $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$; viii) água ozonizada em $\text{pH } 8,3 \pm 0,1$. O esquema da ozonização das castanhas encontra-se na Figura 11.

Na contagem de *A. flavus* realizou-se o procedimento conforme o item 4.2.8, porém com as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . O meio de cultura e as condições de incubação foram os mesmos adotados na inoculação das amostras. Os resultados referentes ao método de diluição foram obtidos em termos de log de unidades formadoras de colônias por grama — Log (UFC g^{-1}).

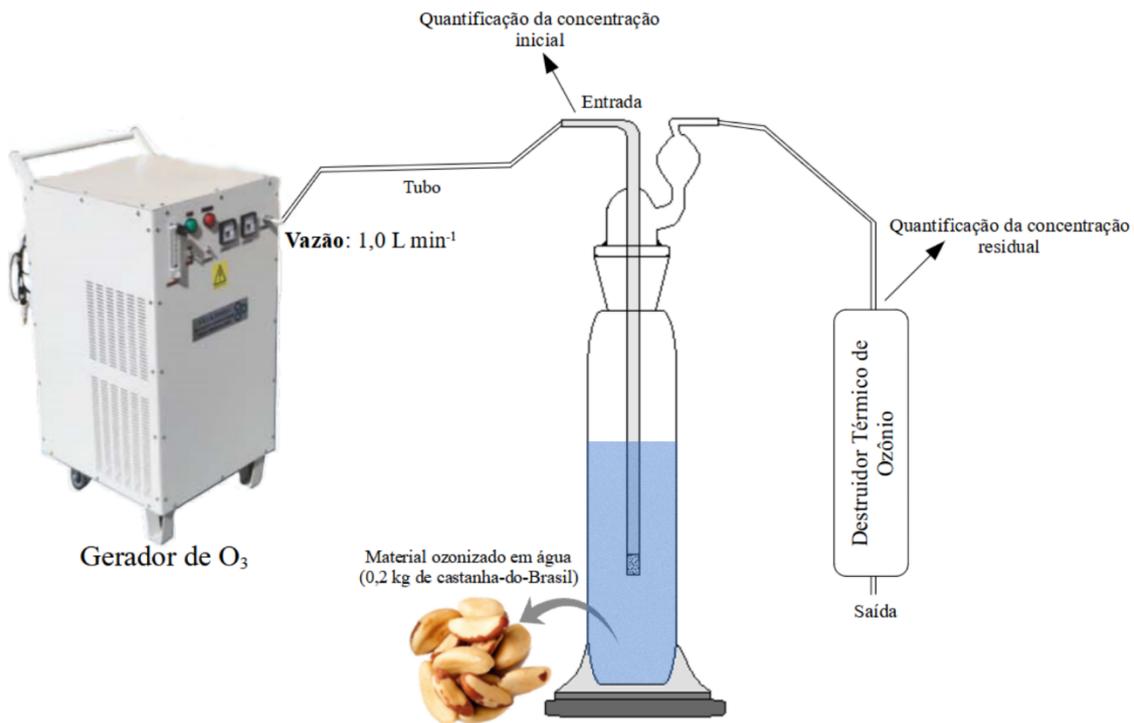


Figura 11 — Esquema da ozonização da castanha-do-Brasil na concentração de entrada de 21,0 mg L⁻¹, vazão de 1,0 L min⁻¹ e a 25 °C, para 120 min e 240 min.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.5 Análises qualitativas das castanhas-do-Brasil ozonizadas

- Umidade

Para determinação da umidade das castanhas-do-Brasil, utilizou-se o método de estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 103±2 °C, até peso constante, conforme ISO 665-2000 (UNECE, 2000).

- Teor de ácidos graxos livres do óleo bruto

Realizou-se a determinação do teor de ácidos graxos livres de acordo com as normas AOCS (1993), Método Ca 5a-40. O percentual de ácidos graxos livres (AGL), expresso em % de ácido oleico, foi calculado por meio da Equação 4,

$$AGL = \frac{N \cdot f \cdot 28,2 \cdot (V_a - V_s)}{m} \quad \text{Equação 4}$$

em que,

AGL = Ácidos Graxos Livres, mg KOH g⁻¹;

N = normalidade da solução de NaOH;

f = fator de correção da solução de NaOH;
Va = volume de NaOH 0,01 N gasto para a amostra, mL;
Vs = volume de NaOH 0,01 N gasto na titulação sem amostra de óleo, mL;
e m = massa da amostra, g.

- *Índice de peróxido do óleo bruto*

O índice de peróxido foi determinado de acordo com as normas AOCS (1993), Método Cd 8-53. O índice de peróxido (IP) foi calculado por meio da Equação 5,

$$IP = \frac{N f 1000 (V_a - V_s)}{m} \quad \text{Equação 5}$$

em que,

IP = Índice de peróxido, mEq kg⁻¹;

Va = volume de Na₂S₂O₃ 0,1N padronizado gasto para a titulação da amostra, mL;

Vs = volume de Na₂S₂O₃ 0,1N padronizado gasto para a titulação sem amostra de óleo, mL;

N = normalidade da solução de Na₂S₂O₃;

f = fator de correção da solução de Na₂S₂O₃;

e m = massa da amostra, g.

4.3.6 Efeitos na cor da Castanha-do-Brasil submetidas à ozonização em meio aquoso

Conforme relatado no item 4.2.7.

4.4 ETAPA IV: Testes preliminares do efeito fungicida e da capacidade da água ozonizada em degradar aflatoxinas

Para avaliação do efeito água ozonizada e na degradação de aflatoxinas, foram utilizadas 200 g de castanha-do-Brasil — inoculadas conforme o item 4.3.4 —, acondicionadas em frascos de vidro com capacidade de 1,5 L, contendo 1,0 L de água esterilizada com pH 6,8, com concentração de entrada de ozônio de 21 mg L⁻¹, na vazão de 1,0 L min⁻¹, nos períodos de 0, 30, 60 e 90 min e na temperatura de 25 °C.

A quantificação das aflatoxinas foi realizada por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS).

4.5 Delineamento Experimental

O experimento foi realizado no Delineamento Inteiramente Casualizado, com três repetições. Os dados sobre a capacidade da água ozonizada em inativar *A. flavus*, aspectos qualitativos como a cor das castanhas, qualidade e perfil lipídico do óleo bruto foram submetidos a análises de variância, seguidas de um teste t a um nível de 5% de probabilidade. Esses tratamentos estatísticos foram realizados no software StatPlus v.5 (AnalystSoft Inc., Canadá), enquanto a análise de regressão e plotagem dos gráficos foram feitas no software SigmaPlot v.10 (Systat Software Inc., Alemanha).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPA I: Caracterização molecular e filogenética do isolado *Aspergillus* seção *Flavi*

No presente estudo foi utilizado para caracterização molecular e filogenética, um isolado proveniente de amendoim do Distrito Federal coletado em 2018, catalogado inicialmente como UNBDF01 e posteriormente, para caracterização molecular e filogenética, classificado como CCUB1405. Foram observados os aspectos morfológicos em meio de cultura seletivo AFPA e do conidióforo em microscópio óptico, conforme a Figura 12. Utilizou-se um isolado de amendoim devido a confirmação, realizada por HPLC, da produção de extrólitos toxigênicos, sendo positivo a produção de aflatoxina B₁. Fator essencial para avaliação do efeito detoxificante da água ozonizada em castanha-do-Brasil contaminada com aflatoxinas.

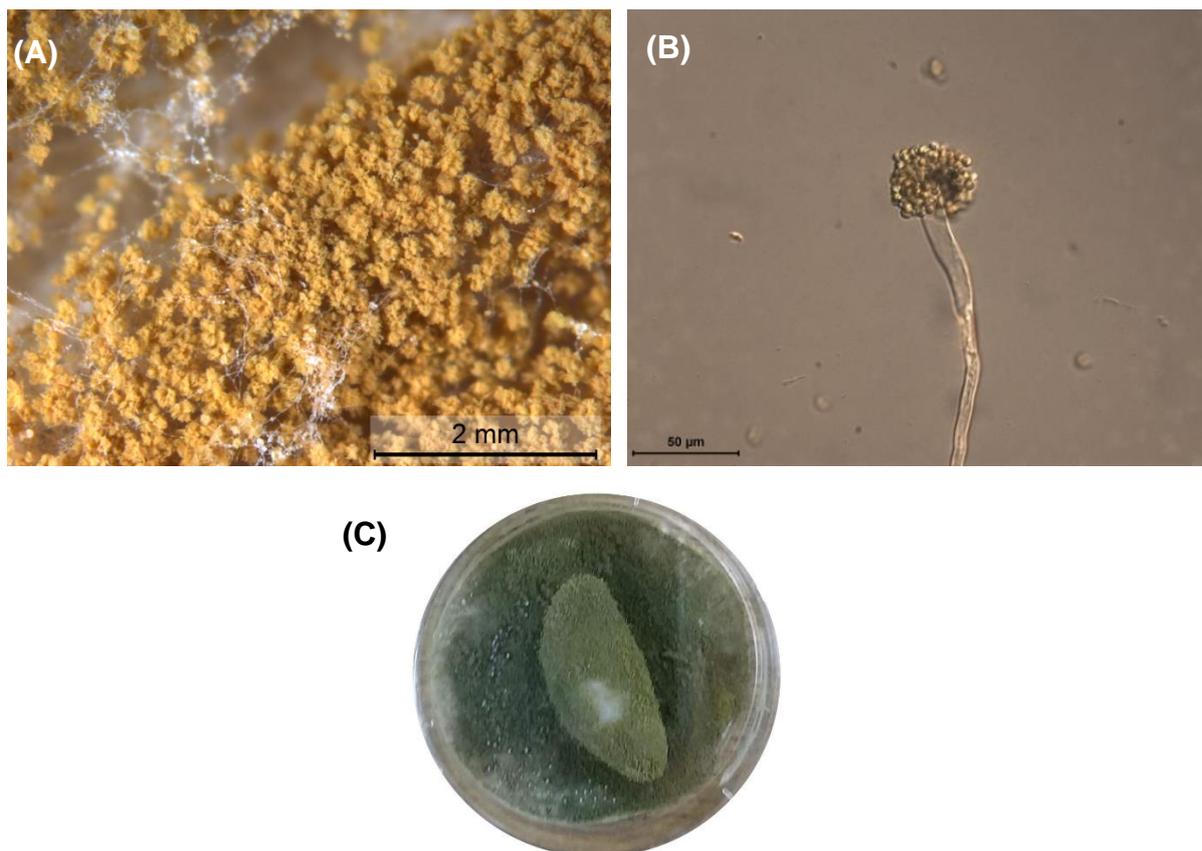


Figura 12 — Microscopia óptica da (A) esporulação do isolado em meio de cultura AFPA e (B) aspectos morfológicos do conidióforo; (C) esporulação em castanha-do-Brasil no meio de cultura BDA do isolado (CCUB1405) de *Aspergillus* seção *Flavi* proveniente de amendoim coletado no Distrito Federal em 2018.

Fonte: Oliveira *et al.* (2020) e Acervo Pessoal.

Na caracterização molecular e filogenética deste isolado, utilizou-se as regiões gênicas de β -tubulina (BenA), ITS e LSU rDNA, além dessas regiões, foram feitas análises da região gênica de Calmodulina (CaM), porém, possivelmente devido ao primer, não se obteve bons resultados. Ao se utilizar o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) disponível online através da plataforma NCBI (National Center of Biotechnology Information), o isolado do presente estudo foi caracterizado como *Aspergillus flavus* para as duas regiões gênicas. Para confirmação, foi realizado análise filogenética das regiões de β -tubulina (BenA) e LSU rDNA.

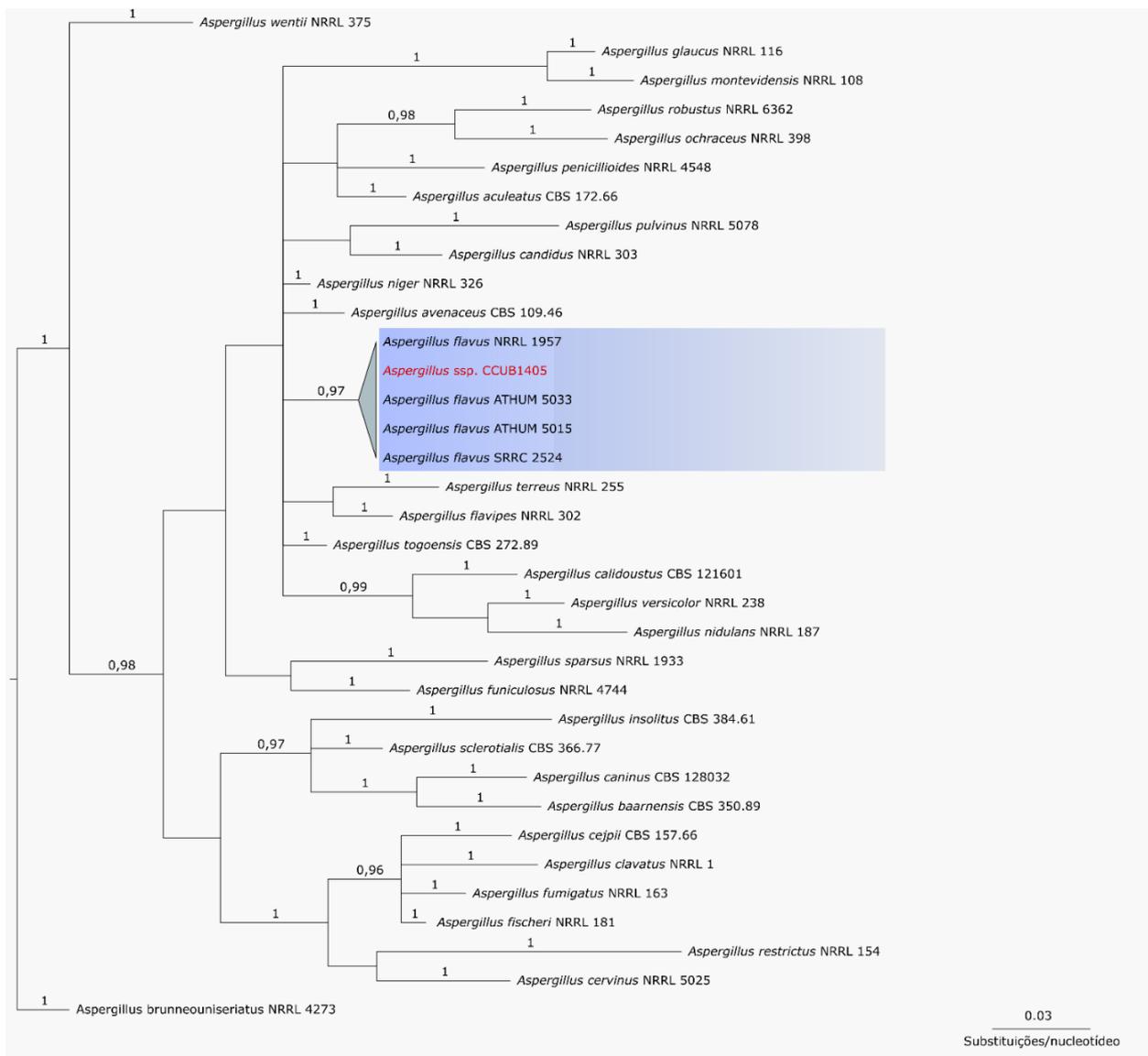


Figura 13 — Árvore filogenética com sequências da região gênica β -tubulina (BenA), obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior está indicada acima dos nós. Probabilidades posteriores inferiores a 95% foram retiradas da árvore. A árvore foi enraizada com *Aspergillus brunneouniseriatus*. O isolado (CCUB1405) em estudo está destacado em vermelho.

O isolado, classificado como CCUB1405, apresentou probabilidade de 97% dentro do grupo de *Aspergillus flavus* quando, por meio de Inferência Bayesiana, obteve-se a árvore filogenética com sequências da região gênica β -tubulina (BenA) — Figura 13, com destaque em vermelho para o isolado CCUB1405. Entretanto, quando se comparou o valor encontrado da região gênica β -tubulina (BenA), que foi de 97% de probabilidade dentro do grupo de *A. flavus*, com o valor de probabilidade dentro do mesmo grupo na árvore filogenética da região LSU rDNA, também por Inferência Bayesiana, esse valor foi 12% menor, sendo de 85% de probabilidade do isolado CCUB1405 pertencer a *A. flavus* (Figura 14).

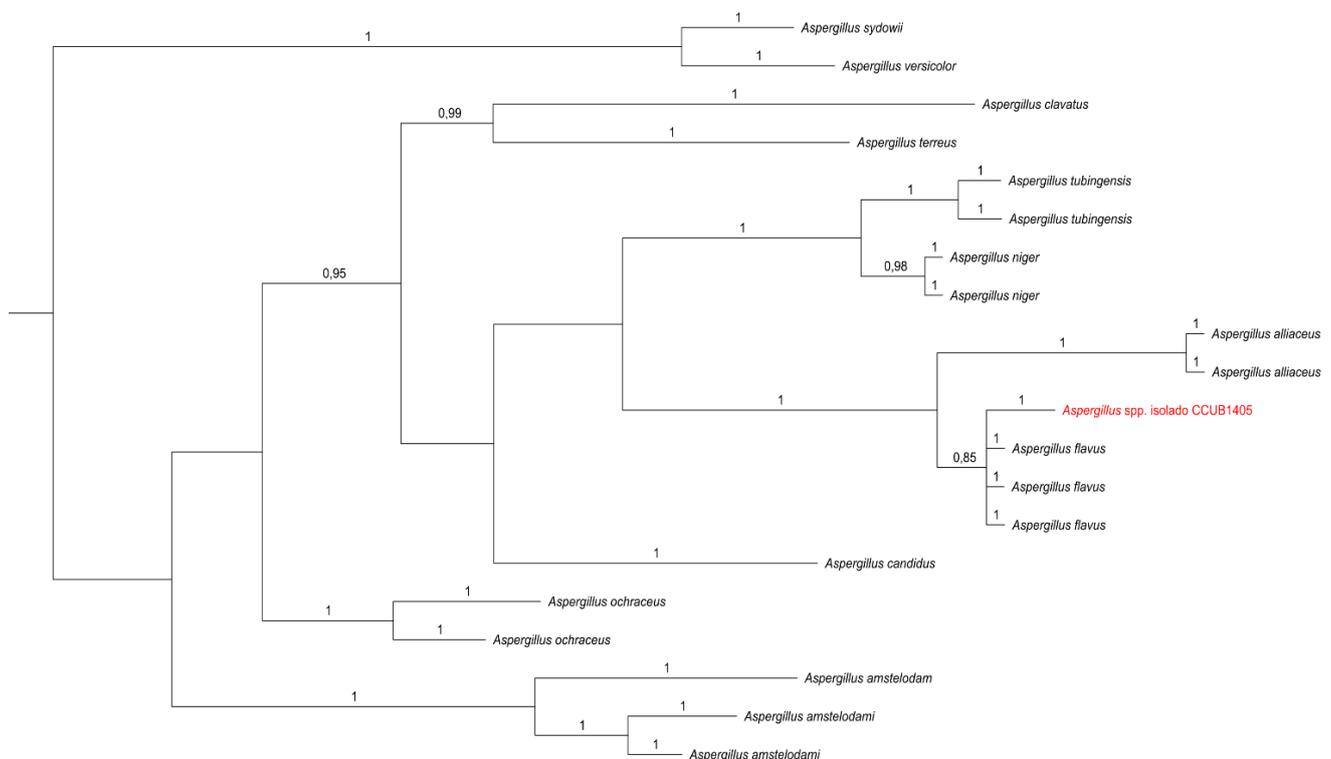


Figura 14 — Árvore filogenética com sequências da região gênica LSU rDNA, obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior está indicada acima dos nós. O isolado (CCUB1405) do estudo está destacado em vermelho.

Norlia *et al.* (2019b) ao fazer a caracterização e identificação molecular de cepas aflatoxigênicas e não aflatoxigênicas de *Aspergillus* seção *Flavi* isolados de amendoim, utilizou a região gênica ITS rDNA e β -tubulina. Os autores observaram ampliações por PCR positivas em todas as cepas e, a realizar a pesquisa BLAST no banco de dados GenBank, ambos os genes ITS e β -tubulina deram resultado semelhante para todas as 77 cepas de *Aspergillus* seção *Flavi* testadas. Norli *et al.* (2019b) ainda relatam que os resultados do BLAST indicaram que um total de 76

cepas foram identificadas como *Aspergillus flavus*, com 99 a 100% de similaridade, com base nas sequências dos genes ITS e β -tubulina, porém, o ITS sozinho não foi suficiente para identificar as espécies relacionadas a *Aspergillus* seção *Flavi*, sendo necessário a β -tubulina e a combinação entre os dois genes. No presente estudo foi observado algo semelhante, enquanto a identificação do isolado CCUB1405 utilizando a sequência de gene de β -tubulina obteve um percentual de 97% para *A. flavus*, o gene LSU rDNA da região ITS essa porcentagem foi de 85%.

A identificação de espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, tradicionalmente feita por métodos convencionais, como as análises em meios de cultura seletivo e análises morfológicas, requerem um grande conhecimento taxonômico do grupo, demandam tempo e é um processo laborioso. Além disso, utilizar somente a identificação morfológica é insuficiente, pois não é confiável para identificar e diferenciar corretamente as espécies intimamente relacionadas e presentes em *Aspergillus* seção *Flavi* (TANIWAKI *et al.*, 2017; ONO *et al.*, 2021). De acordo com Tam *et al.* (2014) o sequenciamento dos genes ITS, β -tubulina e calmodulina foi capaz de resolver com sucesso a identificação errônea de *A. nomius* e *A. tamaritii* de isolados clínicos, os quais haviam sido identificados erroneamente como *A. flavus*, com base apenas em características morfológicas. O resultado desses autores ainda se apoiaram na separação do grupo de isolados pela impressão metabólica, ou seja, pelo perfil químico de cada isolado, antes da identificação molecular.

Além da identificação morfológica, outro método muito utilizado, como comentado acima, é a identificação deste grupo por meio de análises do perfil químico produzido pelo fungo — seus extrólitos —, sendo uma abordagem recomendada para identificar e distinguir espécies importantes e toxigênicas dentro de *Aspergillus* seção *Flavi* e *A. seção Nigri* (FRISVAD *et al.*, 2019). Entretanto, técnicas moleculares possuem um grande potencial para a identificação rápida e precisa de fungos. A diagnose molecular de fungos baseada em PCR, oferece a especificidade e sensibilidade apropriada à detecção inicial recomendada pelo HACCP — Hazard Analysis and Critical Control Point —, que trata da abordagem sistemática para garantir que os alimentos sejam seguros para os consumidores, sob o ponto de vista sanitário (FAO, 2004; NORLIA *et al.*, 2019a).

A diagnose molecular de fungos pode ajudar na identificação de pontos críticos da cadeia produtiva. A castanha-do-Brasil é um produto extrativista de grande importância para a região amazônica como fonte de subsistência — nutritiva e

econômica —, para diversos povos ribeirinhos e indígenas, porém, devido ao clima da região ser favorável ao desenvolvimento de fungos, pode-se ter a presença de fungos aflatoxigênicos em toda cadeia produtiva. Métodos moleculares de detecção de fungos à nível de espécie podem ser ferramentas importantes na certificação e no rastreamento de castanha-do-Brasil, principalmente para a exportação (PACHECO e SCUSSEL, 2009; KUMAR *et al.*, 2008; CALDERARI *et al.*, 2013; MIDORIKAWA *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

5.2 ETAPA II: Ozonização de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) em meio aquoso em diferentes níveis de pH: Decomposição do Ozônio, Inativação de *Aspergillus flavus* e Efeitos na Cor da Castanha e no Perfil Lipídico do Óleo Bruto

5.2.1 Decomposição do ozônio em meio aquoso contendo castanha-do-Brasil

A Tabela 15 relaciona os valores médios de concentração de ozônio na água imediatamente após a ozonização por 120 min, a $13,0 \text{ mg L}^{-1}$, vazão de 1 L min^{-1} e temperatura de 25°C . Em pH 8,1, a concentração de ozônio no início (0 min) e 120 min depois foi igual a $2,39 \pm 0,04$ e $0,86 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente — a concentração final de ozônio foi 0,36 vezes a inicial. Concentrações iniciais mais altas de ozônio foram detectadas em pH 7,1 e 3,0 ($4,77 \pm 0,03$ e $5,94 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente). A redução menos intensa foi verificada em pH 3,0, quando o nível de ozônio ao final do tratamento era 0,79 vezes a concentração original. Tal tendência corrobora os achados de Galdeano *et al.* (2018), que investigou a saturação de ozônio em água e observou maiores níveis remanescentes em meios aquosos mais ácidos.

Os valores de pH afetam diretamente a estabilidade do ozônio na água de forma que, quanto mais alcalino o meio, mais rápida é sua decomposição (KHADRE *et al.*, 2001). Além disso, o pH determina o mecanismo de ação, que pode ser direto, em meio ácido (efeito do ozônio molecular), ou indireto, em meio alcalino (ação dos radicais resultantes, como a hidroxila) (KIM *et al.*, 1999; GOTTSCHALK *et al.*, 2000).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é o efeito da ozonização no pH da água. No geral, após a ozonização por 120 min, nenhuma mudança substancial foi observada para os níveis iniciais de pH de 8,1 e 3,0, independentemente de as nozes estarem presentes ou não. Particularmente para o

pH 8,1, a ausência de alteração pode ser explicada pela ação tampão do bicarbonato de sódio usado para primeiro ajustar a alcalinidade (ERIKSSON *et al.*, 2007).

Tabela 15 — Concentração residual de ozônio (mg L^{-1}) em água sem a presença de castanha-do-Brasil na temperatura de 25 °C

pH antes da ozonização	pH depois da ozonização	Tempo de decomposição (min)	Concentração residual de ozônio (mg L^{-1})
3,0	3,0	0	$5,94 \pm 0,04$
		120	$4,67 \pm 0,008$
7,1	4,8	0	$4,77 \pm 0,03$
		120	$2,78 \pm 0,18$
8,1	8,4	0	$2,39 \pm 0,04$
		120	$0,86 \pm 0,05$

n = três repetições da amostra

Por outro lado, houve redução do pH quando o valor original era de 7,1 ao final do processo de ozonização conduzido a $13,0 \text{ mg L}^{-1}$ por 120 min. Nesse caso, o pH médio foi de $4,8 \pm 0,1$, nos meios com e sem castanha-do-Brasil. A redução do pH da água pode estar associada a um aumento no potencial redox da água ozonizada (Tabela 15). Segundo Stumm e Morgan (1996), existe uma relação inversa entre o pH e o potencial redox em meio aquoso. No presente estudo, houve aumento significativo do potencial redox na água ozonizada, principalmente na ausência da castanha-do-Brasil (Tabela 16). O alto potencial redox é justificado pelos maiores níveis de ozônio dissolvido na água (JARDIM, 2014). Portanto, o uso de valores iniciais de pH de 7,1 e 3,0, em associação com concentrações de ozônio de $4,77$ e $5,94 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, levou a potenciais redox acima de $1.999,00 \text{ mV}$ — limite superior de detecção para a técnica empregada. Por outro lado, em pH 8,1 e $2,39 \text{ mg}$ de $\text{O}_3 \text{ L}^{-1}$, o potencial redox registrou $1.650,00 \pm 36,00 \text{ mV}$.

Tabela 16 — Potencial redox (mV) e condutividade elétrica (CE, $\mu\text{S cm}^{-1}$) de água com diferentes níveis de pH antes e depois da ozonização na concentração de entrada de $13,0 \text{ mg L}^{-1}$, vazão de $1,0 \text{ L min}^{-1}$ e a 25 °C, por 120 min, na ausência e na presença de castanha-do-Brasil

Variáveis	pH inicial	Antes da Ozonização	Depois da ozonização — sem Castanha-do-Brasil	Depois da ozonização — com Castanha-do-Brasil
Potencial Redox (mV)	8,1	$1.000,00 \pm 20,00$	$1.650,00 \pm 36,00$	$525,00 \pm 42,00$
	7,1	$900,00 \pm 31,00$	$>1.999,00^*$	$870,00 \pm 28,00$
	3,0	$1.300,00 \pm 23,00$	$>1.999,00$	$1.850,00 \pm 37,00$
CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	8,1	$6.510,00 \pm 85,95$	$6.911,00 \pm 15,94$	$7.155,33 \pm 41,36$

	7,1	3,25±0,01	25,57±0,39	327,67±18,80
	3,0	383,00±14,17	417,67±0,47	510,00±12,96

*Limite máximo do equipamento — 1.999,00 mV.

Com relação à condutividade elétrica da água, ela aumentou em todos os testes de pH iniciais. Uma tendência semelhante foi observada na água ozonizada contendo castanha-do-Brasil. Na verdade, os valores medidos foram ligeiramente superiores nesta condição, possivelmente devido à transferência de eletrólitos das nozes para a água. Quanto ao potencial redox da água ozonizada com castanha-do-Brasil, houve um aumento considerável apenas em pH 3,0. Tal comportamento também está relacionado à presença de nozes no meio.

A Figura 15 e a Tabela 17 apresentam as curvas de regressão relacionando a decomposição do ozônio em função do tempo, para cada pH testado. Eles foram construídos com base no modelo cinético de segunda ordem, que representou a concentração residual de ozônio no meio aquoso com castanha-do-Brasil, a 25 °C. Conforme mostrado, uma redução mais acentuada nos níveis de ozônio foi verificada em pH 3,0, no qual a meia-vida foi de 16,14 min. Por sua vez, em pH 7,1 e 8,1, os valores de meia-vida foram iguais a 37,42 e 193,50 min, respectivamente.

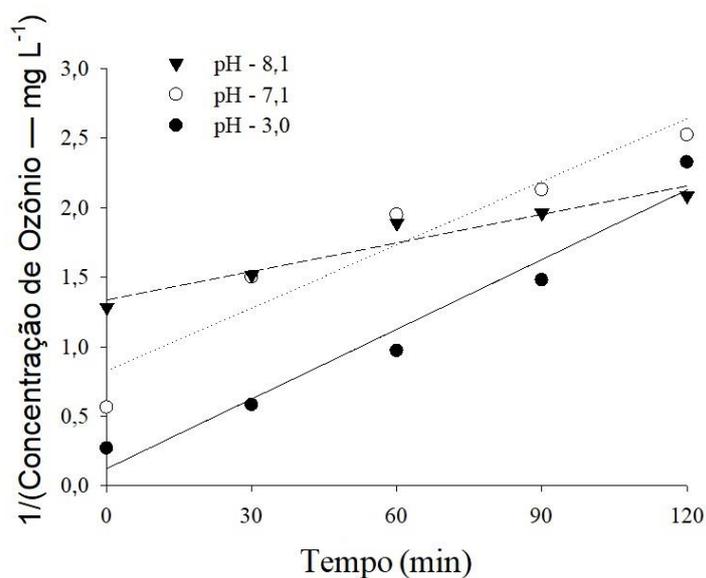


Figura 15 — Curvas de regressão do modelo cinético de segunda ordem referente a decomposição do ozônio ajustadas aos dados de concentração residual em meio aquoso na presença de castanha-do-Brasil em diferentes pHs em função do tempo (X) na temperatura de 25 °C.

Tabela 17 — Equações de regressão do modelo cinético de segunda ordem referente a decomposição do ozônio ajustadas aos dados de concentração residual em meio aquoso na presença de castanha-do-Brasil em diferentes pHs em função do tempo (X) na temperatura de 25 °C

pH	Equações ajustadas	R ²	EPE	Meia vida (min)
8,1	$\hat{y} = 1,3360 + 0,0068X$	0,94	0,0979	188,54
7,1	$\hat{y} = 0,8238 + 0,0151X$	0,92	0,2457	37,41
3,0	$\hat{y} = 0,1238 + 0,0167X$	0,96	0,1900	16,14

EPE – Erro padrão da estimativa

Esse resultado pode ser explicado pela influência da concentração inicial de ozônio no meio. Em pH 3,0, foi $3,71 \pm 0,26 \text{ mg L}^{-1}$, em contraste com $1,77 \pm 0,08$ e $0,76 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ encontrados em pH 7,1 e 8,1, respectivamente. A concentração de ozônio dissolvido na água é um dos fatores mais importantes que afetam a estabilidade do gás no meio (TOMIYASU *et al.*, 1985; KU *et al.*, 1996; BELTRAN, 2004; LOVATO *et al.*, 2009). Kuo *et al.* (1999) afirmaram que a decomposição do ozônio acelera à medida que seu nível no meio aumenta. É importante mencionar que a concentração inicial de ozônio no meio aquoso com pH 3,0 foi 2,1 e 4,9 vezes os valores obtidos quando adotados pH 7,0 e 8,1, respectivamente. Além disso, para calcular a meia-vida do ozônio em diferentes níveis de pH, as concentrações iniciais foram usadas conforme mostrado na Tabela 17, para o modelo cinético de segunda ordem (WRIGHT, 2004).

A presença de bicarbonato de sódio também pode ter contribuído para uma meia-vida mais longa em pH 8,1. De acordo com Eriksson *et al.* (2007) e Rodríguez *et al.* (2008) a ozonização na presença de bicarbonato/carbonato pode interromper as reações em cadeia dos radicais hidroxila, podendo até mesmo levar à formação de mais ozônio e outros espécimes químicas, como hidroxila e peróxidos, porém, em uma concentração inferior à de entrada.

5.2.2 Água ozonizada na inativação de *A. flavus* inoculado em castanha-do-Brasil

A Figura 16 contém a contagem de *A. flavus* (CCUB1405) em castanhas-do-Brasil tratadas e não tratadas com água ozonizada em diferentes níveis de pH por 120 min. No geral, a aplicação de ozônio causou um declínio significativo na proliferação do fungo ($p < 0,05$). Enquanto o controle (amostras não tratadas) marcou $2,55 \pm 1,12 \text{ log CFU g}^{-1}$, reduções de 0,54, 0,41 e 0,43 ciclos de log foram

observadas quando água não ozonizada foi empregada nos valores de pH iniciais de 8,1, 7,1 e 3,0, respectivamente. No entanto, as reduções mais agudas foram percebidas quando a água ozonizada foi usada nos valores iniciais de pH de 7,1 e 3,0. Nessas situações, o número de unidades de *A. flavus* diminuiu 1,25 e 1,28 ciclos logarítmicos, respectivamente — além disso, o meio a partir de pH 7,1 tornou-se mais ácido após 120 min de ozonização.

Essas observações indicam que o ozônio dissolvido na água contribuiu para a inativação do microrganismo na castanha-do-Brasil. A inativação de *A. flavus* é imprescindível devido à sua capacidade de produzir aflatoxinas. Essas substâncias são classificadas como carcinógenos do Grupo I pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, pois são potentes agentes de neoplasia hepática (IARC, 2002).

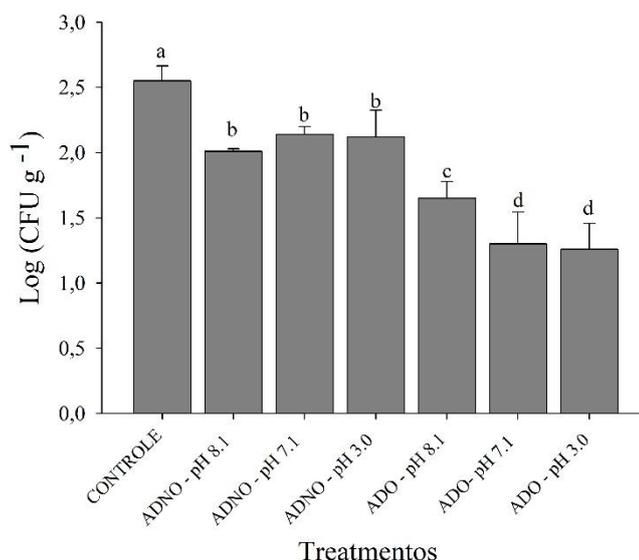


Figura 16 — Contagem de esporos e conídios viáveis log (UFC g⁻¹) de *Aspergillus flavus* (CCUB1405) inoculados em castanha-do-Brasil e submetidos por 120 min a 25 °C aos tratamentos: Controle (não ozonizado); ADNO — Água Destilada Não Ozonizada em diferentes valores de pH; ADO — Água Destilada Ozonizada (13 mg L⁻¹) em diferentes valores de pH.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Silva *et al.* (2013) avaliaram a eficácia da água ozonizada no controle de *A. flavus* em castanha-do-Brasil e indicaram grande potencial dessa técnica na inativação e no desenvolvimento do fungo. Os autores variaram a concentração de ozônio para avaliar a porcentagem de esporos e conídios viáveis. Utilizaram as concentrações de ozônio de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg L⁻¹ a 3 °C e com tempo de

borbulhamento de 15 min e sem a presença das castanhas, sendo imersas posteriormente por até 60 min. Observaram que no geral, quanto maior a concentração de ozônio, menor a porcentagem final de esporos e conídios viáveis. Percebeu-se que bastava utilizar a concentração de 20 mg L⁻¹, pois não foram observados resultados significativos em concentrações mais altas, conseguiram uma redução de mais de 90% de esporos e conídios viáveis, independentemente do tempo de contato das castanhas com a água ozonizada. Tais resultados corroboram com o do presente trabalho, porém a redução de esporos viáveis ao se utilizar a concentração de ozônio de 13 mg L⁻¹ em água com diferentes valores de pH foi menor que a encontrado por Silva *et al.* (2013) ao se utilizar 20 mg L⁻¹. Deve-se levar em consideração que foi observado a variação de pH, a temperatura ambiente de 25 °C, o conteúdo de matéria orgânica e o inóculo inicial de esporos nas castanhas — mais próximos de um tratamento comercial —, o que influenciou diretamente na eficiência da ozonização, como mostrado ao longo dos resultados. Caso a concentração de ozônio fosse maior e o teor de matéria orgânica menor, possivelmente obteríamos mais eficiência na redução da contagem de conídios e esporos viáveis, além disso, os efeitos da eficiência da ozonização quando se varia o pH do meio ainda seriam observados.

A eficácia do ozônio contra microrganismos vem de seu alto potencial oxidativo (2,07 mV) (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004). Pode oxidar componentes celulares essenciais, como os que formam as membranas e as paredes celulares, além de elementos do conteúdo celular, como enzimas e ácidos nucleicos. Esses impactos podem levar à lise celular (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; CULLEN *et al.*, 2009). Especificamente em *A. flavus*, o gás ozônio tem a capacidade de provocar alterações morfológicas, incluindo alterações na cor da colônia e oxidação de estruturas filamentosas de fungos, como vesícula, conidióforo e conídios (ALENCAR *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

5.2.3 Qualidade da castanha-do-Brasil ozonizada em meio aquoso

O teor de umidade da castanha-do-Brasil aumentou expressivamente durante o processo de ozonização, mas nenhuma variação significativa pôde ser associada aos níveis de pH testados ($p > 0,05$). A umidade original do produto era de $4,37 \pm 0,01$ g 100 g⁻¹ mas, após a ozonização em meio aquoso por 120 min, os

novos valores médios chegaram a $10,84 \pm 0,17$, $10,51 \pm 0,06$ e $10,59 \pm 0,22$ g 100g⁻¹, para pH 8,1, 7,1 e 3,0, respectivamente.

As amostras foram submetidas à secagem a 25 °C por 24 h, para que fosse alcançada a umidade final de $5,18 \pm 0,26$ g 100 g⁻¹. Diminuir o teor de água do produto após a ozonização em meio aquoso é fundamental, pois esta variável afeta a conservação durante o armazenamento. Nesse sentido, a umidade do produto caiu consideravelmente após a secagem a 25 °C, temperatura relativamente baixa para esse tipo de operação. Temperaturas entre 45 e 65 °C têm sido utilizadas para avaliar a secagem convencional da castanha-do-Brasil (SILVA e MARSAIOLI-JUNIOR, 2004; COSTA *et al.*, 2017). Nesses valores elevados, a água é retirada mais rapidamente das nozes, garantindo a manutenção da qualidade do produto ozonizado durante o armazenamento.

Apesar de exigir uma etapa adicional de secagem, a aplicação de ozônio dissolvido em água tem a vantagem de ser capaz de reduzir *A. flavus*, conforme mostrado na Figura 16. Outro aspecto importante a se considerar sobre esse tratamento é seu potencial de degradação de micotoxinas (YOUNG *et al.*, 2006; LUO *et al.*, 2013), o que o torna uma alternativa viável para o controle de aflatoxinas na castanha-do-Brasil. Não menos importante, é a aceitação do produto tratado com ozônio pelos consumidores, o que deve ser investigado em estudos de análises sensoriais posteriores.

Em relação ao efeito da ozonização sobre a cor das nozes, foram observadas variações significativas no croma e diferença de cor ($p < 0,05$) (Tabela 6). Por sua vez, o ângulo de matiz (h°) manteve-se entre $71,70 \pm 1,14$ e $72,20 \pm 0,69$. O menor chroma ($15,04 \pm 0,08$) correspondeu à ozonização em água a pH 8,1. Nessa condição, o valor médio diferiu significativamente das nozes não ozonizadas ($16,02 \pm 0,50$), bem como daquelas submetidas ao tratamento em pH 3,0 ($16,58 \pm 0,25$) ($p < 0,05$). Um valor de croma baixo significa, em última análise, uma cor menos intensa (JACOMINO *et al.*, 2003). A mudança de cor (ΔE) também apresentou diferença significativa quando as amostras não tratadas foram contrastadas com as ozonizadas ($p < 0,05$). Notavelmente, as nozes que foram submetidas a tratamento em meio aquoso com pH 7,1 registraram um valor médio de $7,47 \pm 1,22$.

Silva *et al.* (2013) e Oliveira *et al.* (2020) também observaram variação de cor na castanha-do-Brasil devido ao tratamento com ozônio. Os últimos autores

chegaram a sugerir que tais alterações poderiam estar ligadas à oxidação dos pigmentos da casca marrom-escuro que caracteristicamente recobre as nozes.

A ozonização nas condições consideradas neste estudo não afetou significativamente o perfil lipídico do óleo de castanha-do-Brasil ($p > 0,05$) (Tabela 18 e Anexo I). Os ácidos graxos foram encontrados em concentrações médias entre $13,75 \pm 0,15$ e $14,17 \pm 0,22$ (palmítico, C16:0), $10,01 \pm 1,39$ e $10,91 \pm 0,47$ (esteárico, C18:0), $22,59 \pm 0,66$ e $24,09 \pm 0,32$ (oleico, C18:1), e $50,83 \pm 1,02$ e $53,37 \pm 1,99$ g 100g^{-1} (linoleico, C18:2).

Tabela 18 — Perfil lipídico do óleo bruto e coloração das castanhas-do-Brasil sem tratamento e submetida à água ozonizada na concentração de 13 mg L^{-1} por 120 min em diferentes valores de pH na temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$

13 mg L⁻¹ por 120 min	Ácido Graxo (g/100g)			
	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico
Controle	$14,02 \pm 0,10^a$	$10,01 \pm 1,39^a$	$22,59 \pm 0,66^a$	$53,37 \pm 1,99^a$
pH 8,1	$14,00 \pm 0,26^a$	$10,91 \pm 0,40^a$	$24,07 \pm 0,63^a$	$51,01 \pm 1,28^a$
pH 7,1	$14,17 \pm 0,22^a$	$10,91 \pm 0,47^a$	$24,09 \pm 0,32^a$	$50,83 \pm 1,02^a$
pH 3,0	$13,75 \pm 0,15^a$	$10,27 \pm 0,97^a$	$23,23 \pm 0,33^a$	$52,75 \pm 1,14^a$

13 mg L⁻¹ por 120 min	Coloração		
	Saturação (C)	Tonalidade (h°)	Diferença de cor (ΔE)
Controle	$16,017 \pm 0,50^{ab}$	$72,20 \pm 0,69^a$	0 ± 0^c
pH 8,1	$15,04 \pm 0,08^b$	$71,94 \pm 0,12^a$	$3,38 \pm 0,39^b$
pH 7,1	$15,77 \pm 0,36^{ab}$	$71,70 \pm 1,14^a$	$7,47 \pm 1,22^a$
pH 3,0	$16,58 \pm 0,25^a$	$71,80 \pm 1,85^a$	$5,41 \pm 1,52^{ab}$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

O fato de o perfil lipídico ter permanecido praticamente inalterado é de extrema relevância, considerando o alto potencial oxidativo do gás ozônio. Oliveira *et al.* (2020) também não percebeu mudanças substanciais após o tratamento da castanha-do-Brasil com ozônio a $13,24 \text{ mg L}^{-1}$ por 240 min. Resultado semelhante também foi alcançado por Mendez *et al.* (2003), que encontraram pouca variação na composição dos óleos brutos de milho, soja e trigo, quando os grãos foram ozonizados a 50 ppm por 30 dias.

5.3 ETAPA III: Ozonização de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) em meio aquoso em diferentes pH's: Inativação de *Aspergillus flavus*, Efeitos na Cor da Castanha e na Qualidade do Óleo Bruto

5.3.1 Avaliação da água ozonizada na inativação de *A. flavus* inoculado em castanha-do-Brasil

Após o processo de ozonização das amostras no tempo de 240 min foram determinados o pH final da água e a concentração de ozônio residual, conforme a Tabela 19. Destaca-se que o meio com pH 6,9 tornou-se mais ácido após 240 min de ozonização com concentração de entrada de 21 mg L⁻¹, vazão de 1,0 L min⁻¹ e a 25 °C, na presença de castanha-do-Brasil, apresentando uma acidificação do meio, com pH depois da ozonização de 4,8 ± 0,2. De acordo com Khadre *et al.* (2001) valores de pH podem afetar diretamente a estabilidade do ozônio na água e, quanto mais alcalino o meio, mais rápida é sua decomposição. Assim, o pH atua diretamente na determinação do mecanismo de ação do ozônio: em meio ácido o próprio ozônio molecular atua, sendo o efeito direto, e, em meio alcalino é a ação dos radicais resultantes do processo de ozonização, como a hidroxila, sendo o efeito indireto (KIM *et al.*, 1999a; GOTTSCHALK *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2017). Assim como resultados anteriores, a ozonização por 240 min não provocou nenhuma alteração substancial nos níveis iniciais de pH 8,3 e 2,7, mantendo-se praticamente os mesmos após a ozonização. No caso do pH 8,3 a ausência de alteração pode ser explicada pela ação tampão do bicarbonato de sódio utilizado no ajuste do pH da água, causando um efeito contrário do esperado no processo de ozonização (ERIKSSON *et al.*, 2007).

Tabela 19 — Valores de pH antes e depois da ozonização de 1,0 L de água contendo castanha-do-Brasil (200g) e concentração residual de ozônio após ozonização com concentração de entrada de 21 mg L⁻¹ por 240 min a 25 °C

pH antes da ozonização	pH depois da ozonização (240 min)	Concentração residual de ozônio (mg L ⁻¹) após a ozonização de 240 min
2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2	4,03 ± 0,10
6,9 ± 0,1	4,8 ± 0,2	2,07 ± 0,07
8,3 ± 0,1	8,4 ± 0,1	1,12 ± 0,03

A Figura 17 mostra a contagem de *A. flavus* em castanhas-do-Brasil tratadas e não tratadas com água ozonizada (concentração de entrada de 21 mg L⁻¹ e vazão

de 1,0 L min⁻¹) em diferentes níveis de pH por 120 min. No geral, a aplicação de ozônio causou um declínio significativo na proliferação do fungo ($p < 0,05$). Enquanto o controle (amostras não tratadas) marcou $5,44 \pm 0,11$ log UFC g⁻¹, reduções de 1,30, 1,19 e 1,20 ciclos de log foram observadas quando água não ozonizada foi empregada nos valores de pH iniciais de 8,3, 6,9 e 2,7, respectivamente. No entanto, as reduções mais acentuadas foram percebidas quando a água ozonizada foi usada nos valores iniciais de pH de 8,3, 6,9 e 2,7. Nessas situações, o número de unidades de *A. flavus* diminuiu 2,34, 2,02 e 1,96 ciclos logarítmicos, respectivamente.

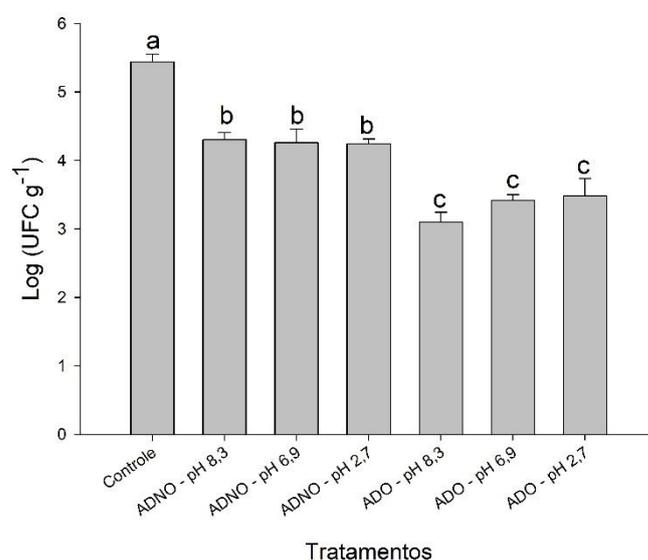


Figura 17 — Contagem de esporos e conídios viáveis log (UFC g⁻¹) de *Aspergillus flavus* (CCUB1405) inoculados em castanha-do-Brasil e submetidos por 120 min a 25 °C aos tratamentos: Controle (não ozonizado); ADNO — Água Destilada Não Ozonizada em diferentes valores de pH; ADO — Água Destilada Ozonizada (21 mg L⁻¹) em diferentes valores de pH.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Ao realizar a contagem de *A. flavus* em castanhas-do-Brasil tratadas e não tratadas com água ozonizada (concentração de entrada de 21 mg L⁻¹ e vazão de 1,0 L min⁻¹) em diferentes níveis de pH por 240 min, obteve-se diferença significativa ($p < 0,05$). As amostras não tratadas (controle), marcou $5,44 \pm 0,11$ log UFC g⁻¹, e, quando se utilizou água não ozonizada nos valores de pH iniciais de 8,3, 6,9 e 2,7, foram observadas reduções de 1,25, 0,56 e 0,78 ciclos log, respectivamente. Entretanto, os tratamentos com água ozonizada usando os valores iniciais de pH de

8,3, 6,9 e 2,7 foram os que obtiveram as reduções mais acentuadas, com reduções de 3, 2,92 e 2,88 ciclos logarítmicos, respectivamente.

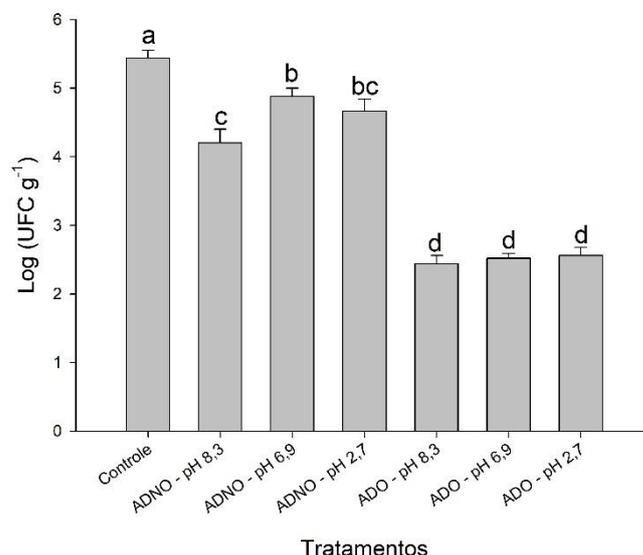


Figura 18 — Contagem de esporos e conídios viáveis log (UFC g⁻¹) de *Aspergillus flavus* (CCUB1405) inoculados em castanha-do-Brasil e submetidos por 240 min a 25 °C aos tratamentos: Controle (não ozonizado); ADNO — Água Destilada Não Ozonizada em diferentes valores de pH; ADO — Água Destilada Ozonizada (21 mg L⁻¹) em diferentes valores de pH.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

A contaminação de castanha-do-Brasil por fungos produtores de micotoxinas geralmente ocorre quando os ouriços caem no solo, onde encontram esporos viáveis para o desenvolvimento fúngico e a presença de umidade e temperatura ideal para ocorrer essa infecção. Além disso, no processo de beneficiamento pode haver danos mecânicos, um dos principais fatores que favorecem a contaminação por *Aspergillus* seção *Flavi* e a produção de aflatoxinas, pois, por meio desses danos, há a absorção de umidade do ambiente e penetração e proliferação dos esporos de fungos no interior das castanhas (PACHECO e SCUSSEL, 2009; SILVA *et al.*, 2013). Mesmo que o uso de desinfetantes químicos, como alguns ácidos, possa oferecer um método alternativo para reduzir e inativar o desenvolvimento de fungos potencialmente micotoxigênico, esses tratamentos químicos tradicionais muitas vezes são considerados inadequados para os consumidores devido às regulamentações, os resíduos produzidos durante o processo, a baixa eficiência em inativar micotoxinas, com conseqüente problemas relacionados à saúde do

consumidor (LEE *et al.*, 2016; VETTRAINO *et al.*, 2019). O ozônio, diferentemente de alguns métodos tradicionais para sanitização de castanha-do-Brasil, possui um alto potencial oxidativo, podendo oxidar componentes celulares essenciais, levando à lise celular, com consequente inativação de células microbianas, além de poder atuar na degradação de aflatoxinas, com potencial superior ao de métodos tradicionais (CULLEN *et al.*, 2009; ATAKAN e CANER, 2021).

À nível de contaminação comercial Ribeiro *et al.* (2020), ao avaliar a redução de *Aspergillus* seção *Flavi* em amostras de castanha-do-Brasil, utilizaram hipoclorito de sódio (250 mg L⁻¹ por 8,5 min) e ácido peracético (80 mg L⁻¹ por 15 min), porém não observaram uma redução significativa ($p > 0,05$) utilizando esses processos, obtendo uma contagem de $2,05 \pm 0,30$, $1,87 \pm 0,10$ e $1,92 \pm 0,19$ Log UFC g⁻¹ para amostras não tratadas, hipoclorito de sódio e ácido peracético, respectivamente. Esses autores ainda relatam que, ao avaliarem *Aspergillus nomius* potencialmente aflatoxigênico inoculado na superfície de castanha-do-Brasil, o processo utilizando hipoclorito de sódio e ácido peracético foi capaz de reduzir *A. nomius* em 2,16 e 1,02 Log UFC g⁻¹, respectivamente. Porém, Ribeiro *et al.* (2020) relatam que a capacidade desses processos em degradar aflatoxinas presentes em castanha-do-Brasil foi ineficiente. Lee *et al.* (2016) utilizando um tratamento com ozônio em meio aquoso na concentração de 0,4 ppm, com tempo de contato de 10 min, em castanha coreana (*Castanea crenata* 'Tsukuba'), obteve uma redução de 1,66 ciclos log de fungos totais presentes nas castanhas ao final de 16 semanas de armazenamento, resultados mais significativos que os métodos tradicionais utilizados, além de observarem que o tratamento com água ozonizada diminuiu a deterioração das castanhas.

Oliveira *et al.* (2020) utilizou o gás ozônio para redução da contaminação de *Aspergillus flavus* inoculado em castanha-do-Brasil e observaram uma redução superior a 3,10 ciclos log ao utilizar ozônio na concentração de 8,88 e 13,24 mg L⁻¹, com vazão de 3,0 L min⁻¹ e com tempo de exposição de 240 min. São resultados próximos aos encontrados no presente trabalho, pois foram adotados fatores semelhantes, tais como: o tempo de 240 min de exposição ao tratamento com ozônio e o inóculo inicial de *A. flavus* de $5,34 \pm 0,04$ log UFC g⁻¹. Porém, a concentração de entrada do estudo atual foi superior (21 mg L⁻¹), utilizou-se uma menor vazão (1,0 L min⁻¹) e em meio aquoso com diferentes níveis de pH, com inóculo inicial de $5,44 \pm 0,11$ log UFC g⁻¹, observando assim que a redução mais

expressiva para *A. flavus* também foi de 3 ciclos log. Essa redução aproximada de 3 ciclos log em *Aspergillus* spp. também foi observada por Alencar *et al.* (2012), quando se utilizou gás ozônio na concentração de 21 mg L⁻¹ por 96 h para inativação deste fungo em amendoim. O estudo de Alencar *et al.* (2012) utilizou a mesma concentração de entrada do gás ozônio que foi utilizada neste estudo, de 21 mg L⁻¹, porém, a contagem inicial de inóculo de *Aspergillus* spp. foi superior a 6,00 log UFC g⁻¹, além de se ter utilizado um tempo de exposição de 96 horas para se obter uma redução de 3 ciclos log, muito superior ao adotado neste estudo (240 min). Silva *et al.* (2013) utilizou água ozonizada para a inativação de *A. flavus* em castanha-do-Brasil obtendo resultados expressivos para redução da porcentagem de esporos e de conídios viáveis ao se utilizar 20 mg L⁻¹, porém, utilizando água a 3 °C — fator que pode aumentar a solubilidade do ozônio em meio aquoso, aprimorando assim o processo —, sendo que as castanhas foram submersas na solução por até 60 min após o borbulhamento do ozônio no meio por 15 min.

Ressalta-se a importância de se inativar *A. flavus* em castanha-do-Brasil, antes e durante o armazenamento, devido à sua alta capacidade de produzir aflatoxinas. O presente estudo mostra que a utilização de água ozonizada para a inativação de *A. flavus* é viável, pois, apesar de ter sido utilizado um tempo de 240 min com concentração de entrada de 21 mg L⁻¹, o inóculo inicial do fungo na castanha-do-Brasil estava muito acima do que é encontrado comercialmente. Na etapa anterior (Etapa II), a concentração do inóculo foi de 10⁶ esporos mL⁻¹, fazendo que o controle apresentasse uma contagem de 2,55 ± 1,12 Log UFC g⁻¹, enquanto nesta etapa foi de 10⁸ mL⁻¹, com o controle apresentando uma contagem de 5,44 ± 0,11 log UFC g⁻¹, valor mais elevado. Os resultados mostraram que se pode conseguir uma redução de até 3 ciclos log para os parâmetros adotados neste estudo, assim como dados encontrado na literatura (ALENCAR *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2020). No geral, utilizar o processo de ozonização, na forma de gás e dissolvido em água, para inativar e reduzir *Aspergillus* seção *Flavi* potencialmente aflatoxigênico pode ser considerado uma técnica viável e superior à utilização de métodos tradicionais (LEE *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2020).

5.3.2 Qualidade da castanha-do-Brasil ozonizada em meio aquoso

O teor de água da castanha-do-Brasil aumentou durante o processo de ozonização em meio aquoso, mas nenhuma variação significativa pôde ser associada aos níveis de pH testados ($p > 0,05$). A umidade original do produto era de $4,28 \pm 0,01 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ mas, após a ozonização em meio aquoso por 240 min, os novos valores médios chegaram a $10,18 \pm 0,12$, $10,34 \pm 0,13$ e $10,59 \pm 0,08 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, para pH 8,3, 6,9 e 2,7, respectivamente.

As amostras foram submetidas à secagem a 25°C por 24 h, para que fosse alcançada a umidade final de $5,27 \pm 0,22 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$. A umidade do produto foi reduzida após a secagem a 25°C — temperatura baixa para esse procedimento. Na avaliação da secagem de castanha-do-Brasil as temperaturas entre 45 e 65°C têm sido utilizadas, acelerando o processo de retirada da água das nozes, podendo assim garantir a qualidade do produto ozonizado (COSTA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Obteve-se diferença significativa ($p < 0,05$) quando se analisou as variáveis qualitativas, teor de ácidos graxos livres e índice de peróxido, do óleo bruto extraído das castanhas-do-Brasil, de acordo com a Tabela 20. O teor de ácidos graxos livres ficou entorno de 0,34 e $0,49 \text{ mg KOH g}^{-1}$, sendo que os menores valores foram observados nas castanhas-do-Brasil submetidas ao tratamento com água ozonizada, e, a água ozonizada em pH 8,3 por 240 min, apresentou o menor valor em relação aos tratamentos sem ozonização. Esses valores do teor de ácidos graxos livres são inferiores ao limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para óleo bruto, que é de $4,00 \text{ mg KOH g}^{-1}$ (FAO, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2019). O tratamento com água ozonizada na concentração de entrada de 21 mg L^{-1} por 240 min não afetou drasticamente a qualidade do óleo bruto para o parâmetro de ácidos graxos livres.

Tabela 20 — Qualidade do óleo bruto: ácidos graxos livres e índice de peróxido, extraído das castanhas-do-Brasil submetidas à água ozonizada na concentração de entrada de 21 mg L^{-1} por 240 min a 25°C

Tratamento (240 min)	Ácidos Graxos Livres (mg KOH g^{-1})	Índice de Peróxido (mEq kg^{-1})
Controle	$0,48 \pm 0,02^{ab}$	$8,37 \pm 1,07^b$
ADNO – pH 8,3	$0,49 \pm 0,03^a$	$10,01 \pm 0,08^b$
ADNO – pH 6,9	$0,48 \pm 0,01^{ab}$	$8,58 \pm 0,67^b$
ADNO – pH 2,7	$0,48 \pm 0,01^{ab}$	$8,64 \pm 1,14^b$

ADO – pH 8,3	0,34 ± 0,03 ^e	12,99 ± 1,33 ^a
ADO – pH 6,9	0,37 ± 0,05 ^{de}	13,39 ± 0,68 ^a
ADO – pH 2,7	0,43 ± 0,03 ^{bc}	13,82 ± 0,30 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

No índice de peróxido também foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as castanhas-do-Brasil submetidas à água ozonizada em relação as castanhas sem ozonização. Os tratamentos em que não houve ozonização o índice de peróxido ficou entorno de 8,37 e 10,01 mEq kg⁻¹, enquanto os tratamentos submetidos à água ozonizada na concentração de entrada de 21 mg L⁻¹ por 240 min apresentaram valores superiores a estes, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$), com valores entre 12,99 e 13,82 mEq kg⁻¹, sendo que o limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para índice de peróxido é de 15 mEq kg⁻¹. Ou seja, o tratamento com água ozonizada na concentração de entrada de 21 mg L⁻¹ por 240 min não afetou drasticamente a qualidade do óleo bruto para o parâmetro índice de peróxido. A oxidação de óleos é um processo autocatalítico, desenvolvendo-se de maneira acelerada e crescente uma vez que foi iniciada. Portanto, o processo de ozonização pode influenciar a formação de radicais livres que, em contato com oxigênio molecular forma um peróxido e hidroperóxidos, dando origem a outros radicais livres, formando uma progressão geométrica (ALMEIDA *et al.*, 2019). Atakan e Caner 2021 observaram que o índice de peróxido de nozes de avelã tratadas com ozônio na concentração de 20 ppm por 20 min aumentou consideravelmente, sendo o valor mais expressivo das nozes de avelã tratadas com ozônio nesta concentração após 12 meses de armazenamento; porém, tratamentos com 5 e 10 ppm por até 10 min não afetaram consideravelmente a qualidade das nozes de avelã durante o armazenamento.

Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) sobre a cor das castanhas-do-Brasil quando submetidas à água ozonizada na concentração de 21 mg L⁻¹ por 240 min em diferentes níveis de pH e a 25 °C. A Tabela 21 mostra que esse processo afetou a Saturação (C), Tonalidade (h°) e a Diferença de cor (ΔE) significativamente. Observou-se que houve um incremento da Saturação (C), ou Chroma, variando significativamente ($p < 0,05$), quando as castanhas foram submetidas à água ozonizada nos pH's 6,9 e 2,7, com valores de 12,94 ± 0,69 e 12,32 ± 0,19, respectivamente. E, de acordo com Jacomino *et al.* (2003), um valor baixo de cromina pode significar uma cor menos intensa, ou seja, para o presente estudo, o processo

de ozonização em meio aquoso incrementou a intensidade da cor das castanhas-do-Brasil.

Tabela 21 — Coloração das castanhas-do-Brasil, Saturação (C), Tonalidade (h°) e Diferença de cor (ΔE) sem tratamento e submetida à água ozonizada na concentração de 21 mg L⁻¹ por 240 min em diferentes níveis de pH na temperatura de 25 °C

Tratamento (240 min)	Coloração		
	Saturação (C)	Tonalidade (h°)	Diferença de cor (ΔE)
Controle	11,01 ± 0,51 ^c	79,89 ± 1,23 ^b	0 ± 0 ^d
ADNO – pH 8,3	10,70 ± 0,26 ^c	81,64 ± 2,53 ^b	9,78 ± 0,91 ^b
ADNO – pH 6,9	11,13 ± 0,59 ^c	79,93 ± 1,23 ^b	7,47 ± 1,31 ^c
ADNO – pH 2,7	10,99 ± 0,74 ^c	80,14 ± 0,61 ^b	5,94 ± 1,13 ^c
ADO – pH 8,3	11,67 ± 0,55 ^{bc}	86,72 ± 0,68 ^a	10,52 ± 1,22 ^b
ADO – pH 6,9	12,94 ± 0,69 ^a	87,04 ± 0,64 ^a	13,45 ± 0,83 ^a
ADO – pH 2,7	12,32 ± 0,19 ^{ab}	86,82 ± 1,05 ^a	14,60 ± 0,83 ^a

Controle (não ozonizado); ADNO — Água Destilada Não Ozonizada em diferentes valores de pH; ADO — Água Destilada Ozonizada (21 mg L⁻¹) em diferentes valores de pH.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

O ângulo de matiz (h°) também apresentou um incremento significativo ($p < 0,05$) quando as castanhas foram submetidas ao processo de ozonização em meio aquoso, porém, não houve diferença deste processo de ozonização quando se variou o pH da água, obtendo-se valores de 86,72 ± 0,68, 87,04 ± 0,64, 86,82 ± 1,05, para os pH's 8,3, 6,9 e 2,7, respectivamente. Quando se avaliou a diferença de cor das castanhas obteve-se diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que os maiores incrementos observados foram para os tratamentos com água ozonizada no pH de 2,7 e 6,9, com valores de 14,60 ± 0,83 e 12,45 ± 0,83, respectivamente. Essas alterações na coloração de castanha-do-Brasil durante o processo de ozonização também foram atribuídas à oxidação de pigmentos da casca por Oliveira *et al.* (2020), e, na casca em grãos de amendoim por Alencar *et al.* (2011) e Sanchez *et al.* (2016).

5.4 ETAPA IV: Testes preliminares do efeito fungicida e da capacidade da água ozonizada em degradar aflatoxinas

Foram realizados testes preliminares com a concentração do ozônio de entrada de 21 mg L⁻¹ em água com pH 6,8 para inativação de *A. flavus* e para degradação de aflatoxina B₁, nos tempos de 0, 30, 60 e 90 min de ozonização, conforme apresentado na Tabela 22.

Tabela 22 — Água ozonizada (21 mg L⁻¹) na inativação de *A. flavus* (contagem Log UFC g⁻¹) e na degradação de aflatoxina B₁ (µg kg⁻¹)

Tempo de Exposição	Contagem Log (UFC g ⁻¹)	AFB ₁ (µg kg ⁻¹)
Controle	6,28 ± 0,01 a	20,51 ± 1,50 ab
30 min	5,43 ± 0,15 bc	23,76 ± 0,63 a
60 min	5,61 ± 0,07 b	21,47 ± 2,90 ab
90 min	5,37 ± 0,06 c	17,81 ± 2,32 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Na avaliação da capacidade da água ozonizada em inativar *A. flavus* obteve-se diferença significativa ($p < 0,05$). A maior redução observada aconteceu quando se ozonizou em água (pH 6,8) as castanhas contaminadas por até 90 min, com redução de 0,91 ciclos Log em relação às amostras sem tratamento. Porém, o tratamento de ozonização das castanhas em água por até 90 min não diferiu estatisticamente do tempo de exposição de 30 min, que obteve uma redução de 0,85 ciclos log em relação ao tratamento controle. Ao avaliar o efeito detoxificante de aflatoxina B₁ em castanha-do-Brasil contaminada com *A. flavus* utilizando água ozonizada, obteve-se diferença significativa ($p < 0,05$). O tempo de exposição à ozonização de 90 min apresentou uma quantificação de 17,81 ± 2,32 µg kg⁻¹, o menor valor entre os demais tratamentos. Porém, só diferiu estatisticamente do tratamento com tempo de exposição de 30 min, que apresentou uma quantificação de 23,76 ± 0,63 µg kg⁻¹. Houve uma redução de 5,95 µg kg⁻¹ quando se utilizou o tempo de exposição de 90 min em relação ao tempo de exposição de 30 min. Para aflatoxinas, conforme a Tabela 22, os resultados preliminares demonstraram que a contaminação por *A. flavus*, independente do tratamento com ozônio, apresentou uma taxa final de aflatoxina B₁ acima do permitido pela legislação brasileira, ou seja, o limite máximo permitido (LMP), de 10 µg kg⁻¹ para castanha-do-Brasil pronta para consumo direto (BRASIL, 2021).

6. CONCLUSÃO

Com relação a ozonização em meio aquoso em diferentes pH's pode-se chegar as seguintes conclusões:

À medida que o pH diminuiu a concentração de ozônio no meio aquoso aumenta durante o processo de ozonização na presença de castanha-do-Brasil.

O modelo cinético de segunda ordem representa com precisão a decomposição do ozônio em meio aquoso contendo castanha-do-Brasil em diferentes pH's testados.

À medida que o pH diminui, há um aumento da concentração inicial de ozônio dissolvido em meio aquoso na presença de castanha-do-Brasil e, conseqüentemente, uma tendência de redução da meia vida do ozônio.

A ozonização em meio aquoso com pH ácido foi mais eficiente no controle de *A. flavus* em castanha-do-Brasil quando se utilizou a concentração de entrada de 13 mg L⁻¹ por 120 min. Quando a concentração de entrada foi de 21 mg L⁻¹ o tempo de ozonização em meio aquoso de castanha-do-Brasil melhor para redução de *A. flavus* foi o de 240 min.

A variação do pH da água no processo de ozonização de castanha-do-Brasil não apresentou variações expressivas quanto a redução de *A. flavus* ao se utilizar a concentração de entrada de 21 mg L⁻¹ nos tempos de 120 e 240 min de exposição.

O processo de ozonização afeta a cor da castanha-do-Brasil, porém não interfere no perfil lipídico e da qualidade do óleo bruto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 02 de maio de 2003.

AGRIOPOULOU, S.; KOLIADIMA, A.; KARAIKAKIS, G.; KAPOLOS, J. Kinetic study of aflatoxins' degradation in the presence of ozone. **Food Control**, v.61, n.1, p.221-226, 2016.

AGUAYO, E.; ESCALONA, V.H.; ARTES, F. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, n.1, p.169-177, 2006.

ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.D.; SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; CARVALHO, M.C.S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.1, p.899-905, 2012.

ALMEIDA, C.P. Castanha-do-Pará — sua exportação e importância na economia Amazônica. **Estudos brasileiros. Serviço de Informação Agrícola**, n.19, p.1-34, 1963.

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

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

ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; STREICH, R.; MARX, F. Seed Composition of Amazonian Lecythidacea Species: Parte 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants." **Journal of Food Composition and Analysis**, v.12, n.1, p.37-51, 1999.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Codex Alimentarius. Gerência Geral de Alimentos - GGALI. Brasília, DF. 10p. 2016.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/10d276cf-99d0-47c1-80a5-14de564aa6d3>>. Acessado em: 04 Mar. 2019.

AOCS. **Official methods and recommended practices**. 4^a ed. Champaign: AOCS, 2v. 1993.

ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v.41, p.513-527, 2005.

ATAKAN, O.; CANER, C. Evaluation of different ozonation on aflatoxin degradation and physicochemical characteristics of hazelnuts. **Journal Food Processing and Preservation**, v.45, n.e15276, p.1-10, 2021.

BALAKRISHNAN, P.A.; ARUNAGIRIA, A.; RAO, P.G. Ozone Generation by Silent Electric Discharge and its Application in Tertiary Treatment of Tannery Effluent. **Journal of Electrostatics**, v.56, n.1, p.77–86, 2002.

BAYMA, M.M.A.; MALAVAZI, F.W.; SÁ, C.P.; FONSECA, F.L.; ANDRADE, E.P.; WADT, L.H.O. Aspectos da cadeia produtiva da castanha-do-brasil no estado do Acre, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emília Goeldi. Ciências Naturais**, v.9, n.2, p.417-426, 2014.

BELTRAN, F.J. **Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater Systems**. 1 st ed. Boca Raton: CRC Press. 2004.

BENNETT, J.W.; KLICH, M.A. **Aspergillus: Biology and Industrial Applications**. Stoneham, Massachusetts: Butterworh-Heineman. 448p. 1992.

BITTENCOURT, A.B.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v.16, p.117–120, 2005.

BITTENCOURT, D.; DIAS, J.A.; ALVARES, V.S. Micotoxinas em amêndoas da castanheira-do-Brasil. In____: **45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia – Manaus. Tropical Plant Pathology 37 (Suplemento)**, v.37, p.1-3, 2012.

BLOUT, W.P. Turkey “X” disease. **Turkeys**, v.9, n.52, p.55–58, 1961.

BRÄSE S.; ENCINAS A.; KECK J.; NISING C.F. Chemistry and Biology of Mycotoxins and Related Fungal Metabolites. **Chemical Reviews**, v.109, n.9, p.3903-3990, 2009.

BRASIL. Decreto nº 51.209, de 18/08/1961. Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização da exportação da Castanha-do-Brasil. Brasília/DF: **Diário Oficial de Brasília**, p.853-855, 1961.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa – n.12, de 27 de Maio de 2004. Brasília/DF: **Diário Oficial da União**. Seção 1, 28 de Maio de 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeto de Monitoramento da Castanha do Brasil. Relatório de Atividades — 2002**. Brasília/DF: 2002. p.110.

BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 88, de 26 de março de 2021. **Diário Oficial da União**, Ed. 61, Seção 1, p.226., de 31 de março de 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável. **Castanha-do-Brasil: boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico**. 55p. Brasília/DF: 2017.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **Norma Regulamentadora Nº 15 - Atividades e Operações Insalubres, Portaria GM nº 3.214, de 08 de junho de 1978**, publicada no Diário Oficial da União de 06.07.1978. Brasília, DF. 15º edição atualizada. Editora Saraiva, 2015.

CAETANO, A.C. **Introdução e crescimento da castanheira-da-amazônia (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em consórcio agroflorestal com clones de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) em Lavras, MG**. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), 175p — Universidade Federal de Lavras, 2012.

CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C. Application of ozone in industry of food. **Alimentos e Nutrição**, v.19, p.341-349, 2008.

CHRISTIE, W.W. Gas chromatography and lipids: a practical guide. **Oily, Great Britain**, 1989.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; DIDIER, M. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.7, p.1374-1380, 2008.

COZZOLINO, S.M.F. **Novas recomendações de nutrientes interpretação e utilização**. In___: Usos e aplicações das “Dietary Reference Intake”. DRIS. São Paulo: ILSI/SBAN, 2001.

CULLEN, P.J.; TIWARI, B.K.; O’DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, n.1, p.125-136, 2009.

DALSASSO, R.L. **Pré-ozonização de águas contendo agrotóxico, seguida de filtração direta**. Florianópolis: UFSC, 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1999.

DAMEZ, F.; LANGLAIS, B.; RAKNESS, K.L.; ROBSON, C.M. Operating an ozonation facility. In___: LANGLAIS, G.; RECKHOW, D.A.; BRINK, D.R. (Ed.). **Ozone in water treatment: Application and engineering**. Lewis Publishers, p.469-490, 1991.

DI BERNADO, L.; DANTAS, A.D.B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima, v.2, 784p, 2005.

EMBRAPA. **Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da castanha do Brasil**. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos. Brasília, DF: Campo PAS, 64p. 2004.

ERIKSSON, M.; ANDERSSON, R.; KLOO, L. Reaction of SDS with Ozone and OH Radicals in Aqueous Solution. **Ozone: Science and Engineering**, v.29, n.1, p.131-138, 2007.

FAO (Food and Agriculture Organization). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and Nutrition Paper**, v.81, p.1728-3264, 2004.

FDA (Food and Drug Administration). Revised, 2013. **Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe**. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=184.1563>>. Acesso em: 06 Marc. 2019.

FDA. Food and Drug Administration. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. **Federal Register**, v.66, p.33829-33830, 2001.

FELBERG, I.; DELIZA, R.; GONÇALVES, E.B.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C.; CABRAL, L.C. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-Brasi: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.2, p.163-174, 2004.

FERREIRA, E.S.; SILVEIRA, C.S.; LUCIEN, V.G.; AMARAL, A.S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.2, p.203-208, 2006.

FERREIRA, W.F.S.; ALENCAR, E.R.; ALVES, H.; RIBEIRO, J.L.; SILVA, C.R. Influence of pH on the efficacy of ozonated water to control microorganisms and its effect on the quality of stored strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.41, n.6, p.692-700, 2017.

FILAZI, A; SIRELI, U.T. **Occurrence of Aflatoxins in Food, Aflatoxins** - Recent Advances and Future Prospects, Prof. Razzaghi-Abyaneh M. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0904-4, InTech, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/occurrence-of-aflatoxins-in-food>>. Acesso em: 27 Fev. 2019.

FORGACS, J. Mycotoxicoses the neglected diseases. **Feedstuffs**, v.34, n.1, p.124–134, 1962.

FOUNTAIN, J.C.; BAJAJ, P.; PANDEY, M.; NAYAK, S. N.; YANG, L.; KUMAR, V.; JAYALE, A.S.; CHITIKINENI, A.; ZHUANG, W.; SCULLY, B.T.; LEE, R.D.; KEMERAIT, R.C.; VARSHNEY, R.K.; GUO, B. Oxidative stress and carbon metabolism influence *Aspergillus flavus* transcriptome composition and secondary metabolite production. **Nature Scientific Reports**, v.6, n.38747, p.1-12, 2016.

FOUNTAIN, J.C.; SCULLY, B.T.; NI, X.; KEMERAIT, R.C.; LEE, R.D.; CHEN, Z.Y.; GUO, B. Environmental influences on maize-*Aspergillus flavus* interactions and aflatoxin production. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n.40, p.1-7, 2014.

FRANCIS, F.J. The origin of tan⁻¹ a/b. **Journal of Food Science**, v.40, p.412, 1975.

FREIRE, F.C.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, v.149, n.1, p.13-19, 2000.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal** - Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2007, 48p. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf> Acesso em: 27 Fev. 2019.

FREITAS, J.B.; NAVES, M.M.V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v.23, n.2, p.269-279, 2010.

FREITAS, S.C.; SANTOS, N.M.S.; ANTONIASSI, R. Selênio em castanhas do Brasil (*Bertholletia excelsa*) In____: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, Porto Alegre, RS, 2002.

FREITAS, S.P.; SILVA, O.F.; MIRANDA, I.C.; COELHO, M.A.Z. Extração e fracionamento do óleo de Castanha-do-brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.1, p.14 -17, 2007.

FRIEND, M.; FRANSON, J. C. **Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds**. Madison: USGS. 1999.

FRISVAD, J.C.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C.N.; HONG, S.B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A.J.; ARZANLOU, M.; LARSEN, T.O.; SKLENÁR, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies in Mycology**, v.93, p.1-63, 2019.

FRISVAD, J.C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R.A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp.nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.442–453, 2005.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, v.21, n.1, p.468-486, 2002.

GLAZE, W.H.; KANG, J.W.; CHAPIN, D.H. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. **Ozone Science & Engineering**, v.9, p.335-352, 1987.

GODOY, R. Atmosfera modificada: conservação natural dos alimentos. **Revista Nacional da carne**, v.1995, n.223, p.54-61, 1995.

GONÇALVES, A.A. Ozone – an Emerging Technology for the Seafood Industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.6, p.1527-1539, 2009.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, A.J.; SAUPE, A. **Ozonation of water and wastewater: a practical guide to understanding ozone and its applications**. Hardcover, 2° ed, 378p, 2000.

GRAHAM, D.M.; PARIZA, M.W.; GLAZE, W.H.; ERDMAN, J.W.; NEWELL, G.W.; BORZELLECA, J.F. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, v.51, n.6, p.72-75, 1997.

GUTIERREZ, E.M.R.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; RAUEN-MIGUEL, A.M.O. Estabilidade oxidativa do óleo bruto da castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.1. p.22- 27, 1997.

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

HEDAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, A.C.; WARN, P.A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Review: Microbiology**, v.153, n.1, p.1677-1692, 2007.

HEDAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, A.C.; WARN, P.A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Review: Microbiology**, v.153, n.1, p.1677-1692, 2007.

HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; ZDERADICKA, P.; HRUBÁ, L. Characterization of triacylglycerol and triacylglycerol composition of plants oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1010, p.195-215, 2003.

HOOFF, F.V. Professional risks associated with ozone. In____: MASSCHELEIN, W. J. (Ed.). **Ozonation manual for water and waste water treatment**, p.200-201, 1982.

HORN, B.W.; GELL, R.M.; SINGH, R.; SORENSEN, R.B.; CARBONE, I. Sexual Reproduction in *Aspergillus flavus* Sclerotia: Acquisition of Novel Alleles from Soil Populations and Uniparental Mitochondrial Inheritance. **PLoS One**, v.11, n.1, p.1-22, 2016.

HORN, B.W.; SORENSEN, R.B.; LAMB, M.C.; SOBOLEV, V.S.; OLARTE, R.A.; WORTHINGTON, C.J.; CARBONE, I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus* sclerotia naturally produced in corn. **Phytopathology**, v.104, n.1, p.75-85, 2014.

HSU, I.C.; METCALF, R.A.; SUN, T.; WELSH, J.A.; WANG, N.J.; HARRIS, C.C. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. **Nature**, v.350, p.427– 428, 1991.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística — Produção da extração vegetal e da silvicultura. 2018.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>>. Acesso em: 05 fev. 2019.

INAN, F.; PALA, M.; DOYMAZ, I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. **Journal of Stored Products Research**, v.43, p.425-429, 2007.

JACOMINO, A.P.; MENDONÇA, K.; KLUGE, R.A. Armazenamento refrigerado de limões "Siciliano" tratados com etileno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 45-48, 2003.

JAMIZ, J.; FENTE, C.A.; VAZQUEZ, B.I.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.882, n.1-2, p.1-10, 2000.

JARDIM, W. F. Medição e interpretação de valores do potencial redox (EH) em matrizes ambientais. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1233-1235, 2014.

JESTOI, M.; ROKKA, M.; YLI-MATTILA, T.; PARIKKA, P.; RIZZO, A.; PELTONEN, K. Presence and concentrations of the Fusarium — related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in Finnish grains samples. **Food Additives and Contaminants**, v.21, n.1, p.794-802, 2004.

KABAK, B.; DOBSON, A. D.W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critic. Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, p.593-619, 2006.

KHADRE M.A.; YOUSEF, A.E. Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal Food Microbiology**, v.71, n.1, p.131-138, 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.

KIM, J.G. **Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods**. Ph.D. thesis, The Ohio State University, Columbus, OH. 1998.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; CHISM, G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-34, 1999b.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v.62. n.9, p.1071-1087, 1999a.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, M.A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.45, n.1, p.168-218, 2003.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, n.1, p.99–108, 1988.

KLUCZKOVSKI, A.M.; MARTINS, M.; MUNDIM, S.M.; SIMÕES, R.H.; NASCIMENTO, K.S.; MARINHO, H.A.; KLUCZKOVSKI-JUNIOR, A. Properties of Brazil nuts: A review. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.8, p.642-648, 2015.

KU, Y.; SU, W.J.; SHEN, Y.S. Decomposition Kinetics of Ozone in Aqueous Solution. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, n. 10, p. 108-119, 1996.

KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v.27, n.1, p.891-905, 2008.

KUO, C.H.; ZHONG, L.; ZAPPI, M.Z.; HONG, A.P. Kinetics and Mechanism of the Reaction between Ozone and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solutions. **Journal of Chemical Engineering**, v. 77, n. 3, p. 473-482, 1999.

LEE, U.K.; JOO, S.; KLOPFENSTEIN, N.B.; KIM, M.S. Efficacy of washing treatments in the reduction of postharvest decay of chestnuts (*Castanea crenata* 'Tsukuba') during storage. **Canadian Journal of Plant Science**, v.96, p.1-5, 2016.

LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A.M.; MISORE, A. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p.1763–1767, 2005.

LITTLE, A. A research note off on a tangent. **Journal of Food Science**, v.40, n.2, p.410-411, 1975.

LOCATELLI, M.; MARCANTE, P.H.; CIPRIANI, H.N.; MARTINS, E.P.; VIEIRA, A.H. Avaliação do crescimento da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em um plantio no município de Machadinho do Oeste-Rondônia. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.22, p. 457-470, 2015.

LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. Armazenagem de Grãos. Armazéns em Unidades Centrais de Armazenamento. **IBG**. Campinas - São Paulo, 2002.

LOVATO, M.E.; MARTÍN, C.A.; CASSANO, E.C. A Reaction Kinetic Model for Ozone Decomposition in Aqueous Media Valid for Neutral and Acidic pH. **Chemical Engineering Journal**, v. 146, n. 3, p. 486-497, 2009.

MA, Z.B.; ZHAO, J.X.; WANG, L.A.; ZHENG, X.B. Cloning, prokaryotic expression, and bioactivity of the calmodulin gene of *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.300, n.1, p.107-114, 2009.

MAHMOUD, A.; FREIRE, R.S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, v.30, n.1, p.198-205. 2007.

MARTINS, L.; SILVA, Z.P.G.; SILVEIRA, B.C. Produção e comercialização da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) no Estado do Acre – Brasil, 1998-2006. In____: **Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, 45. p.14, 2008.

MASKAN, M. Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. **Journal of Food Engineering**, v.48, n.2, p.169-175, 2001.

MAXIMIANO, C.V.; CARMONA, R.; SOUZA, N.O.S.; ALENCAR, E.R.; BLUM, L.E.B. Physiological and sanitary quality of maize seeds preconditioned in ozonated water. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.22, n.5, p.360-365, 2018.

MCKENZIE, K.S.; KUBENA, L.F.; DENVIR, A.J.; ROGERS, T.D.; HITCHENS, G.D.; BAILEY, R.H.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, S.A.; PHILLIPS, T.D. Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**, v.77, n.1, p.1094–1102, 1998.

MCKENZIE, K.S.; SARR, A.B.; MAYURA, K.; BAILEY, R.H.; MILLER, D.R.; ROGERS, T.D.; NORRED, W.P.; VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; KUBENA, L.F.; PHILLIPS, T.D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, n.1, p.807–820, 1997.

MCLELLAN, M.R.; LIND, L.R.; KIME, R.W. Hue angle determinations and statistical analysis for multiquadrant hunter L, a, b data. **Journal of Food Quality**, v.18, n.3, p.235-240, 1995.

MENDEZ, F.; MAIER, D.E.; MASON, L.J.; WOLOSHUK, C.P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.33-44, 2003.

MENDONÇA, M. A.; COELHO ARAÚJO, W. M.; BORGIO, L. A.; ARAÚJO, H. C. Deep-frying Oil: heat-induced changes. **Journal of culinary science & technology**, v.13, n.2, p.116-132, 2015.

MENNINGER, E.A. **Edible nuts of the world. Brazil nut family**. 174p. 1977.

MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. Resolução nº 25 de 2002. **Regulamento Técnico Mercosul sobre limites máximos de AF admissíveis no leite, amendoim e milho**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/2002/274_02rdc.htm> Acessado em: 28 Fev. 2019.

MIDORIKAWA, G.E.O. **Aspergillus seção Flavi: Caracterização molecular de espécies aflatoxigênicas da castanha do Brasil e análise do transcriptoma de Aspergillus oryzae em relação a degradação enzimática do bagaço de cana**. 120p. Tese de Doutorado em Biologia Molecular – Universidade de Brasília, 2014.

MIDORIKAWA, G.E.O., PINHEIRO, M.R.R., VIDIGAL, B.S., ARRUDA, M.C., COSTA, F.F., PAPPAS JR, G.J., RIBEIRO, S.G., FREIRE, F., MILLER, R.N.G. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Letters in applied microbiology**, v.47, n.1, p.12-18, 2008.

MIDORIKAWA, G.E.O.; SOUZA, M.L.M.; SILVA, O.F.; DIAS, J.S.A.; KANZAKI, L.I.; HANADA, R.E.; MESQUITA, R.M.L.C.; GONÇALVES, R.C.; ALVARES, V.S.;

BITTENCOURT, D.M.C.; MILLER, R.N.G. Characterization of *Aspergillus species* on Brazil nut from the Brazilian Amazonian region and development of a PCR assay for identification at the genus level. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA, S.B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. **Journal of Environmental Science and Health**, v.42, n.5, p.585-591, 2007.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, p.51-65, 2006.

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

NILSSON, R.H.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K.; SJÖKVIST, E.; KRISTIANSOON, E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. **FEMS Microbiology Letters**, v.296, n.1, p.97-101, 2009.

NORLIA, M.; JINAP, S.; NOR-KHAIZURA, M.A.R.; RADU, S.; CHIN, C.K.; SAMSUDIN, N.I.P.; FARAWAHIDA, A.H. Molecular Characterisation of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic Strains of *Aspergillus Section Flavi* Isolated from Imported Peanuts along the Supply Chain in Malaysia. **Toxins**, v.11, n.501, p.1-20, 2019b.

NORLIA, M.; JINAP, S.; NOR-KHAIZURA, M.A.R.; RADU, S.; SAMSUDIN, N.I.P.; AZRI, F.A. *Aspergillus section Flavi* and Aflatoxins: Occurrence, Detection, and Identification in Raw Peanuts and Peanut-Based Products Along the Supply Chain. **Frontiers in Microbiology**, v.10, n.2602, p.1-17, 2019a.

NOVAK, J.S.; YUAN, J.T.C. The ozonation concept: advantages of ozone treatment and commercial developments. In___: TEWARI, G.; JUNEJA, V.K. (Eds.) **Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation**. Ames: Blackwell Publishing, p.185-193, 2007.

OGUZ, H.; KURTOGLU, F.; KURTOGLU, V.; BIRDANE, Y.O. Evaluation of biochemical characters of broiler chickens during dietary aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Research Veterinary Science**, v.73, p.101-103, 2002.

OLIVEIRA, J.M.; ALENCAR, E.R.; BLUM, L.E.B.; FERREIRA, W.F.S.; BOTELHO, S.C.C.; RACANICCI, A.M.C.; LEANDRO, E.S.; MENDONÇA, M.A.; MOSCON, E.S.; BIZERRA, L.V.A.S. Ozonation of Brazil Nut Decomposition Kinetics, Control of *Aspergillus flavus* and the Effect on Color and on Raw Oil Quality. **LWT - Food Science and Technology**, v.123, p.109106, 2020.

OLIVEIRA, R.M.; WOSCH, C.L. Ozonólise: A busca por um Mecanismo. **Química Nova**, v.35, n.7, p.1482-1485, 2012.

OLIVEIRA-JUNIOR, J.O.O.; LAGES, G.V. Ozonioterapia em lombociatalgia. **Revista Dor**, v.13, n.3, p.261-270, 2012.

ONO, L.T.; SILVA, J.J.; DONÁ, S.; MARTINS, L.M.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and products. **Mycotoxin Research**, v.37, p.221-228, 2021.

ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENC, B.; ZORLUGENC, F.K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.396–399, 2006.

PACHECO, A.M. **Florianópolis. Selênio e aflatoxinas em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) e qualidade de produtos derivados**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Florianópolis/SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 144p. 2007.

PACHECO, A.M.; SCUSSEL, V.M. Aflatoxins evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC-MS/MS-2006 and 2007 harvests. **World Mycotoxin Journal**, v.2, n.3, p.295-304, 2009.

PASCUAL, A.; LLORCA, L.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.1, p.S29-S35, 2007.

PILDAIN, M.B.; FRISVAD, J.C.; VAAMONDE, G.; CABARAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, n.3, p.725-735, 2008.

PIMENTEL, L.D.; WAGNER-JÚNIOR, A.; SANTOS, C.E.M.; BRUCKNER, C.H. Estimativa de viabilidade econômica no cultivo da castanha-do-brasil. **Informações Econômicas**, v.37, n.6, p.26-36, 2007.

PIRES, L.V. **Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos Área de Nutrição Experimental). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 130p. 2012.

PRADO, G.; CARVALHO, E.P.; MADEIRA, J.E.C.G.; MORAIS, V.A.D.; OLIVEIRA, M.S.; CORREA, R.F.; CARDOSO, V.N. Efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) na frequência fúngica de amendoim in natura em função do tempo de prateleira. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.930-936, 2006.

PRUDENTE, A.D.; KING, J.M. Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. **Journal of Food Science**, v.67, n.8, 2002.

RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; STEPONAVIČIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVIČIENĖ, A.; ZVICEVIČIUS, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.13, n.1, p.287-294, 2006.

REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1143, n.1-2, p.48-64, 2007.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher, Instituto Mauá de Tecnologia, 2007. 184 p.

RIBEIRO, M.S.S.; SILVA, O.F.; CASTRO, I.M.; TEIXEIRA, A.; SILVA, S.H.M.; MORAES, A.C.S.S.; ABREU, L.F.; SOUZA, C.L. Efficacy of sodium hypochlorite and peracetic acid against *Aspergillus nomius* in Brazil nuts. **Food Microbiology**, v.90, n.103449, p.1-8, 2020.

RIDEAL, E.K. The Manufacture of Chemicals by Electrolysis. Ozone, 1920. University of Illinois. **Digitized by the Internet Archive in 2007 with funding from Microsoft Corporation**. Disponível em: <<https://archive.org/details/ozonerid00rideuoft>>. Acesso em: 06 Mar. 2019.

RODRÍGUEZ, A.; ROSAL, R.; PERDIGÓN-MELÓN, J.A.; MEZCUA, M.; AGÜERA, A.; HERNANDO, M.D.; LETÓN, P.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; GARCÍA-CALVO, E. **Ozone-based Technologies in Water and Wastewater Treatment**. In__: BARCELÓ, D.; KOSTIANOY, A. The Handbook of Environmental Chemistry, 127–75. Berlin: Springer. 2008.

ROZE, L.V.; HONG, S.Y.; LINZ, J.E. Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.4, n.1, p.293–311, 2013.

RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; MAGUIRE, A.R.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.57, n.3, p.219-228, 2006.

SAHAB, F.A.F.; HASSANIEN, F.R.; EL-NEMR, S.E.; ABDEL-ALIM, H.A.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Effect of ozone gaseous on aflatoxin degradation and fat and protein content in peanut seeds. **Journal of Applied Sciences Research**, v.9, n.1, p.2170-2175, 2013.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v.78, p.141-173, 2014.

SANCHEZ, B.A.O.; ALENCAR, E.R.; PINELLI, L.L.O.; FERREIRA, W.F.S.; ROBERTO, M.A. Tracing interactions among column height, exposure time and gas concentration to dimension peanut antifungal ozonation. **LWT — Food Science and Technology**, v.65, p.668-675, 2016.

SANI, A.M.; AZIZI, E.G.; SALEHI, E.A.; RAHIMI, K. Reduction of aflatoxin in rice by different cooking methods. **Toxicology and Industrial Health**, v.30, n.6, p.546-550, 2012.

SANTOS, J.C.; SENA, A.L.S; ROCHA, C.I.L. 2010. Competitividade brasileira no comércio internacional de castanha-do-brasil. In____: **Anais do Congresso Brasileiro da Sociedade de Economia, Administração e Sociologia Rural** 48: p.1-14. 2010 Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31881/1/SOBER-1223.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

SANTOS, J.E. **Difusão e cinética de Decomposição do Ozônio no Processo de Fumigação de Grãos de Milho (*Zea mays*)**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

SANTOS, J.E.; MARTINS, M.A.; FARONI, L.R.D.; ANDRADE, M.P.; CARVALHO, M.C.S. Ozonization process: Saturation time, decomposition kinetics and quality of maize grains (*Zea mays* L.). In____: **IOA Conference and Exhibition, 2007**, Valência. Proceedings... Valência: International Ozone Association, 2007.

SANTOS, O.V; CORRÊA, N.C.F; SOARES, F.A.S.M.; GIOIELLI, L.A.; COSTA, C.E.F.; LANNES, S.C.S. Chemical evaluation and thermal behavior of Brazil nut oil obtained by different extraction processes. **Food Research International**, v.47. n.1, p.253-258, 2012.

SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* genera. **Ozone: Science & Engineering**, v.36, p.144-152, 2014.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF, S. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.16, p.6241-6246, 2012.

SCHÖNGART, J.; GRIBEL, R.; FONSECA-JUNIOR, S.F.; HAUGAASEN, T. Age and growth patterns of Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) in Amazonia, Brazil. **Biotropica**, v.47, n.5, p.550-558, 2015.

SCOTT, P.M. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. In____: **Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage**, J. Chelkowski (Ed.). Elsevier, p.407-416, 1991.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L.F. **Introdução à Toxicologia dos Alimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2014. 320 p.

SILVA, F.A.; MARSAIOLI-JUNIOR, A. Atividade de água em amêndoas de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) secas por microondas e convencionalmente. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.5, n.1, p.23-32, 2003.

SILVA, O.F; VALLE, H.M; VENÂNCIO, A. Potential of aqueous ozone to control aflatoxigenic fungi in Brazil nuts. **ISRN biotechnology**, v.2013, p.1-6, 2013.

SILVA, R.F.; ASCHERI, J.L.R.; SOUZA, J.M.L. Influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de castanha-do-Brasil. **Ciência e agrotecnologia**, v.34, n.2, p.445-450, 2010.

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

SOPHER, C.D.; GRAHAM, D.M.; RICE, R.G.; STRASSER, J.H. Studies on the Use of Ozone in Production Agriculture and Food Processing. **Proceedings of the International Ozone Association. Pan American Group**, p.1-15, 2002.

SOUSA, A.H.; FARONI, L.R.D.; GUEDES, R.N.C.; TÓTOLA, M.R.; URRUCHI, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**. v.44, p.379-385, 2008.

SOUZA, J.M.L.; MENEZES, H.C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.120-128, 2004.

STDF. **Project 114. Validation and transfer to the key stakeholders of a sustainable and effective Aflatoxin management system in the brazil nut production chain for recovering and consolidating export markets, particularly**

in Europe. **FINALREPORT** Covering Period from 1 June 2006 to 30 November 2008. Disponível em: <<http://www.stdf-safenutproject.com>> Acesso em: 19 Fev. 2019.

TANIWAKI, M.H.; FRISVAD, J.C.; FERRANTI, L.S.; LOPES, A.S.; LARSEN, T.O.; FUNGARO, M.H.P.; IAMANAKA, B.T. Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil Nut supply chain: From rainforest to consumer. **Food Microbiology**, v.61, p.14-22, 2017.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. Métodos em Micologia de Alimentos. In____: **Fungos Deterioradores de Alimentos Ocorrência e Detecção**. Laboratório de Microbiologia, São Paulo, p.37-45, 1996.

TIWARI, B.K.; RICE, R.G. Regulatory and legislative issues. In____: **Ozone in Food Processing**. DONNEL, C.O.; TIWARI, B.K.; CULLEN, P.J.; RICE, R.G. (eds.), Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 2012.

TOMIYASU, H.; FUKUTOMI, H.; GORDON, G. Kinetics and Mechanism of Ozone Decomposition y Basic Aqueous Solution. **Inorganic Chemistry**, v. 24, n. 19, p. 2962-2966, 1985.

TRAMBARULO, R.; GHOSH, S.N.; BURRUS, C.A.; GORDY, W. The molecular structure, dipole moment, and g factor of ozone from its microwave spectrum. **The Journal of Chemical Physics**, v.21, n.1, p.851-855, 1953.

UNECE (United Nations Economic Commission for Europe). **Oilseeds - Determination of moisture and volatile matter content**, Standard, 12p, 2000.

USDA. **United States Department of Agriculture**. National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. Agricultural Research Service, 2018. Disponível em:

<<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/12078?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=Bertholletia+excelsa&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v.69, n.1, p.57–80, 2011.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.13, p.4705-4714, 2006.

VETTRAINO, A.M.; BIANCHINI, L.; CARADONNA, V.; FORNITI, R.; GOFFI, V.; ZAMBELLI, M.; TESTA, A.; VINCIGUERRA, V.; BOTONDI, R. Ozone gas as a storage treatment to control *Gnomoniopsis castanea*, preserving chestnut quality. **Journal Science Food and Agriculture**, v.99, p.6060-6065, 2019.

VICTORIN, K. Review of genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, v.277, n.1, p.221-238, 1992.

WHANGCHAI, K.; SAENGNIL, K.; UTHAIBUTRA, J. Effect of ozone in combination with some organic acids on the control of postharvest decay and pericarp browning of longan fruit. **Crop Protection**, v.25, n.8, p.821–825, 2006.

WHITAKER, T.B. Standardization of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, v.14, n.1, p.233-237, 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mycotoxins, WHO Environmental Health Criteria, Geneva: WHO**, v.11, p.21-84, 1979.

WRIGHT, M.R. An introduction to chemical kinetics. 1.ed. New York: **John Wiley & Sons, Ltd.**, p.441, 2004.

WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M.A. Investigation of gaseous ozone as an anti-fungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.81, n.7, p.1288-1293, 2006.

WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v.41, n.1, p.1–7, 2009.

WYSOK, B.; URADZIŃSKI, J.; GOMÓKA-PAWLICHKA, M. Ozone as an alternative disinfectant — A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.15, n.1, p.3-8, 2006.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.10, p.1573-1580, 2009.

ZHAO, G.H.; LI, J.; SONG, H.Q.; LI, X.Y.; CHEN, F.; LIN, R.Q.; YUAN, Z.G.; WENG, Y.B.; HU, M.; ZOU, F.C.; ZHU, X.Q. A specific PCR assay for the identification and differentiation of *Schistosoma japonicum* geographical isolates in mainland China based on analysis of mitochondrial genome sequences. Infection, genetics and evolution': **journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.12, n.1, p.1027-1036, 2012.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A.M.R.; ROZZA, D.B.; DRIEMEIRE, D.; MALLMANN, C.A.; MIGLIAVACCA, F.A. Surto de aflatoxicose em suínos nos Estados do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.207- 210, 2004.

ANEXO I

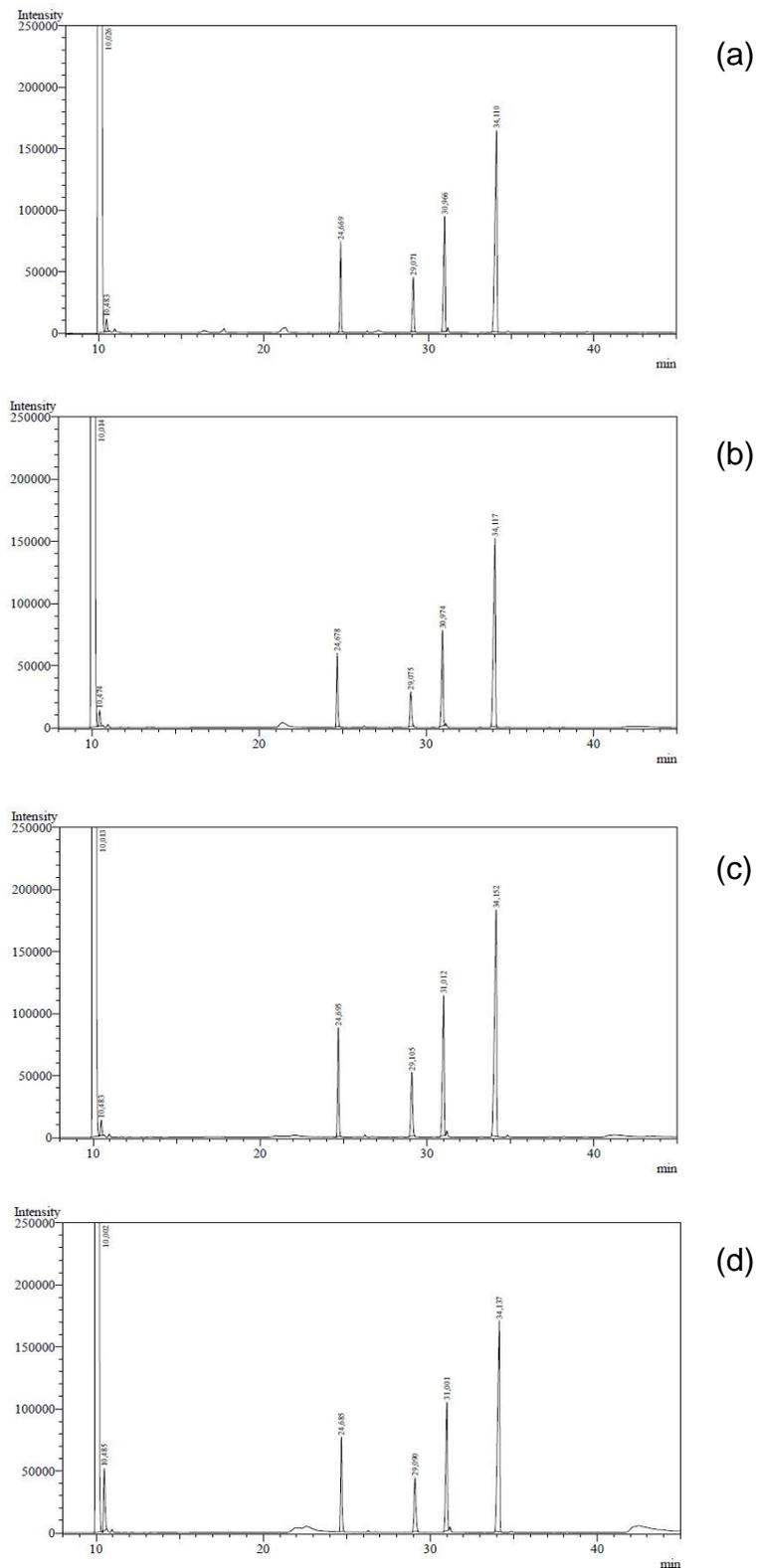


Figura I — Cromatogramas do perfil lipídico do óleo bruto obtido de castanhas-do-Brasil não ozonizadas (a), ozonizadas em água com pH 3,0 (b), pH 7,1 (c) e pH 8,1 (d) na concentração de 13 mg L^{-1} por 2 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.